

ISSN 1413.0084

Microbiologia ambiental.  
1997 LV-PP-1998.00020



CNPMA-3364-1

# MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Editores

ITAMAR SOARES DE MELO

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

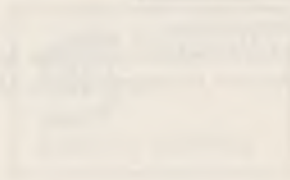
**Embrapa**

0020



Microbiology Department, University of California, Berkeley  
Berkeley, California 94720-1380  
Tel: (415) 849-5100  
Fax: (415) 849-5101

Microbiology Department, University of California, Berkeley  
Berkeley, California 94720-1380



---

# MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Microbiology Department  
University of California, Berkeley  
Berkeley, California 94720-1380

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento: Arlindo Porto

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

**Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento  
e Avaliação de Impacto Ambiental**

Chefe Geral: Clayton Campanhola

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Ariovaldo Luchiari Júnior

Chefe Adjunto Administrativo: Rosângela Blotta Abakerli

CLASS 576

COPYER M 528 m

LUMBO 020/98

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação**  
**de Impacto Ambiental**  
*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*



---

# MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Editores  
Itamar Soares de Melo  
João Lúcio de Azevedo

Embrapa – CNPMA. Documentos, 11.

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental – CNPMA

Rodovia SP 340 – km 127,5 – Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

13820-000 – Jaguariúna, SP

Fone: (019) 867-8700

Fax: (019) 867-8740

e.mail: adi@cnpma.embrapa.br

Produção gráfica: Regina Lucia Siewert Rodrigues

Normatização: Maria Amélia de Toledo Leme

Tiragem: 1.000 exemplares

Projeto gráfico e editoração eletrônica: Estúdio Graal

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de, eds.  
Microbiologia ambiental. Jaguariúna:  
Embrapa–CNPMA, 1997. 440p.  
(Embrapa–CNPMA). Documentos, 11.

CDD 576

---

# PREFÁCIO

A microbiologia ambiental é hoje uma ciência que combina a aplicação dos princípios químicos, biológicos e biotecnológicos, voltada para o maior desafio do ser humano — a manutenção da qualidade ambiental. Entretanto, tecnologias baseadas na manipulação de comunidades microbianas ainda carecem de uma base sólida de conhecimentos sobre ecologia microbiana. No Brasil, com problemas ambientais diversos, a microbiologia ambiental ainda está em expansão e necessita de maior elo de integração entre geneticistas, ecologistas, químicos e biotecnologistas, com vistas à resolução dos emergentes problemas de qualidade ambiental dos agroecossistemas. Este livro focaliza, entre outras abordagens, o problema de contaminação ambiental, principalmente a contaminação por xenobióticos. Essas moléculas são sintetizadas para agirem contra pragas com a premissa de exercerem o mínimo impacto sobre organismos não-alvo. No entanto, algumas podem afetar a vida selvagem, o homem, o ambiente em geral, se são persistentes e/ou recalcitrantes e também se são usadas indiscriminadamente.

Tecnologias desenvolvidas a partir dos estudos de biodegradação têm contribuído para descontaminação de poluentes orgânicos em solos e águas.

Os autores esforçaram-se para descrever e discutir informações recentes no sentido de fornecer uma publicação acessível, em língua portuguesa, aos estudantes e profissionais da área, tão carentes de textos de microbiologia ambiental. O livro apresenta, por isso, capítulos diversos como: biodegradação de pesticidas, biodegradação de petróleo, deterioração de monumentos históricos, impacto ambiental de pesticidas, estratégias de isolamento de microrganismos degradadores de xenobióticos, microrganismos e metais etc.

Esse livro não seria editado sem a generosa colaboração de Maria Amélia de Toledo Leme, Regina Lúcia Siewert Rodrigues, Ivanilde Dispatto, Maria Cristina Tordin, que digitaram, diagramaram e revisaram as referências bibliográficas.

Agradecimentos especiais são estendidos aos Chefes do CNPMA Dr. Clayton Campanhola, Dr. Ariovaldo Luchiari Jr e Dra. Rosângela Blotta Abakerli pelo estímulo e empenho constantes para publicação desse volume.

Finalmente, gostaríamos de dedicar este livro à memória de nossa colega e amiga Profa. Sioni Maluf Barbieri.

*Itamar Soares de Melo*  
*João Lúcio de Azevedo*



---

# APRESENTAÇÃO

As preocupações com a conservação do meio ambiente têm crescido nos últimos anos, principalmente nos países industrializados, devido à consciência que tem sido construída nessas sociedades de que a qualidade ambiental é a base para a preservação da vida das futuras gerações. Desse modo, o meio ambiente deixa de ser um bem de consumo do setor produtivo e se transforma em patrimônio da humanidade.

Muitas atividades produtivas utilizam matérias-primas que são obtidas às custas da degradação ambiental. Muitos resíduos do processo produtivo são descartados no meio ambiente, sem levar em conta os riscos de seu impacto nos diferentes componentes bióticos dos ecossistemas naturais ou transformados. Na agricultura, muitos insumos utilizados, como fertilizantes e agrotóxicos, podem representar riscos ambientais e à saúde humana, se utilizados de forma abusiva e sem considerar as particularidades dos agroecossistemas. Hoje em dia, já há uma tendência do próprio setor produtivo absorver os problemas da degradação ambiental, uma vez que a cobrança das sociedades organizadas nessa direção faz-se notar pela preferência por produtos com “selo verde”, ou seja, que possuam certificado de gestão ambiental adequada aos parâmetros estabelecidos de qualidade ambiental. Em nosso país tem havido uma preocupação cada vez maior com as questões ambientais, mas as ações têm sido desenvolvidas muito mais por iniciativa do Estado do que por pressões da sociedade.

Há muitos problemas de resíduos já presentes no meio ambiente, originário das mais diferentes atividades econômicas, e que requerem ações para a sua remediação ou descontaminação, de modo que os seus efeitos ambientais negativos sejam minimizados ou eliminados. Muitos conhecimentos já foram gerados com esse objetivo, mas ainda há muito a ser realizado.

O importante não é restabelecer a estrutura original de um ecossistema, mas sim as suas funções, de modo que as necessidades humanas por qualidade de vida sejam atendidas.

Uma das formas de degradar os resíduos presentes no meio ambiente é utilizar o seu próprio potencial de reação contra esses químicos. Nesse sentido, os microrganismos desempenham importante papel, uma vez que utilizam essas substâncias como fonte de energia.

Este livro é uma compilação de muitos casos em que os microrganismos podem desempenhar a função de restauração dos padrões ambientais, contribuindo para que os ecossistemas tenham os seus ciclos e funções restabelecidos, e possam oferecer de modo mais eficiente os serviços demandados tanto pelo setor produtivo como pela sociedade em geral.

A sua organização se deu com base nas áreas em que há volume significativo de informações disponíveis e onde já existem condições para a utilização prática de microrganismos para a conservação e recuperação da qualidade ambiental. São abordados também efeitos que produtos químicos, principalmente agrotóxicos, podem causar na biota do solo e sua relação com os ciclos biogeoquímicos dos ecossistemas.

Trata-se de um esforço de muitos autores no sentido de suprir lacuna importante de informação a todos aqueles que se interessam ou que pretendem utilizar o potencial dos microrganismos para manter ou restabelecer o funcionamento adequado dos processos naturais.

*Clayton Campanhola*  
*Chefe Geral Embrapa*

---

# SUMÁRIO

---

1

MICROORGANISMOS E METAIS **11**

Oswaldo Garcia Júnior

---

2

MONITORAMENTO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ÁREAS  
CONTAMINADAS — TECNOLOGIAS EMERGENTES **43**

René P. Schneider

---

3

PERSISTÊNCIA E BIOMAGNIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS  
XENOBIÓTICAS **67**

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Elisabeth Francisconi Fay

---

4

DEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS **107**

Regina Tereza Rosim Monteiro

---

5

DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DE XENOBIÓTICOS **125**

Elisabeth Francisconi Fay

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Itamar Soares de Melo

---

6

BIODEGRADAÇÃO DE FUNGICIDAS BENZIMIDAZÓIS **141**

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Itamar Soares de Melo

---

7

COMO ISOLAR MICROORGANISMOS DEGRADADORES  
DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS **167**

Itamar Soares de Melo

João Lúcio de Azevedo

---

8

EFEITO DE PESTICIDAS SOBRE A MICROFLORA  
DA PARTE AÉREA DE PLANTAS **185**

Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

---

---

**9****BIODEGRADAÇÃO DE PCBs 197**Jorge Mazza Rodrigues  
Vivian H. Pellizari

---

**10****BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS 211**

Sioni Maluf Barbieri

---

**11****BIODEGRADAÇÃO DE ORGANOCLORADOS NO SOLO  
POR BASIDIOMICETOS LIGNOCELULOLÍTICOS 243**

Vera Lúcia Ramos Bononi

---

**12****BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E TRATAMENTO  
DE EFLUENTES POR FUNGOS LIGNINOLÍTICOS 269**Nelson Durán  
Elisa Esposito

---

**13****DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA POR BACTÉRIAS 293**

Paulo Mazzafera

---

**14****BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO 307**

Yoko Bomura Rosato

---

**15****BIODETERIORAÇÃO DE MONUMENTOS HISTÓRICOS 335**

Maria Aparecida de Resende

---

**16****MICROORGANISMOS INDICADORES DE POLUIÇÃO  
AMBIENTAL 357**Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi  
Lídia Teresa de Abreu Pires

---

**17****IMPACTO AMBIENTAL DECORRENTE DO USO  
DE PESTICIDAS AGRÍCOLAS 415**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto



---

# MICROORGANISMOS E METAIS

---

Oswaldo Garcia Jr.

Instituto de Química, Departamento de Bioquímica  
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Araraquara  
Caixa Postal 355, CEP 14801-970, Araraquara, SP

---

## I. INTRODUÇÃO

Os microrganismos, de maneira geral, estão largamente distribuídos em nosso planeta. Representantes desses seres vivos são muitas vezes encontrados mesmo em ambientes de características extremas e presumivelmente adversas. Estão descritas e plenamente caracterizadas espécies que vivem em temperaturas elevadas ou extremamente baixas, em altas concentrações salinas, submetidas a pressões elevadas, em valores extremos de pH (ácido ou básico) etc. A Ecologia Microbiana estuda a interrelação entre os microrganismos, as plantas e os animais no meio em que vivem, não só em ambientes, digamos normais, como também naqueles extremos.

Característica interessante dos microrganismos em geral é o papel que têm exercido e continuam exercendo, desde o aparecimento da vida no planeta, em inúmeros processos geológicos fundamentais. Em linhas gerais, a atividade metabólica desenvolvida pelos microrganismos exerce comprovada influência no intemperismo das rochas, na formação e transformação de sedimentos do solo, na gênese e degradação de minerais e de combustíveis fósseis etc. Ao estudo da relação dos microrganismos com os processos geoquímicos é dado o nome de Geomicrobiologia (Ehrlich, 1981). Conforme esse autor, existem ainda outros assuntos que, de certa forma, se relacionam com o tema central, a Biogeoquímica (Fig. 1).

Pode-se dizer que o estudo da associação de microrganismos e geologia (Geomicrobiologia) começou no século passado com algumas des-

cobertas marcantes que revelaram a participação de microrganismos em processos geoquímicos. Como destacaram Ehrlich (1981) e Rossi (1990), a descoberta da bactéria *Gallionella ferruginea* como agente responsável por depósitos ocre de ferro em pântanos, feita por C.S. Ehrenberg em 1838, pode ser considerada marco inicial dessa área da ciência.

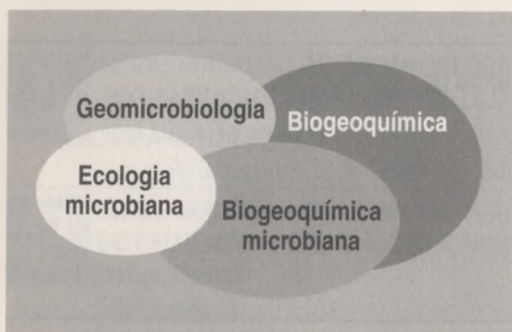


FIGURA 1. Diagrama de Venn-Euler mostrando a relação entre várias áreas envolvendo microrganismos e a geoquímica.

Conforme foi citado também por esses autores, um destaque especial deve ser dado aos estudos de microbiologia de solo, realizados no final do século passado pelo microbiologista russo S.N. Winogradsky. As evidências que obteve sobre a oxidação do  $H_2S$  e deposição de enxofre elementar na bactéria filamentosa *Beggiatoa* sp. e sobre a oxidação de  $FeCO_3$  a óxido férrico pela espécie *Leptothrix ochracea*, levaram-no à formulação do modo **quimiolitotrófico** de vida. Isto é, os organismos quimiolitotróficos obtêm energia para fixação do  $CO_2$  atmosférico, através de reações de oxidação de compostos estritamente inorgânicos.

Nessa mesma época, o cientista Beijerinck descobria o processo bacteriano de redução do sulfato a enxofre elementar que, associado ao processo de oxidação de  $H_2S$ , fundou o alicerce experimental da teoria da ativa participação de microrganismos na formação dos depósitos de enxofre na litosfera, a despeito da teoria "inorgânica da gênese dos depósitos de enxofre" ser predominante na época.

Apesar do conceito de quimiolitotrofismo estar relativamente consolidado no início do século XX, o isolamento e caracterização da primeira cepa de *Thiobacillus* sp., bactéria oxidante de formas reduzidas de enxofre, realizada pelo cientista Nathansohn em 1902, foi também uma descoberta de extrema importância na consolidação dos conceitos iniciais e fundamentais sobre o envolvimento de microrganismos nos processos geoquímicos.

Desde então, um número enorme de trabalhos experimentais de natureza multidisciplinar, envolvendo microbiologistas, geólogos, químicos e outros, vem consolidando e dando o contorno de ciência para a

Geomicrobiologia. Obviamente muitos processos ainda não estão completamente explicados, mas de qualquer forma muitos já estão elucidados, permitindo até o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento racional desses processos microbianos naturais.

## II. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS — O CICLO DO ENXOFRE

De uma forma geral, podemos dizer que os microrganismos participam ativamente como catalisadores biológicos das transformações geoquímicas, pela deposição e solubilização de minerais, que vêm ocorrendo há bilhões de anos em nosso planeta. Para compreendermos a influência que os microrganismos exercem nesses processos transformadores de rochas e minerais, vamos rapidamente relembrar alguns conceitos gerais sobre as características químicas e físicas das rochas e dos minerais.

Sob o ponto de vista geológico, a palavra **rocha** se refere a uma massa sólida e inorgânica, constituída de dois ou mais minerais. Em termos de origem, as rochas podem ser: a) **ígneas** ou **magmáticas**, resultantes do resfriamento e solidificação do magma, líquido quente proveniente do interior do planeta (vulcão, por exemplo) rico em elementos químicos (Si, O, Fe, Al etc.). Quartzo, feldspato, micas, piroxênios são alguns exemplos de minerais formadores das rochas ígneas; b) **sedimentares**, rochas secundárias, formadas por intemperismo de rochas preexistentes, seguido de deposição, acúmulo e compactação dos materiais intemperizados. São caracterizadas em geral por uma estrutura aranjada paralelamente, formando camadas. Como exemplos podem ser citados o arenito, calcário, dolomito etc.; c) **metamórficas**, aquelas que se formaram por alterações químicas ou físicas das rochas ígneas ou sedimentares, submetidas a altas temperaturas e alta pressão. São exemplos típicos o gnaíse, xisto, mármore etc.

O termo **mineral** é usualmente definido como composto inorgânico, normalmente cristalino mas, às vezes, amorfo, com composição e estrutura definidas. O carvão e o asfalto são considerados também minerais, porém de origem orgânica. Os minerais inorgânicos podem ser simples, como por exemplo o enxofre ( $S^0$ ), mais complexos, como a calcopirita ( $CuFeS_2$ ), ou muito complexos, como a biotita [ $K(Mg, Fe, Mn)_3AlSi_3O_{10}(OH)_2$ ].

As rochas e os minerais estão sendo constantemente intemperizados em maior ou menor intensidade, devido à ação de agentes físicos, químicos e biológicos (sobretudo pela ação dos microrganismos). Devido à natureza das rochas ígneas ou magmáticas, os microrganismos praticamente não tiveram participação na origem (formação) desse tipo de ro-

cha. Entretanto, é inegável a sua participação ativa na formação e decomposição dos outros tipos de rochas e nos minerais. Os ciclos biogeoquímicos descrevem as conversões desses materiais, decorrentes da atividade bioquímica na biosfera. Os ciclos biogeoquímicos englobam as transformações físico-químicas, tais como dissolução, precipitação, volatilização e fixação, essencialmente através de reações de óxido-redução. Todos os organismos vivos participam desses ciclos, mas os microrganismos, devido a sua quase onipresença e à diversidade de suas atividades metabólicas, desempenham papel central nos ciclos biogeoquímicos.

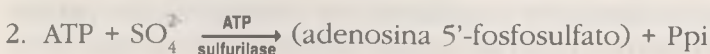
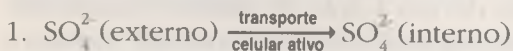
Os ciclos biogeoquímicos de inúmeros minerais e elementos químicos, incluindo a identificação e o tipo de atividade específica de cada microrganismo, estão atualmente bem elucidados. Como exemplos marcantes, podem ser citados: a formação e decomposição de carbonatos, silicatos e sulfetos; as transformações microbianas do nitrogênio, fósforo, ferro, enxofre, manganês, arsênio, mercúrio, cobre, urânio etc.

Neste trabalho, será apenas discutido o envolvimento dos microrganismos com a dissolução de minerais contendo metais, sobretudo os sulfetos metálicos e a bioacumulação e biotransformação de alguns metais, em alguns processos biológicos mais significativos.

Dessa forma, é interessante destacar como um exemplo típico de ciclo biogeoquímico, o **ciclo do enxofre** na biosfera, uma vez que os sulfetos metálicos são fontes importantes dos metais na natureza (Fig. 2).

## II.1. Redução Biológica Assimiladora do Sulfato

Pode-se observar, pela Fig. 2, que o  $\text{SO}_4^{2-}$  presente no solo é basicamente assimilado pelas plantas e microrganismos. Após sua assimilação por transporte ativo, através das membranas desses organismos, o enxofre, que está em sua forma mais oxidada [+6], sofre uma série de reações enzimáticas de redução para ser incorporado ao material celular na sua forma reduzida (Garcia, 1992). Os passos dessas transformações têm sido estudados em várias espécies de microrganismos, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* etc. Em linhas gerais, o enxofre na forma de sulfato é reduzido inicialmente a sulfeto, o qual reage com o aminoácido serina para formar o aminoácido sulfurado cisteína. Conforme Gottschalk (1979), pode-se resumir essa redução e incorporação do enxofre, segundo as reações mostradas abaixo:





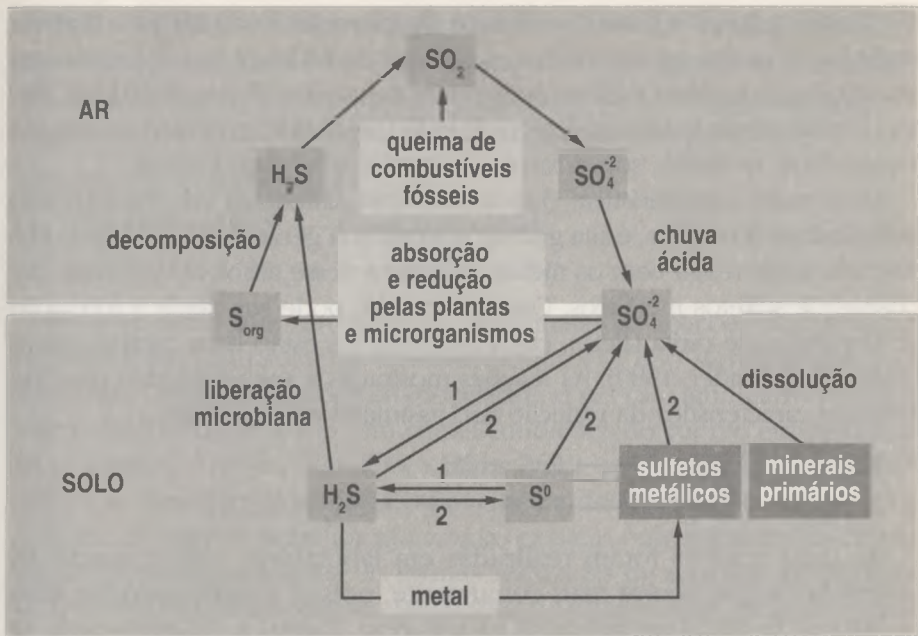


FIGURA 2. Esquema simplificado das transformações do enxofre na biosfera. 1) redução por microrganismos; 2) oxidação por microrganismos.

3.  $\text{ATP} + \text{APS} \xrightarrow[\text{fosfoquinase}]{\text{APS}} \text{PAPS (adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato)} + \text{ADP}$
4.  $2\text{RHS (O)} + \text{PAPS} \xrightarrow[\text{redutase}]{\text{PAPS}} \text{SO}_3^{2-} + \text{AMP-3'fosfato} + \text{RSSR (tirodoxina oxidada)}$
5.  $\text{SO}_3^{2-} + 3\text{NADPH}_2 \xrightarrow[\text{redutase}]{\text{sulfito}} \text{H}_2\text{S} + 3\text{NADP}$
6.  $\text{L-serina} + \text{acetil CoA} + \text{H}_2\text{S} \xrightarrow[\text{sulfidrilase}]{\text{O-acetilserina}} \text{L-cisteína} + \text{acetato} + \text{H}_2\text{O}$

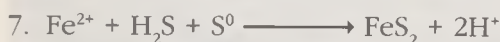
Esse enxofre orgânico ( $\text{S}_{\text{org}}$ ), que participa de várias moléculas biológicas, sobretudo na estrutura das proteínas (aminoácidos cisteína e metionina), é então liberado para a atmosfera como  $\text{H}_2\text{S}$ , por microrganismos decompositores da matéria orgânica morta.

## II.2. Redução Biológica Não Assimiladora de Sulfato

Outra fonte importante da liberação de  $\text{H}_2\text{S}$  para a atmosfera é a redução não assimiladora de sulfato por bactérias redutoras, tais como *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*. Essa redução não assimiladora ocorre praticamente em todo ambiente, contendo sulfato e matéria orgânica na ausência de oxigênio. O sulfato é usado por esse tipo de microrganis-

mo como o aceptor final de elétrons do processo oxidativo da matéria orgânica. Um vez na atmosfera, o sulfeto de hidrogênio se transforma em  $\text{SO}_2$  (que também é liberado, através da queima de combustíveis fósseis e tratamento pirometalúrgico de sulfetos metálicos) e depois retorna à superfície terrestre, sob a forma da conhecida “chuva ácida”.

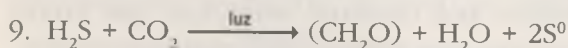
Uma outra característica, que merece ser salientada na redução não assimiladora do sulfato, é sua grande importância geológica, visto que o  $\text{H}_2\text{S}$  liberado pode reagir com os metais presentes nesse ambiente e formar depósitos de sulfetos metálicos. Como exemplo, pode ser citada a formação de depósitos de pirita ( $\text{FeS}_2$ ), cujos mecanismos estão bem caracterizados (Zehnder & Zinder, 1980). As reações mostradas a seguir ilustram essa importante característica da redução não assimiladora de sulfato:



As duas reações foram realizadas em laboratório, mas a reação [8] parece ser a que ocorre mais comumente, pois as condições estão mais próximas daquelas encontradas na natureza. Como já foi destacado, se outros metais estiverem no microambiente, onde a redução não assimiladora microbiana ocorre, haverá a deposição desse metal como um sulfeto. Hoje existem evidências suficientes para se acreditar que esse é um dos mecanismos significativos da formação da gênese dos depósitos geológicos de sulfetos metálicos.

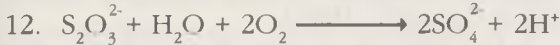
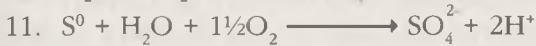
### II.3.Oxidação Biológica de Enxofre

Pode-se dividir as bactérias oxidantes de enxofre inorgânico em dois principais grupos: a) bactérias fototróficas e b) bactérias quimiolitotróficas. Dois gêneros constituem os representantes principais do primeiro tipo: *Chlorobium* e *Chromatium* ou “bactérias verdes do enxofre” e “bactérias púrpuras do enxofre”, respectivamente. Essas bactérias realizam a fotossíntese na ausência de oxigênio (anaeróbios estritos), utilizando o  $\text{H}_2\text{S}$  como doador de elétrons para a realização do processo fotossintético. Desse processo resulta a formação de enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), o qual pode ser acumulado no interior celular (“bactéria púrpura”) ou excretado para o meio externo (“bactéria verde”). A equação abaixo mostra a reação de oxidação, realizada por essas bactérias:



O segundo grupo de bactérias desenvolve suas reações de oxidação de formas reduzidas de enxofre inorgânico na presença de oxigênio,

sendo, portanto, aeróbias estritas. Os compostos de enxofre mais comuns, utilizados como fonte energética para o crescimento bacteriano, são o  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}^0$  e  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . As equações apresentadas a seguir mostram as reações de oxidação biológica desses compostos de enxofre:



Pode-se notar que um dos produtos finais das reações de oxidação dessas formas reduzidas de enxofre é o íon  $\text{H}^+$ ; isso significa que, nos ambientes onde tais reações se processam, o pH cai significativamente e o ambiente torna-se ácido. Em certas condições de cultivo em laboratório, a espécie *Thiobacillus thiooxidans* oxida o  $\text{S}^0$  e o pH do meio de cultura no final de 10 a 15 dias atinge cerca de 0,5 (Garcia, 1991).

Além da espécie mencionada acima, existem outros exemplos clássicos de bactérias oxidantes de formas reduzidas de enxofre. Podem ser citados os gêneros *Beggiatoa*, *Sulfolobus* e *Sulfobacillus*, além de outras espécies do gênero *Thiobacillus*, tais como *T. denitrificans*, *T. novellus* e *T. ferrooxidans*. Sem dúvida alguma, a maioria dos estudos com bactérias oxidantes de enxofre se concentra nas espécies (cerca de 17) do gênero *Thiobacillus*. Dentre essas espécies, merece destaque especial o *T. ferrooxidans*, pois essa espécie, além de oxidar as formas reduzidas de enxofre, oxida ainda o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e sulfetos metálicos em geral (Rossi, 1990). Dessa forma, o *T. ferrooxidans* participa da dissolução oxidativa dos sulfetos metálicos na natureza e essa característica tem sido usada industrialmente para recuperação de metais de interesse econômico em um processo chamado de **lixiviação bacteriana de metais**. Devido a sua importância econômica e ecológica, esse processo será discutido mais detalhadamente a seguir.

### III. LIXIVIAÇÃO BACTERIANA DE METAIS

#### III.1. Histórico

A recuperação de metais, especificamente do cobre, de efluentes naturais de minas, isto é, de soluções produzidas "naturalmente" pelo contato de águas da própria mina ou de chuvas, em caso de minas de céu aberto, foi provavelmente praticada há cerca de 1000 anos A.C., na região mediterrânea (Brierley, 1982). Os chineses, no século X, e os europeus (norte da atual Hungria), no final do século XIV, provavelmente já

usavam esse processo, conforme documentação científica da época (Rossi, 1990). Entretanto, o primeiro registro oficial da lixiviação natural de cobre em pilhas data do século XVIII nas minas do rio Tinto, na Espanha. Tal processo é ainda aplicado nessa mina de cobre. Nos EUA, essa prática foi estabelecida no início deste século e é aplicada até hoje em estados do sudoeste norte-americano. A aplicação dessa técnica para recuperação de urânio foi posteriormente utilizada no Canadá, África do Sul, Portugal e Espanha (Karavaiko & Groudev, 1985).

Apesar de ser uma prática antiga e bastante utilizada, a participação ativa de microrganismos no processo de lixiviação natural era totalmente desconhecida até bem pouco tempo. A definitiva correlação entre a lixiviação natural de metais e a participação direta de bactérias no processo foi estabelecida no final dos anos 40. Através de experimentos elegantes, Colmer & Hinkle (1947), Colmer *et al.* (1950) e Temple & Colmer (1951) conseguiram isolar, purificar e caracterizar a bactéria responsável pela forte acidez e elevada concentração de metais em efluentes de minas de carvão nos EUA, o *T. ferrooxidans*. Tal designação foi atribuída, e plenamente aceita, pela característica peculiar da bactéria de oxidar tanto o enxofre elementar e outras formas reduzidas deste (sulfetos metálicos, por exemplo), como também o íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Após esses trabalhos pioneiros, numerosos artigos foram publicados demonstrando o isolamento dessa espécie de águas ácidas de minas contendo sulfetos de cobre (Bryner & Jameson, 1960; Corrick & Sutton, 1961; Razzel & Trussell, 1963). Nesses trabalhos foi evidenciada a ação oxidativa do *T. ferrooxidans* sobre os sulfetos de cobre, com a conseqüente solubilização do metal, e assim definitivamente correlacionada a decisiva participação bacteriana na lixiviação “natural” do cobre.

### III.2. O Processo

Como já destacado anteriormente, **mineral** pode ser definido como um elemento químico ou uma substância inorgânica de composição química definida, encontrada naturalmente na crosta terrestre. Por outro lado, entende-se **minério** como um ou mais minerais associados, que, sob certas condições podem ser processados, objetivando a recuperação de um ou mais elementos ou substâncias (metálicas ou não metálicas) de interesse econômico. A definição de economicidade da exploração de uma jazida mineral baseia-se fundamentalmente no teor e na quantidade do elemento de interesse e nos custos dos processos envolvidos para sua extração do minério.

Ao longo dos anos, o homem vem utilizando os bens minerais nas mais variadas atividades exercidas em nosso planeta pela espécie huma-

na. Sabe-se que há cerca de 20 mil anos, o homem já praticava uma metalurgia rudimentar. Na chamada idade do bronze, já se produzia uma liga de cobre e estanho. Calcula-se que os egípcios usavam aproximadamente 30 bens minerais. Atualmente são utilizados cerca de 300 bens minerais, dos quais 50 são metais.

Com o avanço tecnológico, metais raros, como urânio, tório, germânio, nióbio e muitos outros, tornaram-se materiais importantes, devido às suas utilizações em vários segmentos da tecnologia de ponta (eletrônica, óptica, energia atômica etc.).

Devido à busca incessante e à descoberta de novas aplicações dos minerais, o aumento da demanda mundial desses bens tornou-se inevitável. Dessa forma, tem-se verificado um progressivo esgotamento das reservas minerais, contendo altos teores dos metais de interesse econômico, devendo-se salientar que tais recursos são, obviamente, não renováveis. Pode-se citar como exemplo o caso do minério de cobre. Até o final do século passado considerava-se econômica a exploração de um minério que apresentasse um teor de cobre da ordem de 10%. Na década de 20 já se processava minério contendo de 1 a 2% do metal. Para isso novas técnicas foram, então, desenvolvidas. Atualmente, utilizando técnicas de concentração prévia, processam-se minérios contendo cerca de 0,3% do metal. Abaixo desse valor, a recuperação do cobre pelos métodos convencionais é praticamente inviável, sob o ponto de vista econômico. Pelo método pirometalúrgico convencional, por exemplo, somente minérios de altos teores ou concentrados prévios são aproveitáveis, devido ao alto custo dessa técnica em função dos gastos excessivos de energia.

Dessa forma, torna-se imperioso o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de minérios contendo baixos teores do metal de interesse. O uso de técnicas hidrometalúrgicas vem merecendo crescente atenção dos técnicos e empresários do setor mineiro-metalúrgico. Nesses processos, soluções ácidas ou básicas são contatadas com o minério em condições apropriadas, causando a solubilização do metal desejado, o qual é, então, recuperado da solução.

Dentre esses processos hidrometalúrgicos, a utilização de microrganismos para promover a solubilização de metais (**lixiviação bacteriana** ou **bio-hidrometalurgia** como é atualmente denominada) apresenta-se como uma alternativa promissora, não só para a recuperação de cobre, como também para uma série de outros metais de interesse econômico.

Essa potencialidade decorre de uma série de fatores, dentre os quais podem ser citados:

1. economia de insumos utilizados em um processo hidrometalúrgico convencional (ácidos e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos a partir de substratos presentes no referido minério;
2. baixo requerimento de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico e mesmo a um processo hidrometalúrgico, em que se utilizam agitadores (lixiviação ácida agitada, por exemplo);
3. baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional, devido à simplicidade das instalações requeridas na bio-hidrometalurgia;
4. reduzida necessidade de mão-de-obra especializada na operação;
5. não poluição atmosférica, pois não ocorre emissão de  $\text{SO}_2$  como no processo pirometalúrgico. Como se sabe, o  $\text{SO}_2$  é o agente causador da conhecida “chuva ácida”.

Além do aproveitamento de rejeitos minerais (minérios de teores reduzidos), a bio-hidrometalurgia pode ser ainda uma alternativa para o aproveitamento de jazidas de pequeno porte ou de localização adversa, isto é, muito longe de centros com infra-estrutura adequada. Atualmente a lixiviação bacteriana é aplicada em escala industrial para recuperação de cobre, de urânio e, mais recentemente, de ouro, em vários países, destacando-se os EUA, Canadá, África do Sul, Rússia, Espanha, Chile, México, Bulgária e Austrália.

O processo operacional da bio-hidrometalurgia é conduzido de forma quase rudimentar, nos casos do cobre e do urânio, aproveitando-se a ação natural de bactérias já presentes nos minérios apropriados. Isto é, aqueles em que o metal de interesse já se apresenta em forma de sulfeto (por exemplo a calcopirita- $\text{CuFeS}_2$ ), o qual se transformará, sob a ação oxidativa bacteriana, no sulfato solúvel correspondente (no exemplo, o  $\text{CuSO}_4$ ). Caso o metal de interesse não se apresente nessa forma mineralógica, deve existir no minério outro sulfeto (por exemplo, a pirita- $\text{FeS}_2$ ) para ser oxidado pela bactéria e se transformar em agentes lixiviantes (ácido sulfúrico e o íon férrico), capazes de promover a solubilização do metal não sulfetado. Salienta-se novamente que a principal espécie bacteriana envolvida diretamente na solubilização de metais de seus minérios é a espécie oxidante do enxofre e suas formas reduzidas (sulfetos metálicos, por exemplo) *T. ferrooxidans*, apesar do envolvimento de outras espécies, como será visto mais adiante.

Resumidamente, o processo consiste na deposição de grandes quantidades de minério (milhares de toneladas) sobre uma base impermeabilizada, seguida de uma irrigação na superfície da pilha formada, com uma solução de ácido sulfúrico (pH~2,0). Essa solução, coletada após a percolação pelo minério, é reciclada constantemente pela pilha, ocasio-

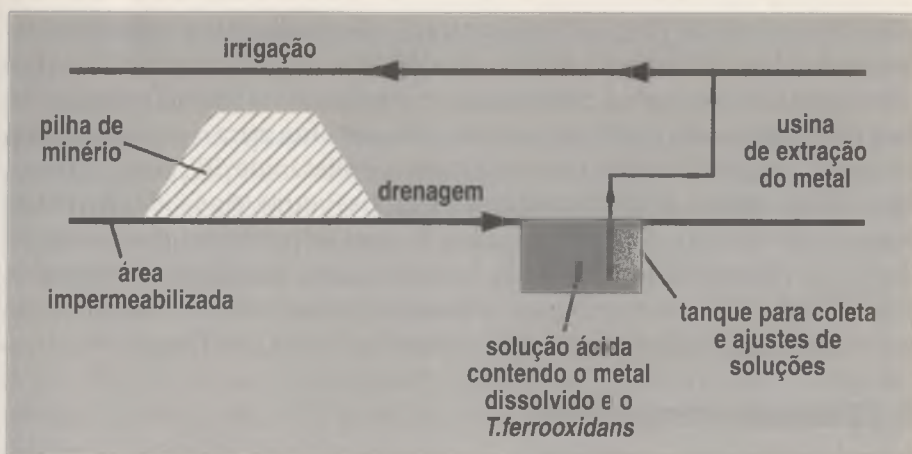


FIGURA 3. Esquema simplificado do processo de lixiviação bacteriana de metais.

nando uma intensificação da atividade bacteriana no substrato mineral sulfetado. Dessa ação resulta uma elevação da acidez e do poder oxidante da solução, pela produção biológica de  $H_2SO_4$  e do íon  $Fe^{3+}$ , com a conseqüente solubilização do metal desejado. Após essa etapa, que constitui a essência do processo de lixiviação bacteriana, o metal é extraído da solução por processos convencionais. Um esquema do processo pode ser visto na Fig. 3.

Existem várias características da bactéria *T. ferrooxidans* que a tornam um interessante microrganismo para estudos básicos de fisiologia, bioquímica e genética, bem como para o desenvolvimento de processos industriais em atividades hidrometalúrgicas:

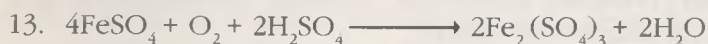
1. crescimento em condições ambientais extremas, sobretudo elevada acidez e altas concentrações de metais;
2. crescimento autotrófico (fixação de  $CO_2$  atmosférico), proporcionado pela energia liberada da oxidação de compostos estritamente inorgânicos, como o íon  $Fe^{2+}$  e formas reduzidas de enxofre;
3. significativa resistência a concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos, provavelmente condicionada por um sistema genético altamente especializado;
4. capacidade de solubilizar metais de interesse econômico, devido ao seu metabolismo oxidativo, que produz eficientes agentes de lixiviação ácida de metais (íon férrico e ácido sulfúrico).

Inúmeros estudos de laboratório têm demonstrado que além do cobre e urânio, outros metais podem ser solubilizados de seus minerais pela atividade bacteriana. Podem ser citados metais de grande interesse econômico como o ouro, prata, zinco, níquel etc.

Sob o nome de “bio-hidrometalurgia” são englobados ainda outros processos baseados na atividade geoquímica dos microrganismos. Em laboratório já se estuda a participação microbiana na dessulfurização do carvão, objetivando minimizar seu teor de enxofre, para que durante sua utilização industrial ocorra uma redução na emissão de  $\text{SO}_2$  para a atmosfera. Além desse, podem ainda ser citados outros tipos de atividade microbiana natural, com potencialidade para se tornarem processos industriais: redução de sulfato por bactérias para produção de enxofre, remoção de metais pesados de efluentes industriais por biomassa de microrganismos, solubilização de rochas fosfáticas por fungos etc.

### III.3. *Thiobacillus ferrooxidans*

*T. ferrooxidans* é uma espécie não patogênica, que se apresenta como bastonetes Gram-negativos, com dimensões médias de 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  de largura por 0,9 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento, contendo um flagelo polar e “pilli”, sendo sua reprodução por divisão binária simples. A faixa de temperatura de seu crescimento situa-se entre 5 e 40°C, sendo que 30°C é a temperatura ótima de crescimento. A espécie é quimiolitotrófica, aeróbia estrita e acidofílica: o pH ótimo de crescimento é em torno de 2,0, ocorrendo, porém, crescimento numa faixa de 1,2 a 4,0. Como já destacado, a espécie utiliza somente substratos inorgânicos para seu crescimento, necessitando basicamente, além da fonte energética ( $\text{Fe}^{2+}$  ou formas reduzidas de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos), suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio. Como resultado de cerca de 30 anos de pesquisa, existe unanimidade com relação à estequiometria da reação de oxidação do íon  $\text{Fe}^{2+}$ , a qual pode ser vista na equação abaixo:



Além do  $\text{Fe}^{2+}$  a espécie oxida ainda formas reduzidas de enxofre para a produção de energia, conforme já apresentado nas equações 10, 11 e 12.

Os elétrons transferidos da reação de oxidação do íon  $\text{Fe}^{2+}$ , das formas reduzidas do enxofre e de outros substratos inorgânicos (a ser visto posteriormente), via cadeia respiratória, liberam a energia necessária para a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) e a consequente produção do trifosfato de adenosina (ATP). Ingledew (1986) apresenta um sumário completo dos componentes do sistema oxidativo e de transferência de elétrons (produção de energia) do *T. ferrooxidans*, dentre os quais deve ser destacada a enzima **rusticianina**, primeiro acceptor de elétrons da cadeia respiratória dessa bactéria. Utilizando a energia proveniente dessas reações de oxidação, a espécie fixa o  $\text{CO}_2$  atmosférico via ciclo de Calvin (Tuovinen & Kelly, 1973).

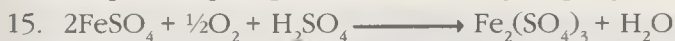
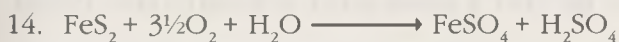


O isolamento dessa espécie é conseguido com certa facilidade, utilizando-se amostras (sólidas ou líquidas) provenientes de minas contendo minério sulfetado. Efluentes de minas de carvão, por exemplo, são geralmente fontes quase certas da presença da bactéria, devido ao seu alto conteúdo de pirita. Várias formulações de meios de cultivo têm sido publicadas, mas até hoje os dois mais utilizados para o cultivo da espécie são os meios "9K" (Silverman & Lundgren, 1959) e o "T & K" (Tuovinen & Kelly, 1973). Em meio sólido, agentes geleificantes puros como a agarose são requeridos, visto que tipos comuns de agar inibem o crescimento da espécie (Garcia *et al.*, 1992). Outra característica fisiológica marcante dessa espécie é sua generalizada resistência a altas concentrações de metais: 0,37 M de Al; 0,15 M de Zn; 0,17 M de Co; 0,18 M de Mn; 0,16 M de Cu; 0,1 M de Cr são tolerados pelo *T. ferrooxidans*, conforme revisões de Lundgren & Silver (1980) e Hutchins *et al.* (1986).

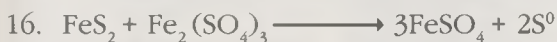
### III.4. Oxidação de Sulfetos Metálicos por *T. ferrooxidans*

Ferro e enxofre formam uma grande variedade de compostos minerais do tipo  $Fe_mS_n$ , dos quais os mais comuns são a pirita, a pirrotita e a marcasita. A fórmula da pirrotita é  $FeS$ , enquanto que a pirita e a marcasita têm a mesma fórmula  $FeS_2$ , diferindo apenas em sua estrutura cristalina: na pirita encontramos cristais monométricos, enquanto na marcasita os cristais são rômnicos.

Um dos sulfetos mais bem estudados, sob o ponto de vista de sua oxidação bacteriana, tem sido a pirita ( $FeS_2$ ), a qual é convertida em  $Fe^{3+}$  e  $H_2SO_4$ , ou, em outras palavras, uma solução ácida de sulfato férrico. As reações abaixo mostram esse processo oxidativo do *T. ferrooxidans* e a Fig. 4 mostra um esquema simplificado do processo.



O sulfato férrico produzido bacterianamente pela reação [15] tem uma ação fortemente oxidativa sobre a pirita e os sulfetos metálicos em geral. Assim, a pirita é também oxidada quimicamente pelo próprio sulfato férrico, segundo a equação abaixo:



O enxofre ( $S^0$ ) e o sulfato ferroso ( $Fe^{2+}$ ), produzidos quimicamente pela equação [16], são novamente oxidados pelo *T. ferrooxidans* a ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e sulfato férrico ( $Fe^{3+}$ ), conforme as equações [11] e [15], respectivamente. Vale destacar que essa propriedade oxidativa do *T. ferrooxidans* determinou uma série de estudos, propondo um proces-

so biotecnológico para a remoção do enxofre pirítico do carvão mineral. Apesar de ainda não ser aplicado em escala comercial, existe uma grande potencialidade para sua utilização industrial, conforme demonstrado por Andrews *et al.* (1988).

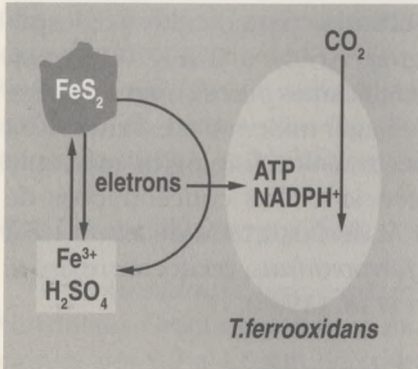


FIGURA 4. Esquema simplificado da oxidação da pirita ( $\text{FeS}_2$ ) pelo *T. ferrooxidans* para produção de energia (ATP) e poder redutor ( $\text{NADPH}^+$ ) para a fixação do  $\text{CO}_2$  atmosférico.

Segundo alguns pesquisadores (Ahonen *et al.*, 1986; Miller & Rissati, 1988), a pirrotita é bem mais susceptível à oxidação pelo *T. ferrooxidans* do que a própria pirita e a marcasita. As reações envolvidas em seu processo de dissolução oxidativa são semelhantes àsquelas da pirita. Em trabalho recente, Bhatti *et al.* (1993) demonstraram pela técnica de difração de raios X, a formação de enxofre elementar, K-jarosita [ $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)(\text{OH})_6$ ], goetita ( $\text{FeOOH}$ ) e schwertmanita [ $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$ ], como produtos intermediários da oxidação bacteriana da pirrotita.

Outro sulfeto de ferro, que tem merecido uma crescente atenção dos pesquisadores, é a arsenopirita, pois a associação desse mineral com o ouro é relativamente comum em minerais aurífero-piritosos (Rossi, 1990). Normalmente a pirita ou, no caso, a arsenopirita, ocluem o ouro, dificultando

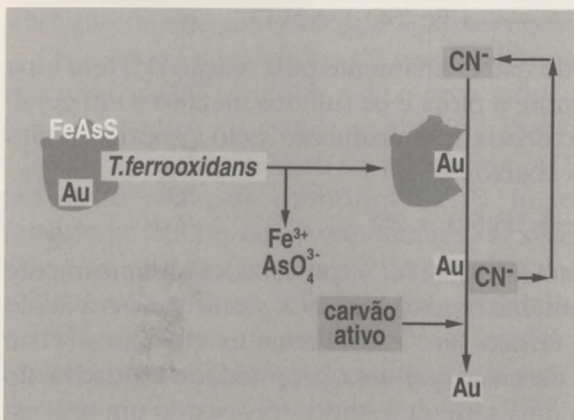
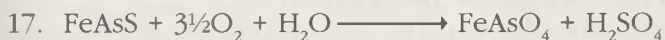


FIGURA 5. Esquema da oxidação da arsenopirita pelo *T. ferrooxidans* com a consequente liberação do ouro (Au) ocluído e recuperação deste por carvão ativo.

tando, dessa forma, sua recuperação por processos convencionais. A ação da bactéria oxidando o sulfeto expõe o ouro, tornando-o acessível a um processo convencional de recuperação (por exemplo, a cianetação, seguida de tratamento com carvão ativo). Essa alternativa biotecnológica para o aproveitamento industrial desse tipo de mineral tem se mostrado muito promissora, sob o ponto de vista econômico, e várias unidades-pilotos, ou mesmo semi-industriais em vários países (EUA, Canadá, África do Sul etc.) têm testado a oxidação bacteriana como um pré-tratamento do mineral para a posterior recuperação do ouro (Lindström *et al.*, 1992). Deve ser destacado que, nesse caso, o processo operacional difere profundamente dos exemplos anteriores, pois é conduzido em tanques agitados e, assim, em condições muito mais controladas. A reação [17] mostra essa oxidação biológica e a Fig. 5 um esquema do processo oxidativo da arsenopirita.



A oxidação bacteriana da calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), um dos mais abundantes minerais sulfetados do cobre, tem sido largamente estudada, devido à importância do processo para a recuperação do cobre de minérios sulfetados de baixos teores (Bruynesteyn, 1989). Como foi salientado anteriormente, vários países utilizam o processo biológico para recuperar cobre de minérios de baixos teores. Podem ser citados os EUA, Chile, México, Bulgária, Espanha etc. Recentemente, estimou-se que 25% da produção de cobre dos EUA são obtidos pelo processo biológico (Torma, 1989). No Brasil ainda não existe operação industrial de lixiviação bacteriana do cobre, mas alguns trabalhos realizados com minérios brasileiros acenam com essa inegável potencialidade para sua aplicação (Vaisbich *et al.*, 1979; Andrade, 1984; Marques, 1988; Novo & Garcia, 1990; Garcia & Novo, 1991).

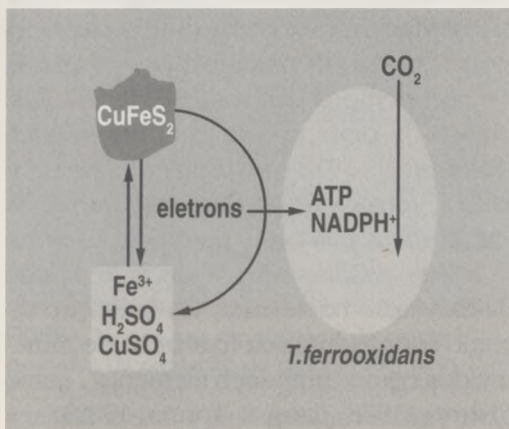


FIGURA 6. Esquema simplificado da oxidação da calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) pelo *T. ferrooxidans* para produção de energia (ATP) e poder redutor ( $\text{NADPH}^+$ ) para a fixação do  $\text{CO}_2$  atmosférico. Notar que o cobre solúvel é produzido na forma de  $\text{CuSO}_4$ .

Basicamente a dissolução desse mineral ocorre, numa primeira etapa, pelo ataque bacteriano direto, conforme a equação abaixo:

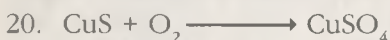


Da mesma forma que na oxidação da pirita, ocorre um ataque bacteriano indireto, pois o sulfato férrico, formado inicialmente, tem também atividade oxidativa sobre a própria calcopirita, solubilizando mais cobre:

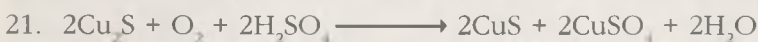


Além do cobre solúvel formado ( $\text{CuSO}_4$ ), pode-se observar a formação de  $\text{FeSO}_4$  e de  $\text{S}^0$ , os quais são novamente oxidados por via biológica, a sulfato férrico e ácido sulfúrico, respectivamente, fechando-se, então, o ciclo. Contudo, inúmeros estudos têm demonstrado que a calcopirita é um dos sulfetos mais refratários ao ataque bacteriano, se comparada a outros sulfetos de cobre (Ahonen & Tuovinen, 1993).

Dois outros minerais sulfetados de cobre, que também são solubilizados via bacteriana, são a covelita ( $\text{CuS}$ ) e a calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ). A equação resumida da oxidação biológica da covelita pode ser vista a seguir:



Baseado em evidências experimentais, Beck (1977) propôs a reação de oxidação bacteriana da calcocita:



Como pode ser observado, o ataque inicial bacteriano à calcocita resulta na liberação de sulfato de cobre solúvel e também no aparecimento de uma “covelita artificial” ( $\text{CuS}$ ), a qual pode ser então oxidada pelas bactérias conforme a equação [20]. Apesar de não totalmente elucidados os mecanismos, bem como os produtos intermediários formados, a oxidação bacteriana a esses dois sulfetos de cobre tem sido bastante estudada.

Apesar de menos pesquisados, obviamente existem outros minerais sulfetados que também podem sofrer o ataque oxidativo bacteriano e, dessa forma, serem solubilizados e recuperados das soluções lixiviantes. Podem ser citados minerais sulfetados de prata, zinco, chumbo, níquel, cobalto, antimônio etc. Torma & Sakaguchi (1978), investigando a oxidação de vários sulfetos metálicos pelo *T. ferrooxidans*, demonstraram essa capacidade e até estabeleceram uma ordem nas taxas de oxidação apresentadas pela bactéria:  $\text{NiS} > \text{CoS} > \text{ZnS} > \text{CdS} > \text{CuS} > \text{Cu}_2\text{S}$ . Tem sido reportada ainda a possibilidade da lixiviação bacteriana, via oxidação direta dos respectivos sulfetos, ou como subprodutos da lixiviação de minerais primários, de elementos conhecidos como “high-tech elements”, como os terras-raras gálio e germânio (Torma, 1978; Jiang & Torma, 1989).

Conforme salientado anteriormente, a lixiviação bacteriana pode ocorrer de forma direta (oxidação do sulfeto do metal desejado) e/ou de forma indireta (produção de agentes lixiviantes, que solubilizam o metal não sulfetado). Um exemplo do último tipo, que, na verdade, constitui um exemplo clássico e bem sucedido da própria bio-hidrometalurgia, é o caso do urânio. O urânio normalmente se apresenta na natureza na forma de óxidos insolúveis ( $\text{UO}_2$ ), como a uraninita ou a pitchblenda. Nesses minerais o urânio se apresenta na forma reduzida insolúvel ( $\text{U}^{4+}$ ). Um passo necessário para solubilizar o urânio é sua oxidação para  $\text{U}^{6+}$ , através de íons oxidantes em soluções ácidas, como por exemplo o  $\text{Fe}^{3+}$ . A participação do *T. ferrooxidans* nesse processo, como tem sido demonstrado por inúmeros pesquisadores (Guay *et al.*, 1977; Tuovinen, 1986), é a de promover a oxidação de um sulfeto de ferro (pirita ou pirrotita, por exemplo) geralmente presente nos minérios uraníferos, produzindo dessa forma o agente de lixiviação (solução ácida de sulfato férrico). A Fig. 7 mostra um esquema simplificado da lixiviação do urânio promovida pelo *T. ferrooxidans*. Podem ser citados como exemplos atuais de países que produzem urânio pela via biotecnológica, o Canadá (Bruynesteyn, 1989) e a Espanha (Cerdá *et al.*, 1993). Em nosso país, alguns trabalhos foram realizados na extinta NUCLEBRAS (atualmente Indústrias Nucleares Brasileiras) e chegou-se até operações em escala piloto (Garcia, 1984; Garcia & Brito, 1984; Garcia, 1990; Garcia, 1993). Entretanto, como é perfeitamente sabido, o arrefecimento do programa nuclear brasileiro, como um todo, determinou a paralisação desses estudos. De qualquer forma, a potencialidade da aplicação industrial da técnica foi satisfatoriamente demonstrada.

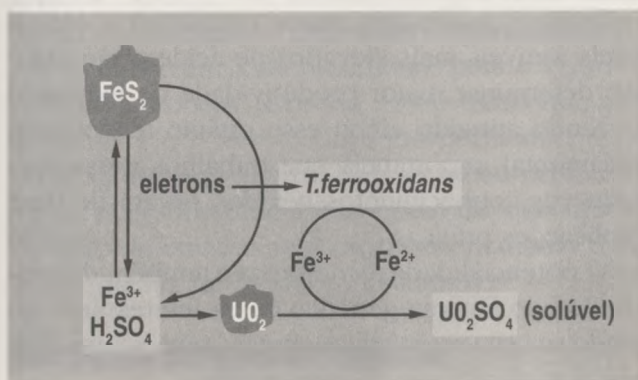


FIGURA 7. Esquema simplificado da oxidação da uraninita ( $\text{UO}_2$ ) pelos produtos da oxidação da pirita ( $\text{FeS}_2$ ) pelo *T. ferrooxidans*. O íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é constantemente reoxidado ao íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pela bactéria. Notar que o urânio solúvel é produzido na forma de  $\text{UO}_2\text{SO}_4$ .

### III.5. A Genética do *T. ferrooxidans*

Apesar de haver um razoável acúmulo de conhecimento sobre a fisiologia e bioquímica do *T. ferrooxidans*, poucos trabalhos têm sido realizados, objetivando um melhoramento do processo de lixiviação, pela manipulação genética da bactéria. Os sistemas de lixiviação operam de forma tão aberta que, prioritariamente, desenvolvem-se populações naturais de microrganismos.

O ambiente natural de lixiviação, por sua própria natureza, é um potente agente selecionador não só de espécies, mas também de linhagens mais eficientes nessas condições ambientais rigorosas (alta acidez, concentrações elevadas de metais etc.). Assim, inocular uma pilha de minério com uma linhagem “melhorada” geneticamente seria provavelmente um procedimento com poucas chances de resultado positivo.

Além desse aspecto, as dificuldades de cultivo da espécie em meio sólido determinaram, durante muitos anos, um desinteresse por estudos sobre a genética do *T. ferrooxidans*. Como se sabe, o cultivo de microrganismo em meio sólido é fundamental para a realização desses estudos.

Num futuro relativamente próximo, deverá ser requerido um nível tecnológico mais elevado do processo. Isso se deve ao fato de que o aproveitamento de concentrados sulfetados (e não mais minérios de baixo teor) ou de materiais contendo metais valiosos (ouro, por exemplo) deverá ser feito em biorreatores, em sistemas operacionais contínuos. Como tais sistemas exigem controles rigorosos, obviamente linhagens bacterianas melhoradas geneticamente poderão e deverão ser usadas.

A princípio, algumas linhas podem ser identificadas como objetivos básicos de um programa de melhoramento genético: taxas mais elevadas de oxidação dos substratos sulfetados, maior resistência a metais tóxicos e maior resistência a níveis mais elevados de acidez. São algumas linhas que poderão determinar maior produtividade da lixiviação bacteriana. Mesmo não tendo atingido ainda esse estágio tecnológico mais elevado, é de fundamental importância que trabalhos nessa área sejam realizados, para que os conhecimentos gerados sirvam de base científica para futuras aplicações práticas.

Em função de toda essa potencialidade tecnológica e também do próprio conhecimento científico do sistema genético dessa interessante espécie bacteriana, sobretudo sua alta resistência a metais, nota-se um crescente interesse na genética molecular do *T. ferrooxidans*.

Entretanto, deve-se começar mencionando os estudos pioneiros de genética clássica do *T. ferrooxidans*, realizados no final da década de 70 por V.I. Groudeva e colaboradores, na Bulgária. Os trabalhos realizados de-

monstraram a existência de variabilidade genética natural na espécie e comprovaram sua potencialidade para o melhoramento genético no sentido de tornar mais eficiente o processo de lixiviação, em seu aspecto biológico (Groudeva & Groudev, 1980a,b). DiSpirito & Tuovinen (1982) constataram também grande variabilidade entre 13 linhagens de *T. ferrooxidans*, quanto à resistência ao urânio e ao tório e a parâmetros cinéticos. Mais recentemente, Garcia & Silva (1991) também mostraram variabilidade natural entre linhagens isoladas de minas brasileiras, quanto à resistência a metais. Em outro estudo, foi detectada diversidade genômica e fisiológica entre linhagens de diversas partes do mundo (Harrison, 1982).

Um dos requisitos essenciais para estudos de genética molecular é o desenvolvimento de sistemas genéticos apropriados. Assim, uma vez comprovada a potencialidade da espécie para a manipulação genética, é essencial que pesquisas sejam realizadas no sentido de preencher os seguintes requisitos: 1) vetores de DNA com capacidade de replicação em *T. ferrooxidans* e de recepção de DNA exógeno devem ser identificados e caracterizados; 2) características apropriadas devem ser identificadas para servirem como marcadores para a seleção de linhagens receptoras transformadas; 3) moléculas de DNA, que codifiquem características desejadas (maior resistência a metais tóxicos, por exemplo), devem ser isoladas e purificadas para construção de moléculas vetoras de DNA; 4) métodos de transformação de células hospedeiras com o DNA clonado devem ser desenvolvidos.

Nos últimos anos, numerosos estudos com o *T. ferrooxidans* têm sido realizados no sentido do desenvolvimento de um sistema genético apropriado para a espécie. Dessa forma, métodos para isolamento de plasmídeos, obtenção de marcadores genéticos (resistência a metais e antibióticos), clonagem e expressão de plasmídeos do *T. ferrooxidans* em *E. coli* e transferência de plasmídeos para o *T. ferrooxidans* têm sido estabelecidos (Roberto & Bruhn, 1993). Todo esse interesse sobre a genética molecular do *T. ferrooxidans* indica claramente que um vasto campo de investigação está aberto. Não só sob o prisma da descoberta científica em si, mas sobretudo sob o ponto de vista biotecnológico, o desenvolvimento de estudos nessa área deverá mudar o estágio tecnológico, ainda incipiente, da bio-hidrometalurgia.

### III.6. Outras Bactérias do Processo

A descoberta do *T. ferrooxidans* como a principal bactéria envolvida no processo de biolixiviação de metais e na dissolução oxidativa dos sulfetos minerais em geral, determinou um crescente interesse dos pes-

quisadores nos aspectos tecnológicos e científicos do fenômeno. Além da intensificação dos estudos sobre a espécie bacteriana, começaram a surgir inúmeras investigações sobre a presença de outras espécies de microrganismos, que poderiam desempenhar importantes funções, diretas ou indiretas, na solubilização desses sulfetos. Groudev *et al.* (1978), investigando durante vários anos a microflora existente em uma pilha de lixiviação bacteriana de minério de cobre na Bulgária, encontraram a presença dos seguintes microrganismos: bactérias do gênero *Thiobacillus* (*T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*), bactérias do ferro (*Gallionella* e *Leptothrix*), bactérias redutoras de sulfato (*Dessulfovibrio*), além de outras espécies de bactérias e fungos heterotróficos. Mesmo presentes nesse ambiente de condições extremamente adversas e relativamente extremas (alta acidez e presença de metais tóxicos solúveis), a participação ativa da maioria desses microrganismos no processo de lixiviação não pôde ser comprovada. Além do *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*, poucas outras espécies apresentam a capacidade de utilizar sulfetos como fonte de energia para seu crescimento, tendo, dessa forma, alguma participação no processo.

Atualmente sabe-se que, além dessas duas espécies bacterianas, existem outras poucas que têm essa capacidade de oxidar o íon  $Fe^{2+}$ , enxofre elementar ou sulfetos metálicos. Balashova *et al.* (1974) isolaram *Leptospirillum ferrooxidans* de depósitos de cobre da Armênia (antiga URSS) e demonstraram sua capacidade de crescer, utilizando somente  $Fe^{2+}$  como fonte de energia. Tem sido ainda demonstrada a oxidação de sulfetos metálicos por espécies moderadamente termofílicas do gênero *Thiobacillus*, as quais diferem profundamente do *T. ferrooxidans* quanto à temperatura de crescimento. Tais espécies foram isoladas de pilhas de lixiviação, onde a temperatura no interior atinge até 80-90°C (Brierley & Lockhoods, 1977; Marsh & Norris, 1983). Além das moderadamente termofílicas, espécies de bactérias termofílicas extremas foram isoladas de pilhas de lixiviação. Exemplo clássico é a espécie *Sulfolobus acidocaldarius*, a qual oxida compostos reduzidos de enxofre e ferro em temperaturas ao redor de 80-90°C e em pH em torno de 1,0 (Brock *et al.*, 1972). Inúmeras revisões sobre as características básicas de outros microrganismos, que oxidam sulfetos metálicos, têm sido publicadas (Tuovinen & Kelly, 1974; Brierley, 1978; Lundgren & Silver, 1980; Harrison, 1984).

### III.7. Outros Processos

Todos esses processos oxidativos de sulfetos metálicos podem ser resumidos pela equação geral [22], em que um sulfeto metálico qualquer



(insolúvel) é oxidado biologicamente a sulfato do metal correspondente (solúvel):



Entretanto, outros processos de dissolução microbiológica de minerais não sulfetados, mas que apresentam metais associados, estão bem caracterizados. Dois exemplos significativos são a solubilização de aluminossilicatos, como por exemplo a leucita  $[\text{KAl}(\text{SiO}_3)_2]$  e seus produtos alterados (bauxita, por exemplo) e de minerais de manganês, como a pirolusita ( $\text{MnO}_2$ ), promovidas pela ação de espécies de microrganismos diferentes dos quimiolitotróficos *Thiobacillus*.

Além do alumínio, outros metais de interesse econômico, tais como o lítio e o berílio, podem estar associados nos aluminossilicatos. Basicamente, a dissolução desses minerais ocorre pela ação de ácidos orgânicos (ácido cítrico e oxálico, por exemplo), produzidos e liberados por microrganismos heterotróficos, entre os quais devem ser destacadas espécies dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*. Deve ser mencionado ainda o mecanismo de ataque biológico direto ao aluminossilicato com a sua conseqüente solubilização. Merecem destaque espécies bacterianas heterotróficas do solo, conhecidas como "bactérias do silicato", nas quais o silício e o alumínio provavelmente desempenham importantes funções bioquímicas e estão envolvidos na formação de microcápsula celular. Uma das espécies mais bem estudadas é o *Bacillus circulans* e algumas variedades dessa espécie.

No caso do manganês tem sido demonstrado que, em condições neutras de pH (~7,0), os seus óxidos de valência [+3] e [+4] são praticamente insolúveis, enquanto que a forma reduzida  $\text{Mn}^{2+}$  apresenta uma solubilidade considerável. Nessas condições, são conhecidas várias espécies de microrganismos também heterotróficos, que promovem a redução do manganês, elevando, dessa forma, sua solubilidade. Podem ser citados: *Bacillus cereus* (águas frescas e sedimentos), *Bacillus* GJ33 (ambientes marinhos), *Arthrobacter* linhagem B e alguns fungos (solos) e *Aeromonas* e *Pseudomonas herbicola* (depósitos minerais). Apesar da potencialidade, devido à comprovada participação de tais espécies microbianas nos ciclos biogeoquímicos desses e de outros metais e elementos químicos em geral, até o presente momento não existem processos industriais que se utilizam desses tipos de metabolismo microbiano. Discussões mais detalhadas e uma excelente atualização bibliográfica sobre esse e outros temas do envolvimento de microrganismos na dissolução de minerais, contendo metais, podem ser encontradas no livro "Biohidrometallurgy" (Rossi, 1990).

## IV. BIOACUMULAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE METAIS

Os microrganismos em geral podem acumular ou transformar elementos metálicos, como resultado de reações enzimáticas específicas ou de mecanismos decorrentes das características e propriedades da parede celular e da membrana plasmática desses microrganismos. Obviamente, esses processos de bioacumulação ou biotransformação de metais vêm ocorrendo naturalmente no ambiente desde o aparecimento desses seres no planeta. Entretanto, com o advento da sociedade industrial e dos avanços do conhecimento científico deste século, os problemas da poluição ambiental generalizada e, especificamente, aqueles relacionados com a presença de metais pesados, determinaram a descoberta e o interesse crescente nos processos, relacionando microrganismos e metais.

Em linhas gerais, todos os microrganismos absorvem e acumulam metais dos ambientes onde proliferam, uma vez que metais, como o ferro, zinco, cobre, molibdênio etc. são componentes essenciais de um grande número de enzimas e outras moléculas biológicas. Ao longo do processo evolutivo, os microrganismos desenvolveram sistemas especializados, os quais foram sendo selecionados naturalmente, para realizar esse processo de absorção e conferir resistência a concentrações elevadas dos metais, geralmente codificada por genes plasmidiais. Em al-

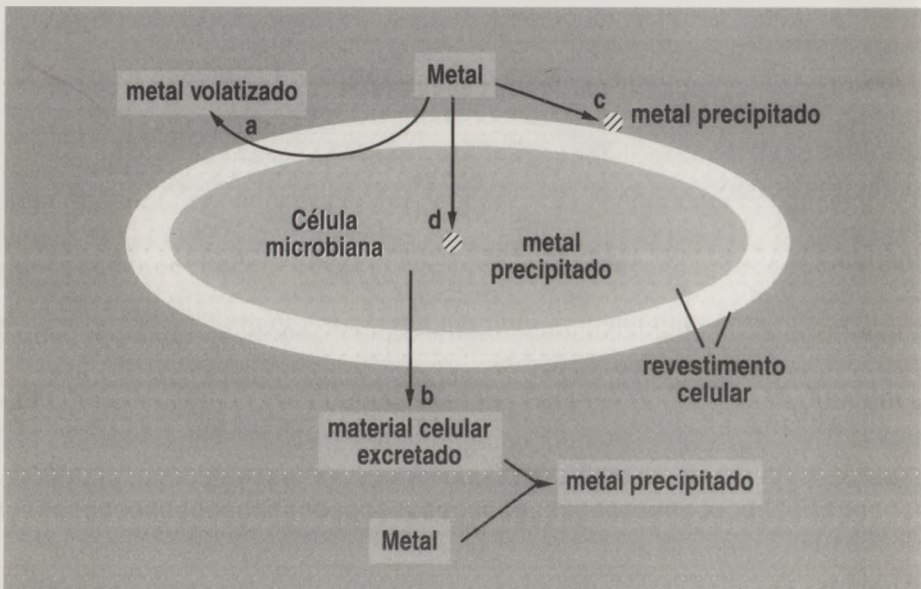


FIGURA 8. Representação esquemática das possíveis interações (a, b, c, d) entre metais e as células de microrganismos.

guns casos ( $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cd}^{2+}$ ) essa resistência é devida a diferenças dos sistemas de absorção e transporte do metal tóxico. Em outros ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ ), o metal é transformado em espécies menos tóxicas ou espécies voláteis, por processos enzimáticos de oxidação, redução ou metilação. Além disso, as próprias estruturas de revestimento e proteção externa do conteúdo celular possuem características apropriadas, do ponto de vista de carga elétrica, para promover uma interação química com os cátions metálicos ou com ânions de metalóides (por exemplo, o selenato e selenito, arsenato e arsenito, telurato e telurito etc.).

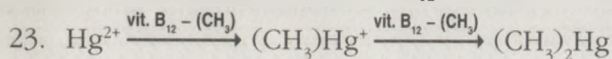
Apesar da especificidade de certos sistemas de absorção, essas características (bio)químicas da parede celular e da membrana plasmática permitem que outros tipos de metais não essenciais e eventualmente tóxicos sejam acumulados ou, pelo menos, transformados em formas não tóxicas por um grande número de microrganismos. Os microrganismos interagem com metais, retirando-os do meio onde vivem, desempenhando, assim, um importante papel nos ciclos geoquímicos desses elementos. A Fig. 8 mostra um esquema desses mecanismos (Brierley *et al.*, 1985; Rossi, 1990).

Essas interações (a, b, c, d) podem ocorrer através dos seguintes mecanismos principais:

- a. Volatilização
- b. Precipitação extracelular
- c. Ligação à superfície celular (adsorção)
- d. Bioacumulação intracelular

### A. Volatilização

A transformação de cátions metálicos tóxicos, tais como  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , etc., e metalóides, tais como As, Se e Te, em suas formas metiladas, por microrganismos está bem documentada (Summers & Silver, 1978; Robinson & Tuovinen, 1984; Williams & Silver, 1984). Um dos exemplos mais bem conhecidos desse processo microbiano é a metilação do mercúrio e sua conseqüente volatilização. A metilação microbiana do mercúrio em sedimentos ou soluções pode ocorrer por um mecanismo não enzimático, através da produção e excreção de metilcobalamina (vitamina  $\text{B}_{12}$  metilada), conforme a reação (23).



Inúmeros microrganismos realizam esse tipo de mecanismos, entre os quais podem ser citados: *Clostridium cochlearium*, *Aspergillus niger*, *Scopulariopsis brevicaule* e *Saccharomyces cerevisiae* (Robinson & Tuovinen, 1984).

Entre os mecanismos enzimáticos, sem dúvida nenhuma, o mais extensivamente estudado é aquele envolvendo a enzima **mercúrio reductase**, uma flavoproteína, que requer como cofator na maioria dos casos estudados o NADPH. Em algumas espécies tem sido demonstrado que o NADH pode ser o cofator requerido pela enzima. Essa enzima reduz o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) a mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) volátil, conforme demonstrado em mais de 100 espécies bacterianas (Summers & Sliver, 1978).

Em ambos os mecanismos, compostos de mercúrio presentes naturalmente em minerais, sedimentos e efluentes aquosos ou ainda presentes em lodos de esgoto, decorrentes da urbanização intensiva da sociedade moderna, são volatilizados e liberados para a atmosfera.

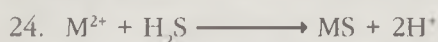
Outra enzima envolvida na volatilização do mercúrio, embora bem menos estudada, é a **organomercúrio liase**. Compostos orgânicos de mercúrio (metilmercúrio, fenilmercúrio etc.) são clivados na ligação Hg-C pela **liase**, liberando o composto orgânico correspondente e o mercúrio, o qual é, então, reduzido à  $\text{Hg}^0$  pela **mercúrio reductase**.

## B. Precipitação extracelular

Os metais podem ser imobilizados e acumulados em solos e sedimentos, devido à sua ligação com produtos metabólicos microbianos excretados.

Os microrganismos em geral produzem e excretam compostos orgânicos, que podem complexar metais, formando complexos organometálicos; dessa forma ocorre a imobilização do metal. Além da produção e excreção de compostos orgânicos, os microrganismos liberam compostos inorgânicos, os quais poderão associar-se com os metais do meio externo, imobilizando-os.

Os sulfetos metálicos e muitos compostos fosfatados de metais são altamente insolúveis. Assim, a produção e excreção desses dois ânions ( $\text{S}^{2-}$  e  $\text{PO}_4$ ) por microrganismos é um mecanismo de detoxificação, uma vez que os compostos insolúveis resultantes não são praticamente tóxicos. Um exemplo clássico é a deposição de sulfetos metálicos por precipitação do metal com o  $\text{H}_2\text{S}$  gerado bacterianamente. Como já foi destacado (item II.2), as bactérias redutoras de sulfato estão largamente distribuídas em ambientes anaeróbios. Esses microrganismos acoplam a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia com a redução do sulfato a  $\text{H}_2\text{S}$ . O sulfeto de hidrogênio liberado reage com o metal, formando o sulfeto metálico correspondente, conforme a equação geral mostrada abaixo:



Além desse mecanismo ativo, a decomposição microbiana de matéria orgânica em sedimentos leva à formação de  $H_2S$  e, conseqüentemente, à deposição de sulfetos metálicos.

### C. Ligação à superfície celular (adsorção)

A ligação de metais à superfície celular dos microrganismos, processo chamado de **biosorção**, é um fenômeno de adsorção que ocorre através de interações eletrostáticas entre o cátion metálico e a superfície carregada negativamente da célula microbiana. Dessa forma, a capacidade de “adsorver” metais vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie. Segundo Rossi (1990), evidências experimentais foram demonstradas na bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, na qual o agente primário de ligação com o metal são grupos  $COO^-$  do ácido glutâmico do peptidoglicano (componente da parede bacteriana). Para a espécie *Bacillus licheniformis*, essa capacidade é determinada primariamente pelo conteúdo significativo de ácidos graxos do revestimento celular, do que pela fração peptidoglicano. Deve ser mencionado ainda que a quantidade de metal ligado à superfície celular é muito maior que aquela prevista pela estequiometria de ligação com os sítios reativos da superfície. Tal constatação pode ser explicada por dois mecanismos básicos, apoiando-se em estudos de microscopia eletrônica. Num primeiro estágio, somente a quantidade estequiométrica do metal liga-se aos sítios ativos da superfície celular. Após essa ligação estequiométrica, os íons metálicos atuam como sítios de nucleação para a deposição de mais íons metálicos, determinando, dessa forma, o aparecimento de agregados de metais chamados “cristalóides”.

Esses princípios, demonstrados em espécies bacterianas Gram-positivas, são válidos também para as Gram-negativas e para outros tipos de microrganismos como algas, fungos, etc. Foi demonstrado, por exemplo, que células de leveduras acumulam uma massa de mercúrio equivalente ao seu próprio peso (Murray & Kidby, 1975). Em outro estudo, Strandberg *et al.* (1981) constataram que as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* acumulam urânio equivalente a cerca de 10 a 15% de seus pesos secos. Outro exemplo interessante de adsorção microbiana de metais é a generalizada capacidade de adsorver metais pela alga *Horridium fluitans*; essa espécie, encontrada em efluentes de minas de cobre, acumula de forma intensa metais como Cu, Al, Ag, Fe, Mo, Ti e V.

Um exemplo marcante de que a adsorção é um processo passivo, decorrente das características do revestimento celular microbiano, foi

obtido com a espécie *Streptomyces longwoodensis*. Células liofilizadas do microrganismo acumularam cerca de 0,45 g de urânio/g de matéria seca em apenas 30 a 40 segundos de exposição ao metal (Friis & Myers-Keith, 1986).

A partir dos exemplos citados acima e de muitos outros encontrados na literatura (Rossi, 1990), pode-se afirmar que potencialmente qualquer microrganismo possui uma afinidade por cátions metálicos. Assim, a utilização de biomassa microbiana como um processo de remoção de metais de efluentes vai depender da identificação daqueles que apresentam a mais alta taxa de remoção e maior nível de especificidade.

#### D. Bioacumulação intracelular

A bioacumulação intracelular de metais pode ser entendida como uma segunda fase do processo de **absorção** dos metais por microrganismos vivos, decorrendo, dessa forma, de um mecanismo celular ativo, que ocorre numa primeira fase, com gasto de energia (ATP). Assim, esse processo difere na sua essência da **adsorção** físico-química passiva, discutida no item anterior.

A bioacumulação de metais na célula requer geralmente sistemas específicos de transporte e dependerá do grau de tolerância da célula ao metal. Tem sido demonstrado que cátions metálicos atingem o interior celular, através do sistema de transporte de micronutrientes, os quais são essenciais ao metabolismo microbiano (Rossi, 1990). Deve-se diferenciar, entretanto, os micronutrientes necessários metabolicamente e aqueles não essenciais. Entre os primeiros, podem ser citados o K, Fe, Mg e, em menor quantidade, Cu, Ni e outros. Entre os não essenciais merecem destaque o Cd e Ag, que são incorporados no interior celular pelos sistemas de transporte dos micronutrientes essenciais. Está demonstrado, por exemplo, que a acumulação por bactérias de  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  ocorre pelo sistema de transporte do  $Mg^{2+}$  e que a acumulação de  $Rb^{+}$  ocorre pelo sistema de transporte do  $K^{+}$  (Brierley *et al.*, 1985). Deve ser destacado, porém, que a bioacumulação intracelular de metais é, em geral, muito menor que aquela atingida na **biosorção**. No caso da bioacumulação, o nível do metal acumulado situa-se numa faixa de 0,5 a 2,0% do peso seco celular.

Estão também documentados na literatura exemplos de bioacumulação de metais por vias diferentes dos conhecidos sistemas de transporte. Strandberg *et al.* (1981) demonstraram que a acumulação intracelular de urânio por *Pseudomonas aeruginosa* parece independe de sistemas de transporte regulados metabolicamente. Nesse sentido, uma

proteína de baixo peso molecular (~6.000) e de alto conteúdo de cisteína (30 a 35%), chamada **metaloteioneína**, parece desempenhar papel fundamental na absorção de metais pelos microrganismos. Sua presença e função em vertebrados, invertebrados e em microrganismos procarióticos e eucarióticos têm sido bem documentadas (Tauseef, 1987; Rossi, 1990).

Além da bioacumulação de metais em suas formas catiônicas, têm sido mostrados exemplos de absorção de formas aniônicas. Em *Neurospora crassa*, a acumulação intracelular de  $\text{CrO}_4$  parece ocorrer pelo sistema de transporte de  $\text{SO}_4$  (Rossi, 1990).

Dos exemplos e discussões acima apresentados, fica evidente a capacidade apresentada pelos microrganismos para a imobilização de metais. Essa capacidade é conferida por processos ativos ou passivos, através da excreção de produtos metabólicos ou ainda pela própria matéria orgânica morta.

Essas características microbianas de adsorver, acumular ou precipitar extracelularmente os metais confere aos microrganismos o potencial para o desenvolvimento de processos de tratamento biológico de efluentes industriais, esgotos domésticos e águas poluídas em geral, nas quais se detecta a presença de metais em suas forma tóxicas.

O tratamento de esgotos municipais pelo conhecido sistema de "lodo ativado" (uma mistura de microrganismos) tem demonstrado que, além de sua eficiência na mineralização de matéria orgânica e na clarificação dos efluentes a serem despejados nos rios, também se mostra muito eficiente na imobilização de metais pesados. Com base nesses conhecimentos, processos específicos para a remoção de metais de efluentes de atividades de mineração têm sido desenvolvidos, objetivando de um lado a descontaminação do efluente a ser lançado no ambiente e, de outro, a própria recuperação desses metais. Exemplo clássico é o processo denominado AMT-BIOCLAIMÔ (Brierley *et al.*, 1986), no qual grânulos de biomassa (consórcio de microrganismos) são utilizados como biossorventes de metais presentes em rejeitos líquidos da indústria minero-metalúrgica.

## V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como já foi amplamente discutido, os microrganismos participam direta ou indiretamente dos ciclos geoquímicos dos metais e dos elementos químicos em geral na natureza. Além dos processos de dissolução de minerais contendo metais, causando sua liberação para o meio ambiente, e a gênese de depósitos contendo metais associados, os microrganismos

mos em geral podem acumular ou transformar elementos metálicos, como resultado de reações enzimáticas específicas ou de mecanismos decorrentes das propriedades de seus revestimentos celulares.

Além da óbvia importância ecológica, pois dessa ação microbiana resulta uma transformação lenta, mas contínua e progressiva, no ambiente em que vivemos, os conhecimentos recentes que vêm sendo acumulados sobre a ativa participação dos microrganismos nos processos geoquímicos, permitiu o desenvolvimento de processos tecnológicos, englobados sob o nome genérico de bio-hidrometalurgia.

Assim, a recuperação em escala industrial de cobre, urânio e ouro pelo processo de dissolução oxidativa de minerais ("lixiviação bacteriana de minérios"), a remoção do enxofre do carvão mineral, a remoção de metais tóxicos de efluentes industriais e urbanos etc. constituem exemplos da importância do tema, sob o ponto de vista de aplicação tecnológica.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHONEN, L.P.; HILTUNEN, P.; TUOVINEN, O.H. The role of pyrrhotite and pyrite in the bacterial leaching of chalcopyrite. In: LAWRENCE, R.W.; BRANION, R.M.R.; EBNER, H.G., ed. **Fundamental and Applied Biohydrometallurgy**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p.13-22.
- AHONEN, L.; TUOVINEN, O.H. Redox potential-controlled bacterial leaching of chalcopyrites ores. In: TORMA, A.E.; WEY, J.E.; LAKSHMANAN, V.I., ed. **Biohydrometallurgical Technologies**. Warrendale: The Minerals, Metals and Material Society, 1993. p.571-578.
- ANDRADE, T.R. Lixiviação bacteriana de minério de cobre de baixo teor. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1984. 82p. Dissertação, Mestrado.
- ANDREWS, G.; DARROCH, M.; HANSSON, T. Bacterial removal of pyrite from concentrated coal slurries. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, p.813-820, 1988.
- BALASHOV V.V.; VEDENINA, I.Y.; MARKOSYAN, G.E. & ZAVARZIN, G.A. The auxotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya* (Moscou), v. 43, p.581-585, 1974.
- BECK, J.V. Chalcocite oxidation by concentrated cell suspension of *Thiobacillus ferrooxidans*. In: SCHWARTZ, W., ed. **Conference Bacterial Leaching** New York: Verlag Chemie, 1977. p.119-128.
- BHATTI, T.M.; BIGHAM, J.M.; CARLSON, L.; TUOVINEN, O.H. Mineral products of pyrrhotite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1984-1990, 1993.
- BRIERLEY, C.L. Bacterial leaching. **Critical Review of Microbiology**, v.6, p.207-262, 1978.
- BRIERLEY, C.L. Microbiological mining. **Scientific American**, v.247, p.44-53, 1982.
- BRIERLEY, J.A.; LOCKWOOD, S.J. The occurrence of thermophilic iron-oxidizing bacteria in a copper leaching system. **FEMS Microbiology Letters**, v.2, p.163-165, 1977.
- BRIERLEY, C.L.; KELLY, D.P.; SEAL, K.J.; BEST, D.J. Materials and Biotechnology. In: HIGGINS, I.J.; BEST, B.J.; JONES, J., ed. **Biotechnology: Principles and Applications**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1985. p.163-213.
- BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L.; GOYAK, G.M. AMT-BIOCLAIMÔ: a new wastewater treatment and metal recovery technology. In: LAWRENCE, R.W.; BRANION, R.M.R.; EBNER, H.G. **Fundamental and Applied Biohydrometallurgy**, Amsterdam: Elsevier, 1986. p.291.
- BROCK, T.D.; BROCK, K.M.; BELLY, R.T.; WEISS, R.L. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. **Archives of Microbiology**, v.84, p.54-68, 1972.



- BRUYNESTEYN, A. Mineral biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.11, p.1-10, 1989.
- BRYNER, I.C.; JAMESON, A.K. Microorganisms in leaching sulfide minerals. **Applied Microbiology**, v.6, p.281-287, 1958.
- CERDÁ, J.; GONZÁLEZ, S.; RÍOS, J.M.; QUINTANA, T. Uranium concentrates bioproduction in Spain: a case study. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.253-260, 1993.
- COLMER, A.R.; HINKLE, M.E. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. **Science**, v.106, p.253-256, 1947.
- COLMER, A.R.; TEMPLE, K.L.; HINKLE, M.E. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. **Journal of Bacteriology**, v.59, p.317-328, 1950.
- CORRICK, J.D.; SUTTON, J.A. Three chemosynthetic autotrophic bacteria important to leaching operations at Arizona copper mines. U.S. Bureau of Mines, Report N° 5718, 1961. 8p.
- DISPIRITO, A.A.; TUOVINEN, O.H. Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Archives of Microbiology**, v.133, p.33-37, 1982.
- EHRlich, H.I. **Geomicrobiology**. New York: Marcel Dekker, 1981. 392p.
- FRIIS, N.; MYERS-KEITH, P. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.21-26, 1986.
- GARCIA Jr., O. Processo combinado bacteriano/químico de lixiviação estática de minério contendo sulfetos e valores recuperáveis de elementos metálicos. Patente de Invenção N° 8402983 ( INPI-MIC), 1984.
- GARCIA Jr., O. Bioleaching of ores: Brazilian perspectives. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON DUMP AND UNDERGROUND BACTERIAL LEACHING METALS FROM ORES, Leningrado, Russia, 1990. **Proceedings**, p.96-102.
- GARCIA Jr., O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.20, p.1-6, 1991.
- GARCIA Jr., O. O enxofre e sua transformação microbiana. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. ed. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.22, p.319-328.
- GARCIA Jr., O. Bacterial leaching of uranium ore from Figueira-PR, Brazil, at laboratory and pilot scale. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.237-242, 1993.
- GARCIA Jr., O.; BRITO, J. Utilização de microrganismos no tratamento de minérios de urânio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA, 3, Rio de Janeiro, 1984. **Anais**, p.2043-2048.
- GARCIA Jr., O.; NOVO, M.T.M. Leaching of a Brazilian copper ore by *Thiobacillus ferrooxidans* in acid and ferric sulfate solutions. In: INTERNATIONAL MINERAL PROCESSING CONGRESS, 17, Dresden, 1991. **Proceedings**, v.5, p.81-90.
- GARCIA Jr., O.; SILVA, L.L. Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. **Biotechnology Letters**, v.13, p.567-570, 1991.
- GARCIA Jr., O.; MUKAI, J.K.; ANDRADE, C.B. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.38, p.279-282, 1992.
- GOTTSCHALK, G. **Bacterial Metabolism**. In: STAR, M.P., ed. New York: Springer-Verlag, 1979. p.39.
- GROUDEV, S.N.; GENCHEV, F.N.; GAIDARJIEV, S.S. Observations on the microflora in an industrial copper dump leaching operation. In: MURR, L.E.; TORMA, A.E.; BRIERLEY, J.A. eds. **Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena**. New York: Academic Press, 1978. p.253-274.
- GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N. Strain improvement of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. In: MEETING OF MINERS AND METALLURGISTS, 12., Bor, 1980. **Proceedings**, Bor: Technical Faculty, 1980a, v.2, p.354-364.
- GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N. Mutation selection of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. **Mikrobiologiya**, Moscou, v.17, p.33-47, 1980b.
- GUAY, R.; SILVER, M.; TORMA, A.E. Ferrous iron oxidation and uranium extraction by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.727-740, 1977.

- HARRISON Jr., A.P. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. **Archives of Microbiology**, v.131, p.68-76, 1982.
- HARRISON Jr., A.P. The acidophilic *Thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. **Annual Review of Microbiology**, v.38, p.265-292, 1984.
- HUTCHINS, S.R.; DAVIDSON, M.S.; BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L. Microorganisms in reclamation of metals. **Annual Review of Microbiology**, v.40, p.311-336, 1986.
- INGLEDEW, W.J. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium Series**, v.16, p.23-34, 1986.
- JIANG, H.; TORMA, A.E. 1989. Extraction of gallium and germanium from supergenic ore. In: CAMPBELL, P.G., ed. **Light Metals** Warrendale: The Minerals, Metals and Materials Society, 1989. p.971-981.
- KARAVAIKO, G.I.; GROUDEV, S.N. Biogeotechnology of metals, its history, tasks and trends of development. In: KARAVAIKO, G.I.; GROUDEV, S.N., ed. **Biogeotechnology of Metals**. Proceedings of International Seminar and Training Course. Moscow: United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects, GKNT, 1985. p.6-24.
- LINDSTRÖM, E.B.; GUNNERIUSSON, E.; TUOVINEN, O.H. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. **Critical Review of Biotechnology**, v.12, p.133-155, 1992.
- LUNDGREN, D.G.; SILVER, M. Ore leaching by bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.34, p.263-283, 1980.
- MARQUES, M.S. Lixiviação bacteriana: uma alternativa para a recuperação de metais. In: ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E HIDROMETALURGIA, 13, São Paulo, 1988. **Anais** 17p.
- MARSH, R.M.; NORRIS, P.R. The isolation of some thermophilic, autotrophic, iron and sulphur-oxidizing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.17, p.311-315, 1983.
- MILLER, K.W.; RISSATI, J.B. Microbial oxidation of pyrrhotites in coal chars. **Fuel**, v.67, p.1150-1154, 1988.
- MURRAY, A.D.; KIDBY, D.K. Sub-cellular location of mercury in yeast grown in the presence of mercuric chloride. **Journal of General Microbiology**, v.86, p.66-85, 1975.
- NOVO, M.T.M.; GARCIA Jr., O. Lixiviação bacteriana de minério de cobre da mina Surubim-BA. In: ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E HIDROMETALURGIA, 14, Salvador, 1990. **Anais** v.2, p.862-878.
- RAZZELL, W.E.; TRUSSELL, P.C. Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. **Journal of Bacteriology**, v.85, p.595-603, 1963.
- ROBERTO, F.F.; BRUHN, D.F. Genetic improvement of acidophilic bacteria for biohydrometallurgy applications. **Geomicrobiology Journal**, v.10, p.249-255, 1993.
- ROBINSON, J.B.; TUOVINEN, O.H. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analyses. **Microbiological Reviews**, v.48, p.95-124, 1984.
- ROSSI, G. **Biohydrometallurgy**. Hamburg: McGraw-Hill, 1990. 609p.
- SILVERMAN, M.P.; LUNDGREN, D.G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of Bacteriology**, v.77, p.642-647, 1959.
- STRANDBERG, G.W.; SHUMATE II, S.E.; PARROTT, J.R., Jr. Microbial cells as biosorbents of heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.237-246, 1981.
- SUMMERS, A.O.; SILVER, S. Microbial transformations of metals. **Annual Review of Microbiology**, v.32, p.637-672, 1978.
- TAUSEEF, R.B.; ECKLER, D.J. Yeast metallothionein and applications in biotechnology. **Microbiological Reviews**, v.51, p.351-364, 1987.
- TEMPLE, K.L.; COLMER, A.R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v.62, p.605-611, 1951.

- TORMA, A.E. Oxidation of gallium sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.888-891, 1978.
- TORMA, A.E. Microbial metal extraction processes. In: MALIK, K.A., NAQVI, S.H.M.; ALEEM, M.I.H., ed. **Proceedings of International Symposium of Biotechnology for Energy** Faisalabad, Pakistan, 1989. p.263-312.
- TORMA, A.E.; SAKAGUCHI, H. Relation between the solubility and the rate of metal sulfide oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Fermentation Technology**, v.56, p.173-178, 1978.
- TUOVINEN, O.H. Acid leaching of uranium ore materials with microbial catalysis. **Biotechnology and Bioengineering Symposium Series**, v.16, p.65-72, 1986.
- TUOVINEN, O.H.; KELLY, D.P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison  $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v.88, p.285-298, 1973.
- TUOVINEN, O.H.; KELLY, D.P. Use of microorganisms for the recovery of metals. **International Metallurgical Review**, v.19, p.21-31, 1974.
- VAISBICH, S.; PINTO, M.L.M.; BORZANI, W. Lixiviação bacteriana de rejeito de minério de cobre de Camaquã pela ação de bactéria isolada do próprio rejeito. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v.10, p.289-302, 1979.
- WILLIAMS, J.W.; SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme Microbial Technology**, v.6, p.530-537.
- ZEHNDER, A.J.B.; ZINDER, S.H. The sulfur cycle. In: HUTZINGER, O., ed. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v.1, Part A. New York: Springer-Verlag, 1980. p.106-145.

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

# 2

## MONITORAMENTO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ÁREAS CONTAMINADAS: TECNOLOGIAS EMERGENTES

René P. Schneider

School of Microbiology and Immunology

University of New South Wales

Sydney, NSW 2052, Australia

Cooperative Research Center for Waste Management and Pollution Control, PO Box 1, Kensington, NSW 2033, Australia

### INTRODUÇÃO

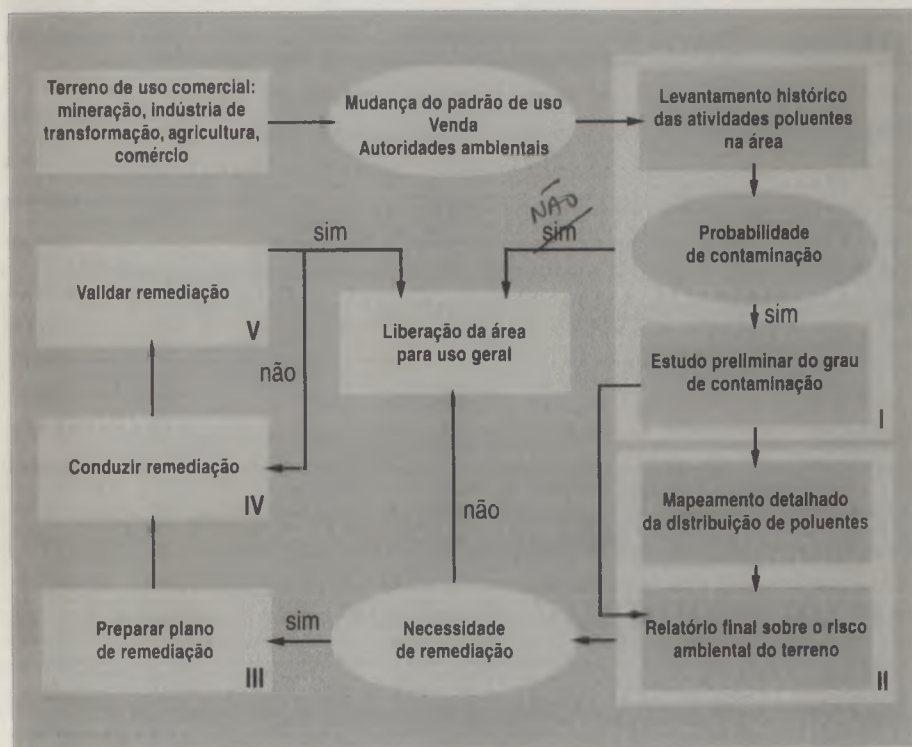


FIGURA 1. Representação esquemática do processo de análise e remediação de área contaminada. Os círculos indicam pontos de decisão, os quadrados definem atividades. As etapas estão indicadas por algarismos romanos.

As várias etapas de um projeto de remediação de poluentes em uma área contaminada estão esquematizadas na Fig. 1.

O processo é desencadeado pela notificação por um órgão de controle ambiental ou por decisão dos proprietários de um terreno potencialmente contaminado de vendê-lo ou de mudar o padrão de uso. Primeiro é feito um levantamento histórico das atividades poluentes conduzidas no local, que envolve essencialmente pesquisa de arquivos e, no caso de unidades industriais, entrevistas com especialistas conhecedores dos processos produtivos. A caracterização da contaminação nessa fase geralmente se limita à análise visual da condição do terreno. Se for constatado um nível de contaminação significativo, um mapeamento detalhado da natureza, distribuição e quantidade de poluentes será feito na etapa seguinte, que incluirá monitoramento químico e na maior parte dos casos outros tipos de monitoramento (biológico, geológico, geofísico e hidrológico), necessários para o preparo de planos de remediação. Um projeto de remediação só será implantado se o relatório desse estudo detalhado indicar a necessidade de descontaminar a área. A propriedade será liberada após confirmação da remoção dos poluentes aos níveis estipulados pelas autoridades ambientais. Uma estimativa dos custos das diferentes etapas do processo está indicada na Tabela 2.

TABELA 2. Estimativa dos custos das diversas etapas de caracterização de áreas contaminadas.

ATIVIDADE	CUSTO (US\$ x 10 <sup>3</sup> )
Estudo preliminar	5 - 30
Caracterização da contaminação	10 - 500
Preparo do plano de remediação	3 - 10
Remediação	30 - 50,000
Validação	5 - 200

## MONITORAMENTO QUÍMICO

O monitoramento químico pode consumir até 40% do orçamento de um projeto, dependendo do número de amostras e do tipo de poluente a analisar. O custo médio é de 15%, o que em 1996 nos EUA, onde o mercado de remediação é estimado em US\$ 12 bilhões (Anon, 1996), equivale a US\$ 1,8 bilhão. Proporção considerável desse dinheiro é gasta com a coleta e o transporte de amostras (US\$ 1,06 bilhão). A tecnologia tradicional de amostragem requer a coleta de amostras de subsolo

por meio de brocas a um custo que varia entre US\$ 2,000 e US\$ 20,000 por unidade, dependendo da profundidade e das condições geológicas do terreno. As amostras devem ser preservadas de forma a evitar a perda de componentes voláteis ou sua transformação química e/ou biológica durante o transporte para os laboratórios de análise, cuja instrumentação inclui equipamentos de alto custo unitário, como por exemplo cromatógrafos a gás equipados com espectrômetros de massa, aparelhos de HPLC, absorção atômica etc. As amostras geralmente não podem ser injetadas diretamente nos equipamentos analíticos. O componente a ser analisado deve ser extraído e purificado por procedimentos morosos e caros e que freqüentemente produzem poluentes (solventes) em quantidades muito superiores às presentes na amostra. Todos esses fatores contribuem para encarecer o custo de análise laboratorial de poluentes, que varia entre US\$ 70 e US\$ 400 por amostra.

Solos são ambientes extremamente heterogêneos tanto na macro como na micro escala. A caracterização da distribuição de poluentes em áreas contaminadas baseia-se geralmente em dados de um número reduzido de amostras. O alto custo de análise inviabiliza extensos programas de *screening* de amostras de solo, água e ar. No caso de poluentes voláteis, a qualidade dos dados é, muitas vezes, duvidosa, devido às dificuldades na preservação das amostras. Metodologias tradicionais de monitoramento químico, portanto, só permitem obter informações aproximadas e pouco detalhadas sobre a distribuição de poluentes em áreas contaminadas.

Tecnologias inovadoras para análise e monitoramento deveriam reduzir custos e melhorar a precisão e a representatividade dos dados obtidos. O aprimoramento dos procedimentos de coleta de amostras e a redução de seu custo permitiriam analisar um número maior de amostras em dado terreno com a conseqüente melhora do detalhamento da distribuição de poluentes. A análise da distribuição de poluentes entre as fases sólida, líquida e gasosa requer novos tipos de sensores. Sistemas ideais seriam sensores capazes de medir a concentração de poluentes *in situ* em tempo real e a baixo custo. Alternativamente, a disponibilidade de aparelhos portáteis eliminaria as incertezas associadas com a conservação das amostras durante a transferência para o laboratório.

## TECNOLOGIAS DE CAMPO DISPONÍVEIS NO MERCADO

A maioria das tecnologias de análise de campo disponíveis no mercado permite analisar grupos de substâncias com propriedades físico-químicas comuns, mas não identificar e quantificar componentes individuais das misturas. A exceção são os laboratórios de campo montados

em plataformas ambulantes, que contêm os mesmos equipamentos de laboratórios fixos, com custos de operação semelhantes. As vendas totais de sensores portáteis para medição de poluentes na indústria de remediação dos EUA, em 1996, foram avaliadas em US\$ 140 milhões (Anon, 1996). Os sistemas mais importantes são:

### **Cromatógrafos a Gás Portáteis**

Cromatografia gasosa é uma tecnologia na qual uma amostra líquida ou gasosa é volatizada e injetada em uma coluna revestida ou empacotada com uma resina que determina a capacidade de fracionamento da coluna. A interação dos componentes da amostra com a resina retarda a passagem da substância pela coluna causando sua separação dos outros componentes da mistura. Depois de separada, a substância é detectada com um dos vários detectores disponíveis para cromatografia gasosa. Os detectores mais comumente utilizados em cromatógrafos portáteis são detectores de estado sólido, mas existem instrumentos equipados com espectrômetros de massa. O preço de um cromatógrafo a gás portátil varia entre US\$ 20,000 e US\$ 40,000. O preço médio é de US\$ 27,500 (Anon, 1996).

### **Detectores de Fotoionização ou de Ionização por Chama**

Esses sistemas para análise de vapores de matéria orgânica não permitem identificar substâncias individuais, mas discriminam entre grupos de substâncias com propriedades físico-químicas semelhantes. Por exemplo, os equipamentos fornecem dados sobre a quantidade de hidrocarbonetos em uma amostra de ar, mas não sobre a composição química deles. O preço de um sistema varia entre US\$ 4,000 e US\$ 25,000, sendo que o preço de um detector portátil se situa na faixa de US\$ 4,000 a US\$ 8,000 (Anon, 1996).

### **Fluorescência de Raio X**

Essa tecnologia permite a análise de metais em solos e outros sólidos (Driscoll *et al.*, 1995) mas variantes em desenvolvimento permitirão analisar amostras líquidas. Um instrumento de campo custa entre US\$ 30,000 e US\$ 50,000 (Anon, 1996).

### **Kits Imunológicos**

Esses kits são variantes de testes ELISA originalmente desenvolvidos para aplicações clínicas (Fig. 2, van Emon & Gerlach, 1995). Na versão mais simples, anticorpos específicos para um poluente são imobi-



lizados em substrato e expostos a uma amostra em conjunto com quantidade conhecida de moléculas do poluente acopladas a uma enzima indicadora (poluente acoplado). As moléculas de poluente das duas fontes competem entre si pelos sítios dos anticorpos. A quantidade de poluente acoplado, ligado ao anticorpo, é medida por um teste enzimático que produz um produto colorido ou fluorescente. A intensidade da cor (ou da fluorescência) é proporcional à quantidade de poluente na amostra. Há testes específicos para poluentes individuais ou para grupos de poluentes com estrutura similar. Os testes disponíveis no mercado permitem analisar uma larga variedade de metais pesados e poluentes orgânicos, incluindo pesticidas (Meulenberg *et al.*, 1995), PAHs e BTEX. A gama de substâncias detectáveis por esse processo está se expandindo rapidamente. O preço de uma análise varia entre US\$ 5 e US\$ 60 (alguns exemplos, em US\$/amostra: atrazina, 6.9; PCB, 12.3; TNT, 6.0; penta-clorofenol, 6.5 e BTEX total, 6.0).

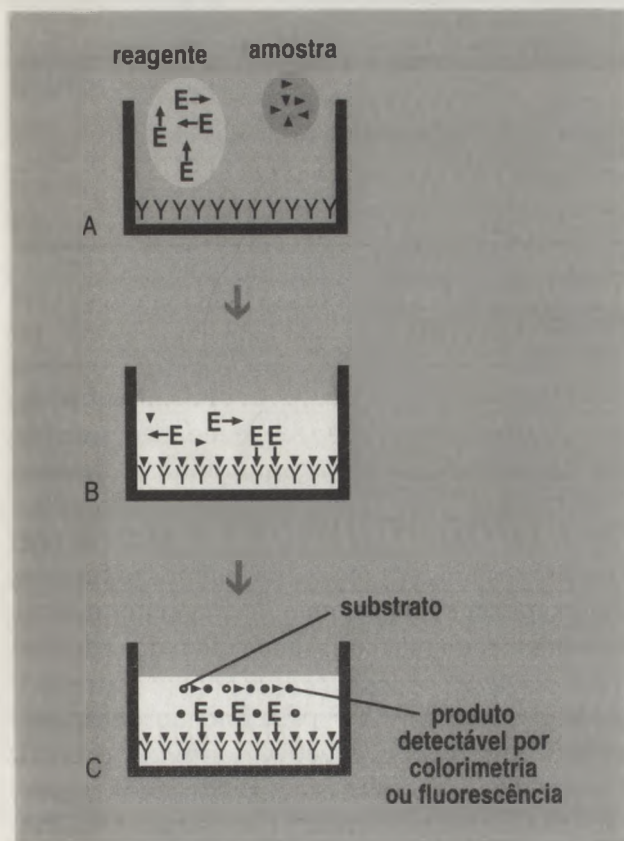


FIGURA 2. Teste ELISA. Anticorpos específicos para o poluente são misturados a uma alíquota de amostra e uma quantidade predeterminada de reagente, que contém a molécula do poluente acoplada ao anticorpo que por sua vez é ligada a uma enzima. As moléculas do poluente na amostra e o poluente acoplado competem pelos sítios de ligação dos anticorpos (b). Após a reação, o líquido é substituído por uma solução-tampão, que contém o substrato para a enzima (c). A reação enzimática dá origem a um produto detectável por colorimetria ou fluorescência. A coloração da amostra é proporcional à quantidade de poluente.

O volume de vendas de equipamentos para análise de campo está em franca expansão nos EUA (Anon, 1996). A fatia de mercado ocupada por cada tipo de tecnologia está indicada na Tabela 3.

TABELA 3. Mercado estimado de várias tecnologias de análise de campo nos EUA em 1996 (Anon, 1996).

TECNOLOGIA	UNIDADES	CUSTO MÉDIO/UNIDADE	VALOR (EM MILHÃO DE US\$)
Cromatografia a gás/ espectrometria de massa	1,936	27,500	53,240
Fotoionização	4,339	4,000	17,356
Ionização por chama	2,942	7,000	20,594
Testes imunológicos	682,750	20	13,655
Fluorescência de raio X	339	35,000	11,865
Outros (medidores de pH, testes colorimétricos, medidores de oxigênio dissolvido)			20,000

## TECNOLOGIAS EMERGENTES

A pesquisa de novas tecnologias para detectar e quantificar substâncias de interesse ambiental ou farmacológico é uma área de intensa atividade, o que se reflete nas várias centenas ou mesmo milhares de artigos publicados por ano. Uma perspectiva científica dos problemas relacionados ao desenvolvimento de novos sensores foi apresentada por Göpel (1994). Essa seção foi estruturada segundo o princípio de funcionamento do sensor. Foram incluídas somente tecnologias para análise de poluentes orgânicos de interesse comercial, utilizáveis para detectar larga variedade de poluentes. Deve-se considerar que muitas variantes de sensores podem ser obtidas de um mesmo princípio de detecção. Soluções específicas, como por exemplo o espectrofluorímetro portátil para detecção de PAH (Gerlach, 1996) ou novos sistemas de amostragem de componentes voláteis como a célula de difusão, não foram incluídas

nessa revisão. As novas tecnologias para o monitoramento de gases como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{O}_3$  e metano, revistas por Yamazoe & Miura (1994), também não foram aqui incluídas.

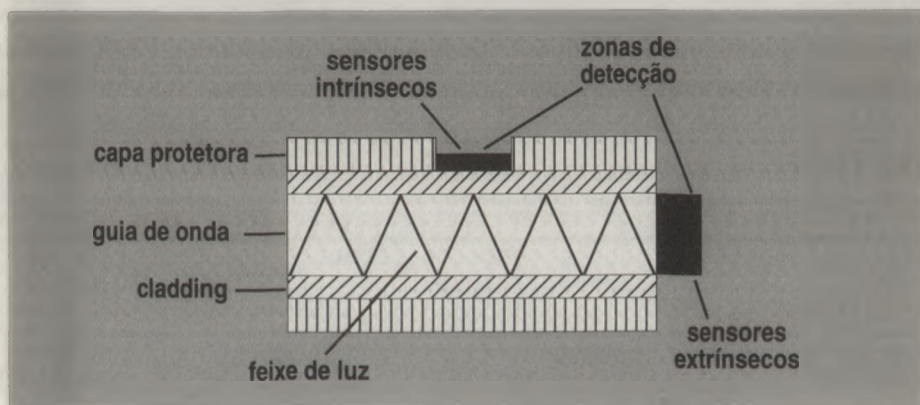


FIGURA 3. Sensores de fibra óptica: localização das zonas de detecção em sensores extrínsecos e intrínsecos.

## SENSORES DE FIBRAS ÓPTICAS

O esquema mais simples de classificação desses sensores considera a função da fibra óptica na geração do sinal (Fig. 3, Seitz, 1988; Moore & De Paula, 1989).

Em sensores extrínsecos, a fibra óptica serve somente como condutor do feixe de radiação. A zona de detecção do poluente se situa na ponta da fibra. Em sensores intrínsecos, a parte exterior da fibra óptica, que consiste de um material de índice de refração menor do que a guia de onda que forma o núcleo, é removida. Nesse caso, ondas evanescentes oriundas da reflexão total do feixe de radiação na interface da guia penetram o ambiente circundante (Fig. 4). A energia dessas ondas diminui exponencialmente com a distância em direção perpendicular à fibra, o que permite analisar a composição química da área em contato imediato com a superfície de reflexão.

O poluente pode ser detectado diretamente (fluorescência, Schade & Bublitz, 1996; ou absorção, Barber *et al.*, 1995) ou indiretamente, por intermédio de uma substância indicadora imobilizada na superfície da fibra, por uma das seguintes maneiras:

- a) acoplamento químico (White *et al.*, 1996);
- b) dentro de uma matriz porosa (Browne *et al.*, 1996) ou polimérica (Barnard & Walt, 1991);

c) dentro de uma zona de reação separada do meio por uma membrana ou outro tipo de barreira semipermeável (optrodos, Seitz, 1988).

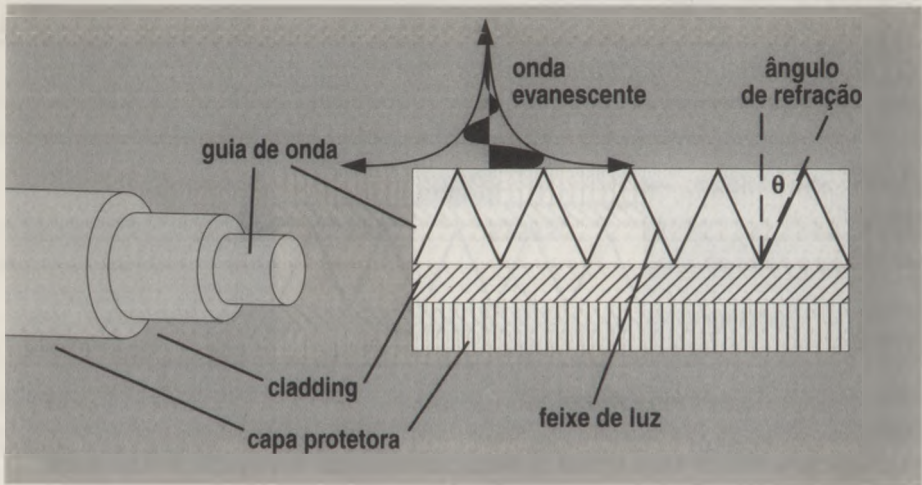


FIGURA 4. Formação de ondas evanescentes em sensores intrínsecos. A exposição direta da guia de onda ao meio ambiente permite analisar sua composição por meio da onda evanescente, cuja intensidade diminui exponencialmente em direção perpendicular à superfície da guia.

## SENSORES DE ONDAS ACÚSTICAS DE SUPERFÍCIE

Esses sensores são baseados na medição de mudanças da frequência de oscilação de cristais piezoelétricos causadas pela adsorção de moléculas na sua superfície (Grate *et al.*, 1996). As áreas de detecção desses sensores são da ordem de 1 cm<sup>2</sup> ou menos. Sua classificação é baseada no formato das ondas, cujas propriedades dependem da orientação do cristal, de sua espessura e da geometria dos transdutores (Fig. 5).

O cristal inteiro oscila em sensores do tipo TSM (*thickness shear-mode*, frequências de ressonância entre 5 e 10 MHz), cujo representante mais conhecido é a microbalança de cristal de quartzo (QCM, *quartz cristal microbalance*). Em sensores de ondas acústicas de superfície (SAW, *surface acoustic wave*, frequências de ressonância entre 30 e 300 MHz), a energia das ondas permanece restrita à superfície do sensor onde ocorrerá a formação de ondas do tipo Rayleigh com movimento elíptico de partículas. Um subgrupo desses sensores é constituído de sensores SAW onde as propriedades do cristal permitem induzir ondas de cisalhamento horizontal com todos os componentes de vibração restritos ao plano do cristal (sensores STW, *surface transverse wave*, frequências de ressonân-

cia entre 30 e 300 MHz). Em sensores FPW (*flexural plate wave*, frequências de ressonância entre 2 e 7 MHz), a espessura do cristal piezoelétrico é reduzida a uma pequena porcentagem do comprimento de onda. Nesses sistemas, a vibração da membrana piezoelétrica é causada por ondas de Lamb semelhantes às ondas de Rayleigh mas que se propagam pelo interior do cristal. Em sensores APM (*acoustic plate mode*, frequências de ressonância entre 25 e 200 MHz), as ondas de cisalhamento horizontal avançam pelo interior do cristal por reflexão múltipla de maneira análoga à propagação da luz pelo interior de fibras ópticas. A espessura dos cristais desses sensores, onde também ocorrem ondas de Rayleigh, varia entre um e poucos múltiplos do comprimento da onda acústica.

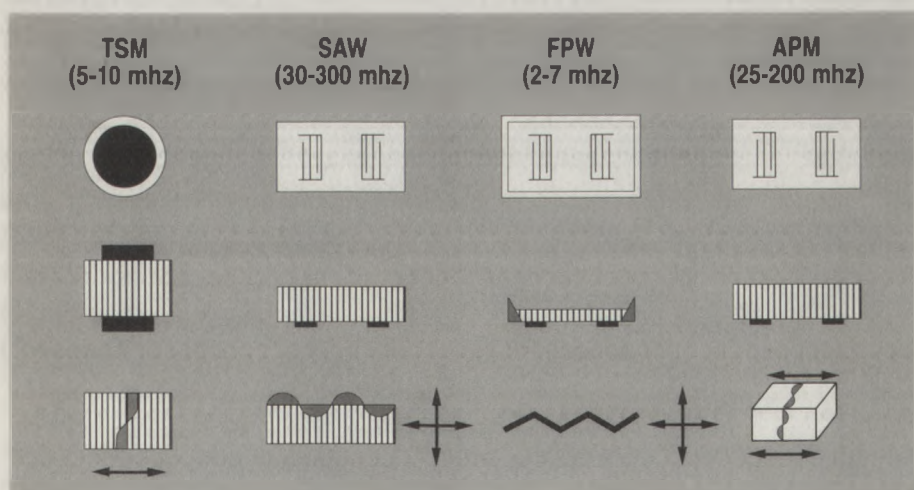


FIGURA 5. Representação esquemática dos tipos mais comuns de sensores de ondas acústicas. TSM: *thickness shear mode* (balança de cristal de quartzo); SAW: *surface acoustic wave*; FPW: *flexural plate wave* e APM: *acoustic plate mode*. Primeira linha: vista de cima; segunda linha: corte transversal; terceira linha: formato da onda acústica no cristal piezoelétrico. Eletrodos: áreas escuras; corte transversal pelo cristal piezoelétrico: área hachurada na vertical; formato da onda acústica: área hachurada de cinza escuro. As setas indicam a direção de movimentação das partículas do cristal (Grate *et al.*, 1993a, modificado).

Todas essas variantes de sensores acústicos podem ser utilizadas para medir a concentração de poluentes orgânicos voláteis na fase gasosa. Seu emprego em líquidos é limitado, devido à perda de energia causada pelo acoplamento das ondas de compressão do sensor com o líquido. Esse fenômeno ocorre sempre que a onda acústica tiver um componente de deslocamento perpendicular à superfície do cristal e quando sua velocidade for maior do que a velocidade de propagação do som no líquido. As

variantes que podem ser utilizadas em fases líquidas são TSM, STW e SH-APM. Sensores de ondas acústicas no seu estado bruto são sensíveis à adsorção de qualquer material na sua superfície. Para conferir a especificidade química necessária a aplicações de monitoramento, a superfície dos cristais é coberta com um filme polimérico seletivo para a molécula a ser analisada (Grate & Abraham, 1991; Grate *et al.*, 1996). Nesses casos, as mudanças da frequência de oscilação, causadas pela absorção do poluente pelo polímero, não serão devidas unicamente ao aumento da massa adsorvida na superfície do cristal, mas também devido à alteração das propriedades de propagação da onda de som pelo interior do polímero, o que se manifesta numa alteração do módulo da onda (Fig. 6). Esse segundo efeito influencia a intensidade do sinal mais do que a mudança da massa adsorvida na superfície do sensor. A detecção de poluentes é rápida e reversível.

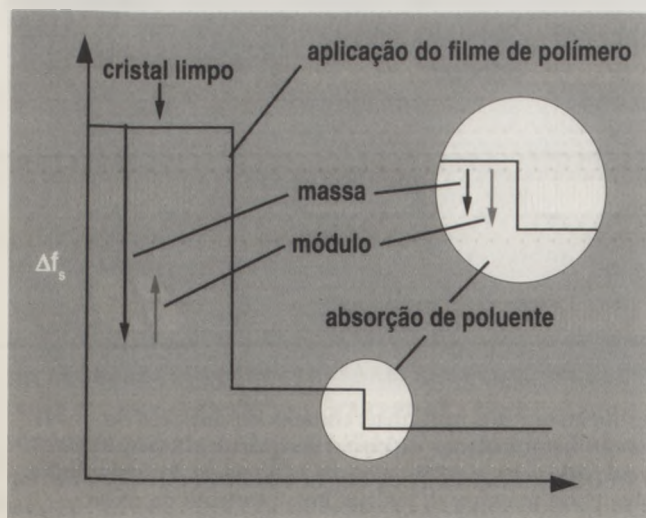


FIGURA 6. Mecanismo de detecção de poluentes em sensores de ondas acústicas com filmes de polímeros. A aplicação do filme de polímero altera a frequência de oscilação do cristal muito mais do que a absorção de moléculas do poluente pelo polímero. Esse segundo processo modifica significativamente as propriedades de propagação de ondas acústicas do polímero, o que se manifesta na mudança do módulo da onda acústica.  $\Delta f_s$ : variação de frequência de oscilação (Grate *et al.*, 1993b, modificado).

Um sistema completo contém dois sensores (um de referência e outro para análise da amostra, Fig. 7), um oscilador eletrônico para ativar o sistema e interfaces eletrônicas digitais para medir a intensidade do sinal, controlar as funções do equipamento e formar a interface com o usuário.

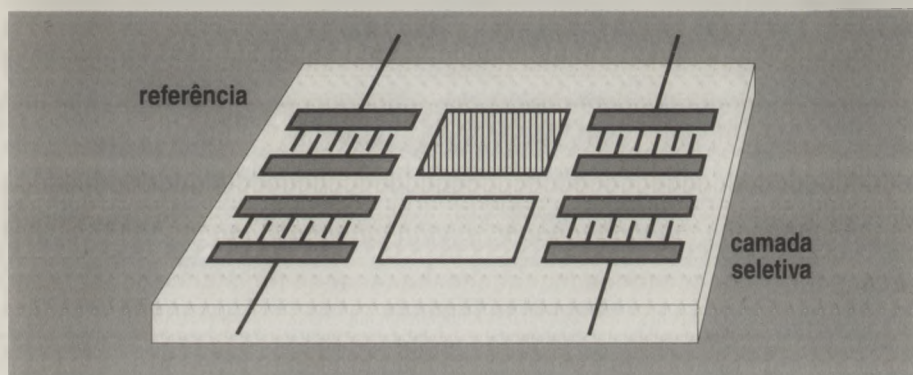


FIGURA 7. Configuração típica de sensores de ondas acústicas. O circuito de referência é montado em paralelo ao sensor de poluentes.

### POLÍMEROS CONDUTORES

Polímeros condutores (Fig. 8) são uma classe de materiais orgânicos (polipirróis, politiofenóis e polianilinas) descoberta há cerca de quinze anos, cuja versatilidade permite seu emprego em uma variedade enorme de aplicações industriais (Kanatzidis, 1990). Esses materiais podem ser eletrodepositados em superfícies de eletrodos e sua utilização como componentes de sensores está baseada no fato de a absorção de substâncias pelo polímero alterar as propriedades de condução de eletricidade (Gardner & Bartlett, 1995).

Os polipirróis são os polímeros condutores mais indicados para aplicação em sensores, pois eles podem ser eletropolimerizados de soluções aquosas em pH neutro, o que facilita a incorporação de moléculas biológicas sensoras (anticorpos, células ou enzimas) no polímero condutor (Adeloju & Wallace, 1996).

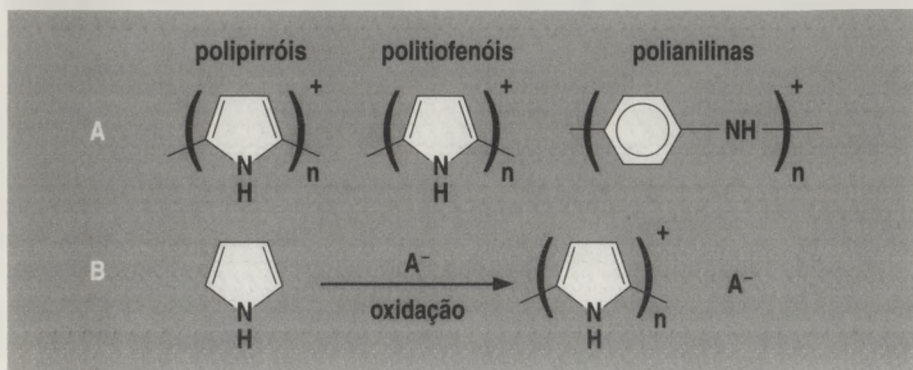


FIGURA 8. Estruturas dos três tipos de materiais comumente utilizados para a produção de polímeros condutores (a) por oxidação de monômeros (b).

## NOVAS TECNOLOGIAS IMUNOLÓGICAS

As novas tecnologias imunológicas, que estão sendo introduzidas no mercado de equipamentos de laboratório e de análises clínicas, têm grande potencial na análise laboratorial de poluentes e poderão reduzir sensivelmente seu custo. Esses equipamentos poderiam ser miniaturizados para produzir sensores portáteis. Na maioria dos casos trata-se de sensores ópticos intrínsecos, onde o sinal é produzido pela interferência da substância com a onda evanescente do feixe de radiação eletromagnética injetado em um condutor óptico. As guias de onda são cristais planos, mais simples de produzir em massa com os altos padrões de qualidade essenciais para aplicações de química analítica do que fibras ópticas cilíndricas (Robinson, 1995).

O sistema IAsys™ da Fisons, com espelhos ressonantes e o sistema BIAcore™, da Pharmacia Biosensor, que explora o efeito de ressonância de plasmon (SPR), estão baseados em princípios físicos similares. Plasmons são ondas de densidade de carga excitáveis por ondas eletromagnéticas, que se propagam em superfícies (Liedberg *et al.*, 1983). Nesses sensores, um feixe de radiação eletromagnética polarizada é injetado num prisma coberto por uma fina camada de metal a um ângulo que causa sua reflexão total (Fig. 9). A onda evanescente produzida no processo atravessa o metal e excita ondas de plasmon na sua superfície, do lado oposto ao prisma, o que causa a diminuição abrupta da intensidade do feixe de luz refletida. Esse processo só ocorre quando o ângulo de reflexão atingir um valor bem definido correspondente ao ângulo de ressonância, que varia segundo as propriedades da superfície propagadora das ondas de

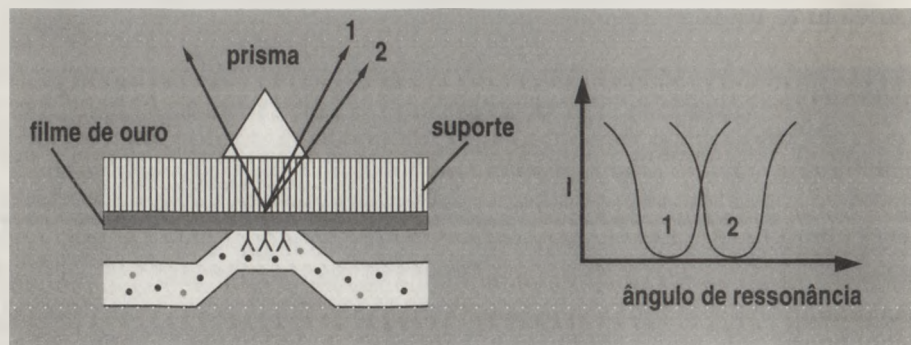


FIGURA 9. Sensor BIAcore™ da Pharmacia Biosensor. O detector mede o ângulo onde a intensidade de radiação do feixe de luz refletido é mínima. A ligação de poluentes aos anticorpos imobilizados na superfície da camada de ouro onde se formam as ondas de plasmon altera o ângulo de ressonância (1 → 2). I: intensidade da radiação eletromagnética do feixe refletido (figura baseada em prospecto da empresa).



plasmon. O equipamento, portanto, mede a alteração do ângulo de ressonância causada pela adsorção de antígenos aos anticorpos imobilizados na superfície do metal.

A construção de uma guia de onda de metal transparente (fosfato de índio, Fig. 10) na superfície de chapas de vidro planas permite realizar sensores de ondas evanescentes. A iluminação dessa guia com um feixe de radiação eletromagnética incidente no ângulo crítico causa o acoplamento total do feixe para dentro da guia onde esse se propagará, produzindo uma onda evanescente utilizada para excitar a fluorescência de anticorpos imobilizados na superfície (Sloper *et al.*, 1990).

O acoplamento entre a guia de onda e o feixe de radiação também pode ser obtido por meio de *grating couplers*. Essas guias ópticas comercializadas pela firma suíça ASI (Bios-I™) contêm uma mistura de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ , cuja superfície gradeada é iluminada por um feixe de raio laser. A guia óptica é mantida em um movimento rotatório contínuo e sensores incorporados à guia de onda medem o ângulo no qual o feixe é inteiramente acoplado para dentro da guia (Fig. 11). Esse ângulo varia, dependendo do tipo e da quantidade de material adsorvido na superfície (Nellen & Lukosz, 1990; Ramsden, 1992).

O fenômeno do acoplamento da onda evanescente com a guia de ondas é explorado de modo inverso no sistema FCFD (*fluorescent capillary fill device*) (Badley *et al.*, 1987). Esse sensor consiste de duas placas de guia de onda planas, separadas por um espaço capilar (Fig. 12). Anticorpos contra a substância a ser medida são imobilizados na superfície da placa sensora. A segunda placa é coberta com uma camada com antígeno (que pode ser uma molécula de poluente) ligado a um cromóforo fluorescente, que se dissolve na amostra, quando esta é sugada para dentro do sensor por forças capilares. Esse antígeno compete com o antígeno contido na amostra pelos anticorpos imobilizados na placa sensora. A iluminação do aparelho com luz de comprimento de onda apro-

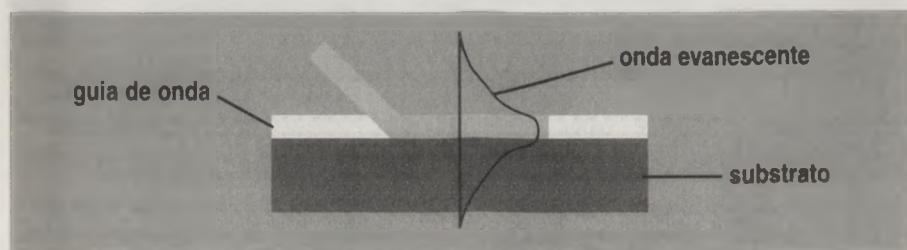


FIGURA 10. Biossensor IASys™, da Fisons Biosensor. A onda evanescente produzida pelo acoplamento de um feixe de luz na guia de onda é utilizada para obter informação sobre a composição química das substâncias localizadas na superfície da guia (Sloper *et al.*, 1990, modificado).

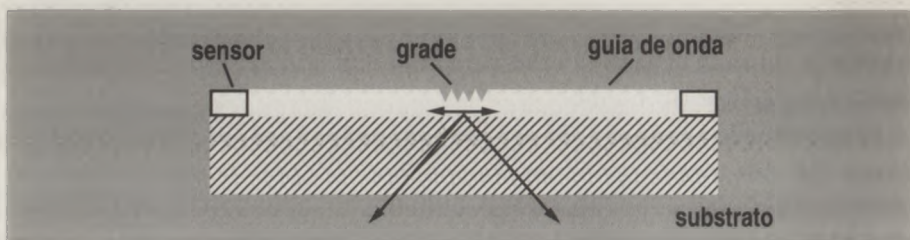


FIGURA 11. Biosensor Bios-I™. O gradeamento da superfície da guia de onda causa o acoplamento total do feixe de luz incidente quando esse impinge em um ângulo crítico. Esse ângulo depende das propriedades do material adsorvido na superfície da grade. A placa sensora é montada numa plataforma oscilatória. Os sensores localizados na extremidade da guia de onda medem a intensidade do feixe acoplado e um dispositivo independente mede o ângulo de acoplamento, cuja variação é proporcional à quantidade de substância adsorvida na grade (Nellen & Lukosz, 1990, modificado).

priado induz fluorescência no antígeno acoplado ao cromóforo. O ângulo de entrada da luz fluorescente na guia de onda depende da posição da molécula fluorescente em relação à superfície do sensor. O ângulo de

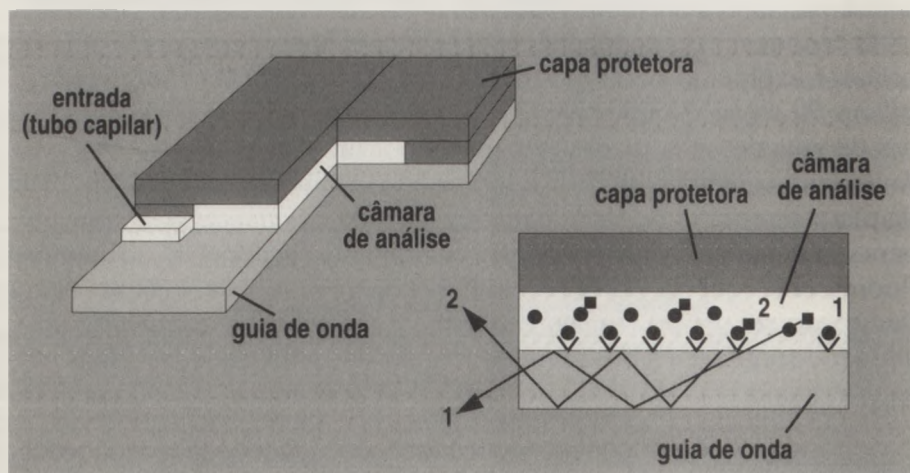


FIGURA 12. Sensor FCFD (*fluorescent capillary fill device*). Anticorpos específicos para o poluente são imobilizados na superfície da guia de onda, enquanto um complexo solúvel no qual o poluente se liga a um cromóforo, é fixado na superfície oposta. O complexo se dissolve na amostra líquida, quando essa é sugada para dentro da câmara de análise por forças capilares. As moléculas da amostra competem com as ligadas ao cromóforo pelos sítios de ligação do anticorpo. Quando a reação está completa, o sensor é iluminado com um feixe de laser para ativar os grupos fluorescentes dos cromóforos. A fluorescência emitida pelos cromóforos em solução penetra na guia de onda em um ângulo diferente da fluorescência produzida pelo material ligado aos anticorpos localizados na superfície da guia. Os feixes desses dois tipos de sinais se propagam por rotas diferentes dentro da guia e podem ser discriminados pela diferença do ângulo de saída (Badley *et al.*, 1987, modificado).

propagação do sinal emitido por substâncias ligadas aos anticorpos imobilizados será diferente daquele oriundo de moléculas em solução. Esses dois feixes de luz deixarão a guia em ângulos diferentes, o que permite sua discriminação e quantificação em separado, utilizando-se o sinal oriundo do líquido como referência interna.

Princípio diferente é utilizado pela empresa BioStar para detectar microrganismos patogênicos (Harbeck *et al.*, 1993). Anticorpos contra o microrganismo-alvo são acoplados à superfície de uma camada de material óptico depositado na superfície de um espelho de silício (Fig. 13). A cor da luz refletida pelo espelho muda de ouro para púrpura, quando a espessura do material depositado aumenta devido à adsorção específica dos microrganismos-alvo aos anticorpos. Essa tecnologia provavelmente não poderá produzir a sensibilidade necessária para detectar poluentes, mas poderá, por certo, ser empregada para análise rápida dos microrganismos de uma área contaminada. O método é essencialmente qualitativo.

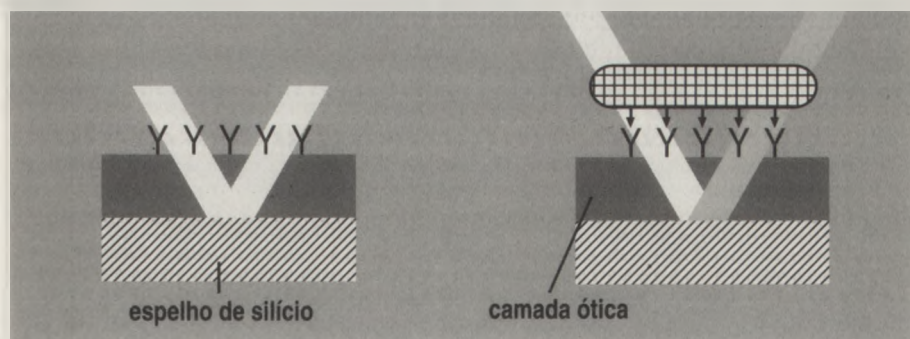


FIGURA 13. Sensor BioStar. A ligação específica do organismo-alvo aos anticorpos localizados na superfície da camada óptica muda a cor do feixe de luz refletido de ouro para púrpura.

## SENSORES BASEADOS EM *REPORTER GENE TECHNOLOGY*

Biossensores baseados na quantificação da reação genética de microrganismos à mudança das condições do meio ambiente representam uma tecnologia alternativa de baixo custo para análise química (Fig. 14). Potencialmente, qualquer substância ou condição ambiental que produza uma resposta genética em um organismo (procarionto ou eucarioto) pode ser medida com esse sensor, onde *reporter genes* são acoplados a promotores ativados pelo poluente ou pelo sinal de interesse. O *reporter gene* codifica a informação genética de uma enzima indicadora, cuja atividade pode ser analisada com alta sensibilidade. O sinal medido é

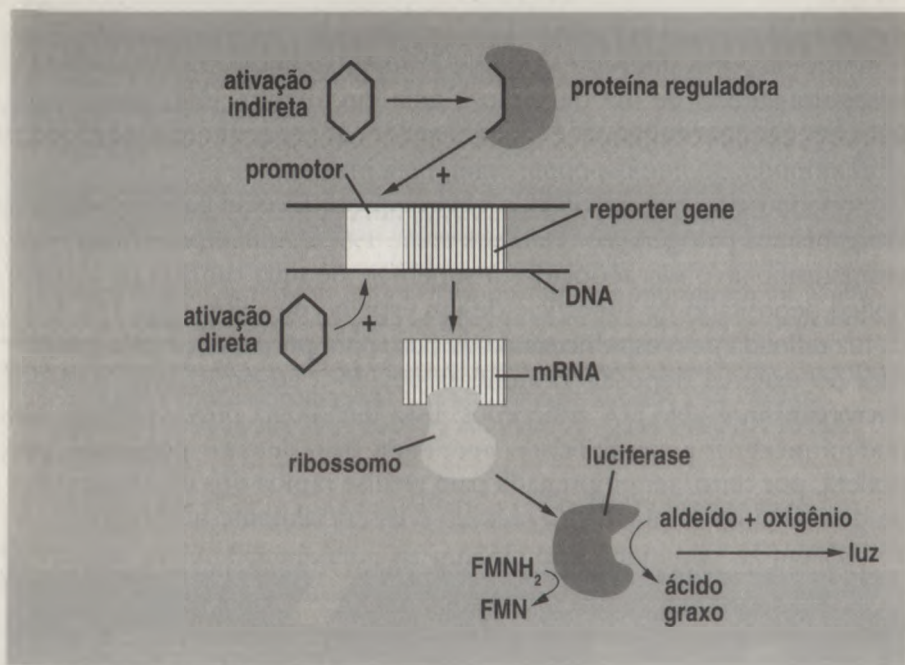


FIGURA 14. Esquema de funcionamento de um sensor de *reporter gene* com luciferase. A DNA que codifica todos os componentes da luciferase é acoplada a um elemento de DNA que funciona como sensor (o promotor). Esse promotor pode ser ativado pela substância-alvo se essa interagir diretamente com a DNA do promotor (via direta) ou por intermédio de uma proteína reguladora (via indireta). Quando ativado o promotor, a informação contida no *reporter gene* é transcrita, produzindo o m-RNA que é acoplado a um ribossomo onde é produzida a proteína codificada pelo *reporter gene*, que é a luciferase. Essa enzima transfere elétrons na forma de FMNH<sub>2</sub> para aldeídos, produzindo ácidos graxos e luz. A quantidade de luz medida com um luminômetro é proporcional ao conteúdo de poluente na amostra.

proporcional à concentração do poluente ou à intensidade do sinal que induz o promotor. A utilização de um mesmo *reporter gene* em todos os sensores construídos por esse procedimento permite medir uma infinidade de parâmetros com o mesmo detector. Vários *reporter genes* foram descritos na literatura científica, mas o sistema mais indicado para aplicações ambientais é a luciferase bacteriana, que emite luz durante a transformação de aldeídos em ácidos graxos (Meighen, 1994). O sistema genético que codifica essa enzima contém a informação para a síntese de uma segunda enzima, a redutase de ácidos graxos, cuja presença permite fechar o ciclo reativo do sistema (Meighen, 1994). Um sensor com os genes de luciferase, por exemplo, somente necessitaria da adição de nutrientes para sua ativação, que podem ser fornecidos como componentes da solução-tampão. Esses sistemas, que funcionam em soluções

aquosas, podem ser utilizados para medir a quantidade de poluentes nas fases líquida, sólida e gasosa (Heitzer *et al.*, 1994).

## FEIXES DE SENSORES

Apesar do considerável avanço no entendimento dos fatores responsáveis pela seletividade das camadas de polímeros utilizadas em sensores não-biológicos (Grate & Abraham, 1991), a maioria dos sensores físico-químicos apresentados nos parágrafos anteriores não permite discriminar os compostos individuais em misturas que contenham substâncias semelhantes. A seletividade desses sistemas pode ser melhorada com o emprego de feixes de sensores, onde cada elemento tem uma característica de resposta distinta. A análise simultânea da amostra com um feixe de sensores e o processamento combinatório dos sinais dos elementos individuais por métodos de inteligência artificial permitem a identificação dos componentes individuais das amostras (Fig. 15). Esses sistemas são comumente denominados de “nariz eletrônico” (White *et al.*, 1996).

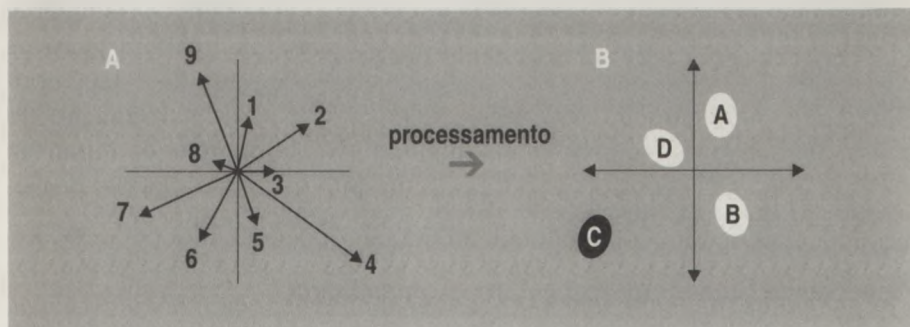


FIGURA 15. Esquema de análise de amostras com feixe de 9 sensores. Cada um desses elementos produz reação distinta à amostra (a). O processamento do conjunto de sinais produzidos pelo feixe por métodos de inteligência artificial permite identificar os componentes individuais da amostra (b).

Nos EUA, uma pesquisa recente conduzida entre profissionais do setor de remediação (Anon, 1996) indicou uma demanda maior de novos sensores para poluentes orgânicos (55%), seguidos de metais (30%), poluentes inorgânicos (10%) e materiais radioativos (5%) nos meios solo (39%), água (29%), ar (23%) e para outras aplicações (9%, principalmente análise de águas residuárias). Uma análise comparativa (Tabela 3) indica que a maioria das tecnologias emergentes é aplicável primariamente à análise de poluentes na fase gasosa, com exceção dos sensores biológicos, que só funcionam em ambientes aquáticos.

TABELA 3. Análise comparativa das várias tecnologias emergentes.

TECNOLOGIA	APLICABILIDADE*			
	ar	água	solo	screening
Fibras ópticas	a	a	n	a
Ondas acústicas	a	n	n	n
Polímeros condutores	a	a	n	a
Kits imunológicos	n	a	n	a
Biossensores imunológicos	n	a	n	a
<i>Reporter genes</i>	n	a	a	a

\*n: não aplicável diretamente, screening: baixo custo/análise

## MONITORAMENTO BIOLÓGICO

O monitoramento microbiológico de áreas contaminadas objetiva avaliar a capacidade de biodegradação da microbiota natural (Heitzer & Sayler, 1993). Esses dados são obtidos tradicionalmente com técnicas que incluem o enriquecimento de culturas de biodegradadores, sua contagem por plaqueamento em meios seletivos ou por determinação do número mais provável (MPN). As análises são demoradas e requerem mão-de-obra especializada. Um monitoramento microbiológico completo deveria fornecer informação sobre os seguintes parâmetros:

### Potencial de Biodegradação na Área Contaminada

Esse potencial é definido pela presença de genes que codificam enzimas capazes de tornar os poluentes menos tóxicos. A informação pode ser obtida diretamente, utilizando-se técnicas de PCR (reação em cadeia de polimerase) ou, em menor grau, indiretamente por metodologias de hibridização *in situ* com sondas genéticas fluorescentes específicas para bactérias portadoras desses genes (FISH, Sayler *et al.*, 1995).

### Potencial Biocatalítico da Área

Esse parâmetro é determinado pela quantidade de enzimas capazes de reagir com o poluente. Maneira indireta de avaliá-lo consiste em conduzir ensaios de biodegradação, usando microcosmos com material obtido do sítio contaminado. Alternativamente, as enzimas poderiam ser extraídas do solo e sua quantidade analisada por ensaios enzimáticos ou por testes

imunológicos específicos. Uma maneira de verificar se uma enzima está sendo produzida no solo pelos microrganismos consiste na extração e análise do mRNA correspondente a essa proteína (Saylor *et al.*, 1995).

### **Taxa de Biodegradação de Poluentes pela Microbiota *in situ***

A opção mais barata de remediação é a detoxificação de uma área contaminada por processos de auto-remediação, o que depende do conhecimento da taxa natural de biodegradação de poluentes e da identificação dos metabólitos produzidos para evitar que um tipo de composto tóxico seja substituído por outro pior. O meio mais simples e mais barato de medir a taxa de degradação natural é a instalação de poços de monitoramento contínuo em pontos críticos da área contaminada. A alternativa de obter os mesmos dados de microcosmos especiais instalados *in situ* é viável para fins de pesquisa (Acton & Barker, 1992), mas não em escala comercial. Nenhuma das tecnologias emergentes de monitoramento químico foi desenvolvida especificamente para detectar metabólitos. Na maior parte dos casos essas substâncias estarão presentes em quantidades muito pequenas e serão mais solúveis do que o material original devido ao seu maior grau de oxidação. Variantes de biossensores de luciferase ou testes imunológicos são as tecnologias de maior potencial para detecção de metabólitos no campo a custos compatíveis com as necessidades do mercado.

Apesar do rápido desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de imunologia na última década, a análise microbiológica ainda está distante de se tornar um componente essencial de estudos comerciais de áreas contaminadas. Os fatores que limitam a maior difusão de estudos microbiológicos são o seu alto custo unitário (entre US\$ 100 e US\$ 500 por amostra) e o fato de a informação crítica para julgar a qualidade de um sítio contaminado ser a quantidade de produtos químicos tóxicos. Análises microbiológicas são mais comuns quando há necessidade de se averiguar a possibilidade de biorremediação de uma área, sendo que nesses casos métodos tradicionais de análise ainda predominam largamente sobre tecnologias emergentes.

## **BARREIRAS PARA A INTRODUÇÃO DE TECNOLOGIAS EMERGENTES NO MERCADO**

A introdução de uma tecnologia emergente no mercado é processo complexo, demorado e de alto risco. No contexto do monitoramento de áreas contaminadas devem-se considerar duas questões importantes:

variantes que podem ser utilizadas em fases líquidas são TSM, STW e SH-APM. Sensores de ondas acústicas no seu estado bruto são sensíveis à adsorção de qualquer material na sua superfície. Para conferir a especificidade química necessária a aplicações de monitoramento, a superfície dos cristais é coberta com um filme polimérico seletivo para a molécula a ser analisada (Grate & Abraham, 1991; Grate *et al.*, 1996). Nesses casos, as mudanças da frequência de oscilação, causadas pela absorção do poluente pelo polímero, não serão devidas unicamente ao aumento da massa adsorvida na superfície do cristal, mas também devido à alteração das propriedades de propagação da onda de som pelo interior do polímero, o que se manifesta numa alteração do módulo da onda (Fig. 6). Esse segundo efeito influencia a intensidade do sinal mais do que a mudança da massa adsorvida na superfície do sensor. A detecção de poluentes é rápida e reversível.

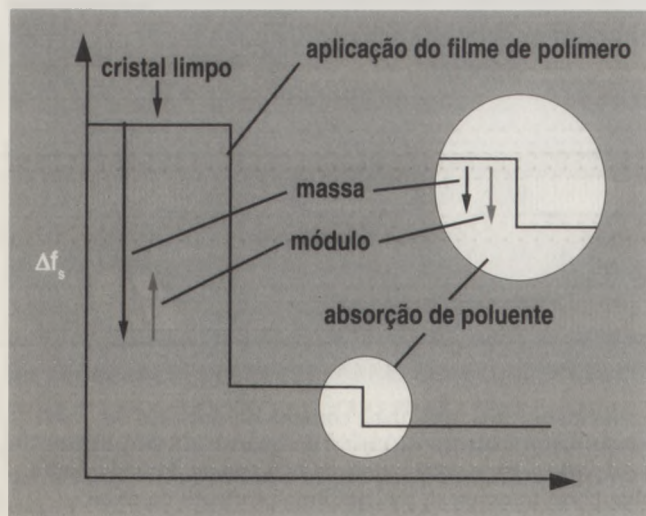


FIGURA 6. Mecanismo de detecção de poluentes em sensores de ondas acústicas com filmes de polímeros. A aplicação do filme de polímero altera a frequência de oscilação do cristal muito mais do que a absorção de moléculas do poluente pelo polímero. Esse segundo processo modifica significativamente as propriedades de propagação de ondas acústicas do polímero, o que se manifesta na mudança do módulo da onda acústica.  $\Delta f_s$ : variação de frequência de oscilação (Grate *et al.*, 1993b, modificado).

Um sistema completo contém dois sensores (um de referência e outro para análise da amostra, Fig. 7), um oscilador eletrônico para ativar o sistema e interfaces eletrônicas digitais para medir a intensidade do sinal, controlar as funções do equipamento e formar a interface com o usuário.



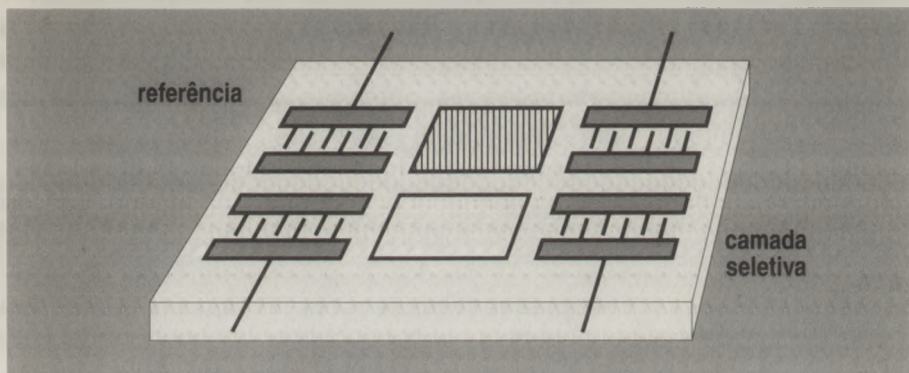


FIGURA 7. Configuração típica de sensores de ondas acústicas. O circuito de referência é montado em paralelo ao sensor de poluentes.

### POLÍMEROS CONDUTORES

Polímeros condutores (Fig. 8) são uma classe de materiais orgânicos (polipirróis, politiofenóis e polianilinas) descoberta há cerca de quinze anos, cuja versatilidade permite seu emprego em uma variedade enorme de aplicações industriais (Kanatzidis, 1990). Esses materiais podem ser eletrodepositados em superfícies de eletrodos e sua utilização como componentes de sensores está baseada no fato de a absorção de substâncias pelo polímero alterar as propriedades de condução de eletricidade (Gardner & Bartlett, 1995).

Os polipirróis são os polímeros condutores mais indicados para aplicação em sensores, pois eles podem ser eletropolimerizados de soluções aquosas em pH neutro, o que facilita a incorporação de moléculas biológicas sensoras (anticorpos, células ou enzimas) no polímero condutor (Adeloju & Wallace, 1996).

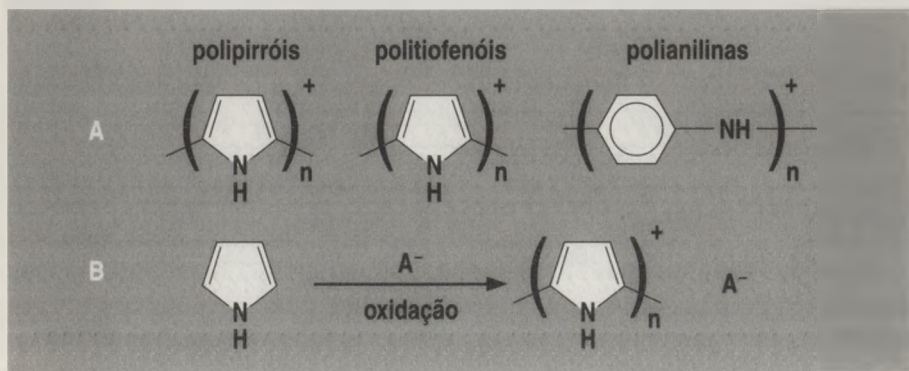


FIGURA 8. Estruturas dos três tipos de materiais comumente utilizados para a produção de polímeros condutores (a) por oxidação de monômeros (b).

## NOVAS TECNOLOGIAS IMUNOLÓGICAS

As novas tecnologias imunológicas, que estão sendo introduzidas no mercado de equipamentos de laboratório e de análises clínicas, têm grande potencial na análise laboratorial de poluentes e poderão reduzir sensivelmente seu custo. Esses equipamentos poderiam ser miniaturizados para produzir sensores portáteis. Na maioria dos casos trata-se de sensores ópticos intrínsecos, onde o sinal é produzido pela interferência da substância com a onda evanescente do feixe de radiação eletromagnética injetado em um condutor óptico. As guias de onda são cristais planos, mais simples de produzir em massa com os altos padrões de qualidade essenciais para aplicações de química analítica do que fibras ópticas cilíndricas (Robinson, 1995).

O sistema IAsys<sup>TM</sup> da Fisons, com espelhos ressonantes e o sistema BIACore<sup>TM</sup>, da Pharmacia Biosensor, que explora o efeito de ressonância de plasmon (SPR), estão baseados em princípios físicos similares. Plasmons são ondas de densidade de carga excitáveis por ondas eletromagnéticas, que se propagam em superfícies (Liedberg *et al.*, 1983). Nesses sensores, um feixe de radiação eletromagnética polarizada é injetado num prisma coberto por uma fina camada de metal a um ângulo que causa sua reflexão total (Fig. 9). A onda evanescente produzida no processo atravessa o metal e excita ondas de plasmon na sua superfície, do lado oposto ao prisma, o que causa a diminuição abrupta da intensidade do feixe de luz refletida. Esse processo só ocorre quando o ângulo de reflexão atingir um valor bem definido correspondente ao ângulo de ressonância, que varia segundo as propriedades da superfície propagadora das ondas de

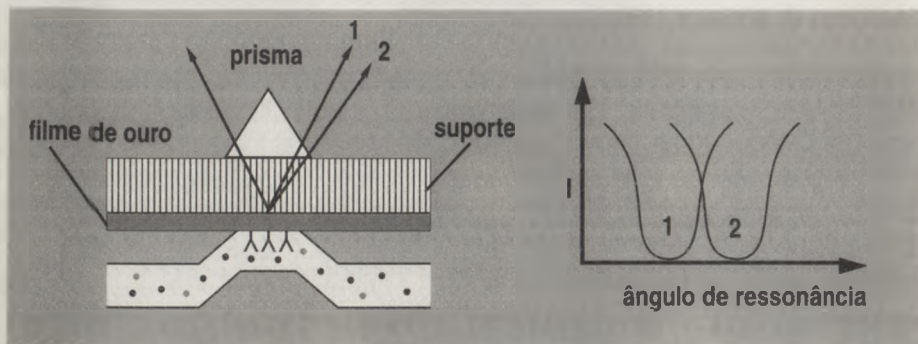


FIGURA 9. Sensor BIACore<sup>TM</sup> da Pharmacia Biosensor. O detector mede o ângulo onde a intensidade de radiação do feixe de luz refletido é mínima. A ligação de poluentes aos anticorpos imobilizados na superfície da camada de ouro onde se formam as ondas de plasmon altera o ângulo de ressonância (1 → 2). I: intensidade da radiação eletromagnética do feixe refletido (figura baseada em prospecto da empresa).

plasmon. O equipamento, portanto, mede a alteração do ângulo de ressonância causada pela adsorção de antígenos aos anticorpos imobilizados na superfície do metal.

A construção de uma guia de onda de metal transparente (fosfato de índio, Fig. 10) na superfície de chapas de vidro planas permite realizar sensores de ondas evanescentes. A iluminação dessa guia com um feixe de radiação eletromagnética incidente no ângulo crítico causa o acoplamento total do feixe para dentro da guia onde esse se propagará, produzindo uma onda evanescente utilizada para excitar a fluorescência de anticorpos imobilizados na superfície (Sloper *et al.*, 1990).

O acoplamento entre a guia de onda e o feixe de radiação também pode ser obtido por meio de *grating couplers*. Essas guias ópticas comercializadas pela firma suíça ASI (Bios-I™) contêm uma mistura de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ , cuja superfície gradeada é iluminada por um feixe de raio laser. A guia óptica é mantida em um movimento rotatório contínuo e sensores incorporados à guia de onda medem o ângulo no qual o feixe é inteiramente acoplado para dentro da guia (Fig. 11). Esse ângulo varia, dependendo do tipo e da quantidade de material adsorvido na superfície (Nellen & Lukosz, 1990; Ramsden, 1992).

O fenômeno do acoplamento da onda evanescente com a guia de ondas é explorado de modo inverso no sistema FCFD (*fluorescent capillary fill device*) (Badley *et al.*, 1987). Esse sensor consiste de duas placas de guia de onda planas, separadas por um espaço capilar (Fig. 12). Anticorpos contra a substância a ser medida são imobilizados na superfície da placa sensora. A segunda placa é coberta com uma camada com antígeno (que pode ser uma molécula de poluente) ligado a um cromóforo fluorescente, que se dissolve na amostra, quando esta é sugada para dentro do sensor por forças capilares. Esse antígeno compete com o antígeno contido na amostra pelos anticorpos imobilizados na placa sensora. A iluminação do aparelho com luz de comprimento de onda apro-

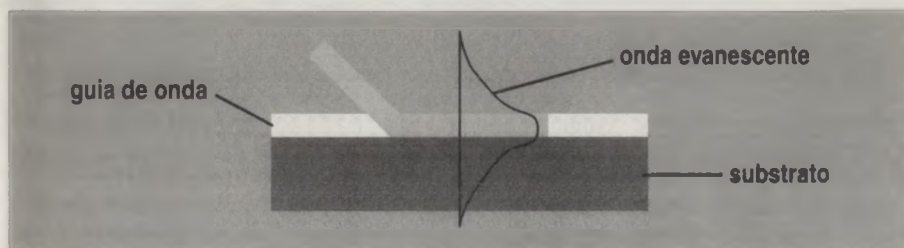


FIGURA 10. Biossensor IASys™, da Fisons Biosensor. A onda evanescente produzida pelo acoplamento de um feixe de luz na guia de onda é utilizada para obter informação sobre a composição química das substâncias localizadas na superfície da guia (Sloper *et al.*, 1990, modificado).

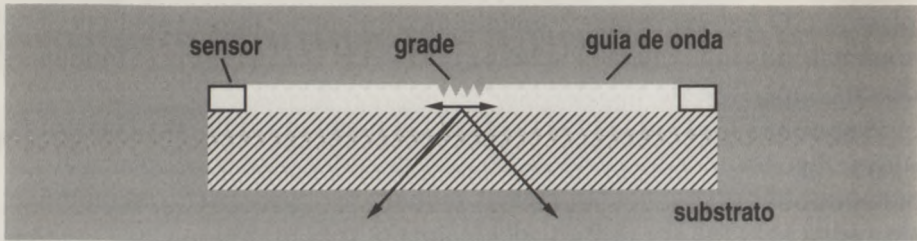


FIGURA 11. Biosensor Bios-I™. O gradeamento da superfície da guia de onda causa o acoplamento total do feixe de luz incidente quando esse impinge em um ângulo crítico. Esse ângulo depende das propriedades do material adsorvido na superfície da grade. A placa sensora é montada numa plataforma oscilatória. Os sensores localizados na extremidade da guia de onda medem a intensidade do feixe acoplado e um dispositivo independente mede o ângulo de acoplamento, cuja variação é proporcional à quantidade de substância adsorvida na grade (Nellen & Lukosz, 1990, modificado).

prado induz fluorescência no antígeno acoplado ao cromóforo. O ângulo de entrada da luz fluorescente na guia de onda depende da posição da molécula fluorescente em relação à superfície do sensor. O ângulo de

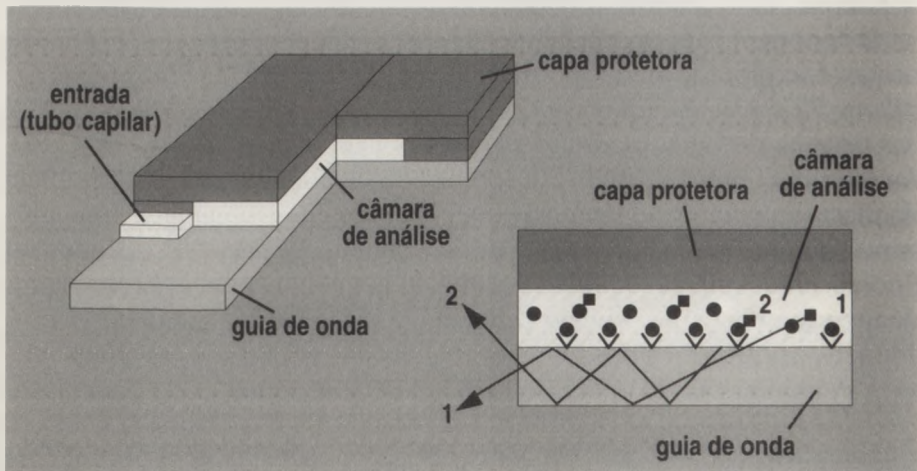


FIGURA 12. Sensor FCFD (*fluorescent capillary fill device*). Anticorpos específicos para o poluente são imobilizados na superfície da guia de onda, enquanto um complexo solúvel no qual o poluente se liga a um cromóforo, é fixado na superfície oposta. O complexo se dissolve na amostra líquida, quando essa é sugada para dentro da câmara de análise por forças capilares. As moléculas da amostra competem com as ligadas ao cromóforo pelos sítios de ligação do anticorpo. Quando a reação está completa, o sensor é iluminado com um feixe de laser para ativar os grupos fluorescentes dos cromóforos. A fluorescência emitida pelos cromóforos em solução penetra na guia de onda em um ângulo diferente da fluorescência produzida pelo material ligado aos anticorpos localizados na superfície da guia. Os feixes desses dois tipos de sinais se propagam por rotas diferentes dentro da guia e podem ser discriminados pela diferença do ângulo de saída (Badley *et al.*, 1987, modificado).

propagação do sinal emitido por substâncias ligadas aos anticorpos imobilizados será diferente daquele oriundo de moléculas em solução. Esses dois feixes de luz deixarão a guia em ângulos diferentes, o que permite sua discriminação e quantificação em separado, utilizando-se o sinal oriundo do líquido como referência interna.

Princípio diferente é utilizado pela empresa BioStar para detectar microrganismos patogênicos (Harbeck *et al.*, 1993). Anticorpos contra o microrganismo-alvo são acoplados à superfície de uma camada de material óptico depositado na superfície de um espelho de silício (Fig. 13). A cor da luz refletida pelo espelho muda de ouro para púrpura, quando a espessura do material depositado aumenta devido à adsorção específica dos microrganismos-alvo aos anticorpos. Essa tecnologia provavelmente não poderá produzir a sensibilidade necessária para detectar poluentes, mas poderá, por certo, ser empregada para análise rápida dos microrganismos de uma área contaminada. O método é essencialmente qualitativo.

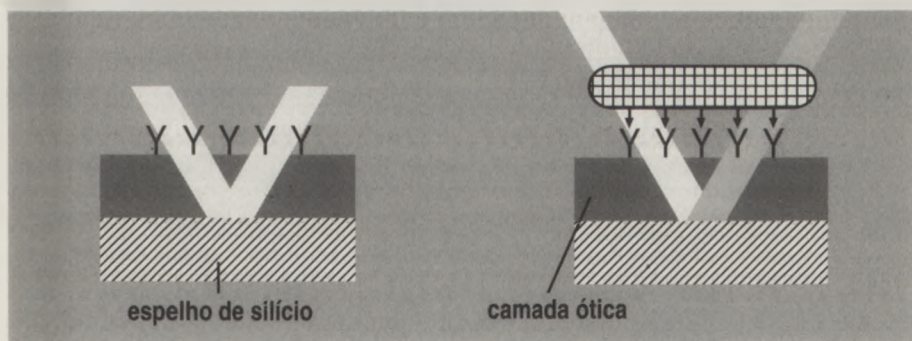


FIGURA 13. Sensor BioStar. A ligação específica do organismo-alvo aos anticorpos localizados na superfície da camada óptica muda a cor do feixe de luz refletido de ouro para púrpura.

## SENSORES BASEADOS EM REPORTER GENE TECHNOLOGY

Biossensores baseados na quantificação da reação genética de microrganismos à mudança das condições do meio ambiente representam uma tecnologia alternativa de baixo custo para análise química (Fig. 14). Potencialmente, qualquer substância ou condição ambiental que produza uma resposta genética em um organismo (procarioto ou eucarioto) pode ser medida com esse sensor, onde *reporter genes* são acoplados a promotores ativados pelo poluente ou pelo sinal de interesse. O *reporter gene* codifica a informação genética de uma enzima indicadora, cuja atividade pode ser analisada com alta sensibilidade. O sinal medido é

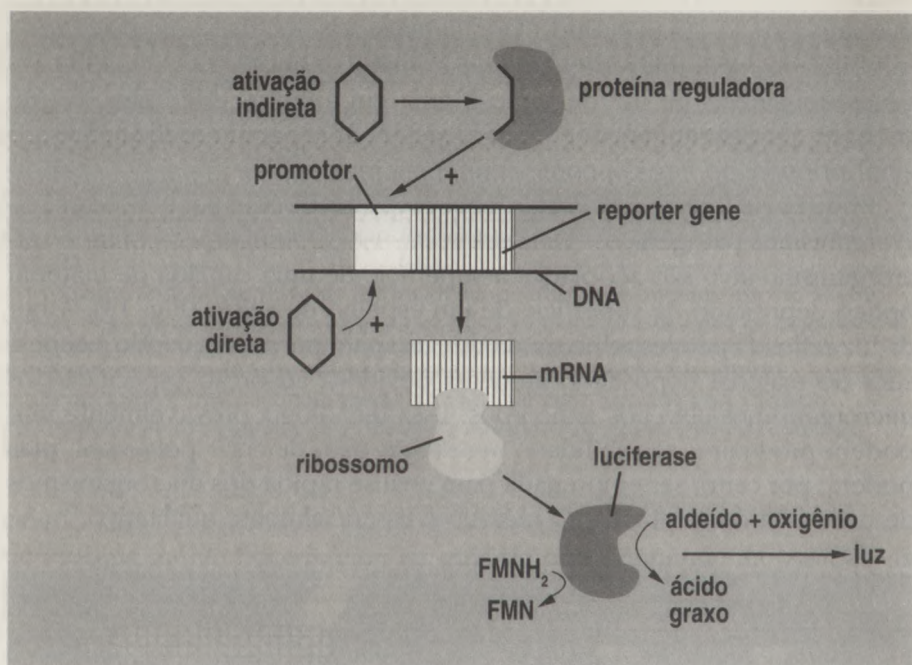


FIGURA 14. Esquema de funcionamento de um sensor de *reporter gene* com luciferase. A DNA que codifica todos os componentes da luciferase é acoplada a um elemento de DNA que funciona como sensor (o promotor). Esse promotor pode ser ativado pela substância-alvo se essa interagir diretamente com a DNA do promotor (via direta) ou por intermédio de uma proteína reguladora (via indireta). Quando ativado o promotor, a informação contida no *reporter gene* é transcrita, produzindo o m-RNA que é acoplado a um ribossomo onde é produzida a proteína codificada pelo *reporter gene*, que é a luciferase. Essa enzima transfere elétrons na forma de FMNH<sub>2</sub> para aldeídos, produzindo ácidos graxos e luz. A quantidade de luz medida com um luminômetro é proporcional ao conteúdo de poluente na amostra.

proporcional à concentração do poluente ou à intensidade do sinal que induz o promotor. A utilização de um mesmo *reporter gene* em todos os sensores construídos por esse procedimento permite medir uma infinidade de parâmetros com o mesmo detector. Vários *reporter genes* foram descritos na literatura científica, mas o sistema mais indicado para aplicações ambientais é a luciferase bacteriana, que emite luz durante a transformação de aldeídos em ácidos graxos (Meighen, 1994). O sistema genético que codifica essa enzima contém a informação para a síntese de uma segunda enzima, a redutase de ácidos graxos, cuja presença permite fechar o ciclo reativo do sistema (Meighen, 1994). Um sensor com os genes de luciferase, por exemplo, somente necessitaria da adição de nutrientes para sua ativação, que podem ser fornecidos como componentes da solução-tampão. Esses sistemas, que funcionam em soluções

aquosas, podem ser utilizados para medir a quantidade de poluentes nas fases líquida, sólida e gasosa (Heitzer *et al.*, 1994).

## FEIXES DE SENSORES

Apesar do considerável avanço no entendimento dos fatores responsáveis pela seletividade das camadas de polímeros utilizadas em sensores não-biológicos (Grate & Abraham, 1991), a maioria dos sensores físico-químicos apresentados nos parágrafos anteriores não permite discriminar os compostos individuais em misturas que contenham substâncias semelhantes. A seletividade desses sistemas pode ser melhorada com o emprego de feixes de sensores, onde cada elemento tem uma característica de resposta distinta. A análise simultânea da amostra com um feixe de sensores e o processamento combinatório dos sinais dos elementos individuais por métodos de inteligência artificial permitem a identificação dos componentes individuais das amostras (Fig. 15). Esses sistemas são comumente denominados de “nariz eletrônico” (White *et al.*, 1996).

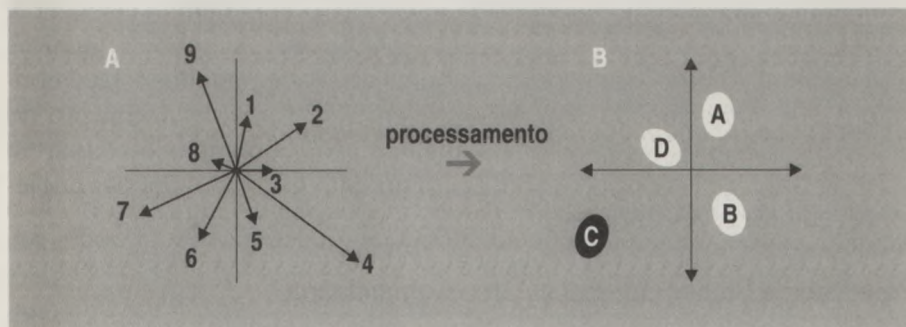


FIGURA 15. Esquema de análise de amostras com feixe de 9 sensores. Cada um desses elementos produz reação distinta à amostra (a). O processamento do conjunto de sinais produzidos pelo feixe por métodos de inteligência artificial permite identificar os componentes individuais da amostra (b).

Nos EUA, uma pesquisa recente conduzida entre profissionais do setor de remediação (Anon, 1996) indicou uma demanda maior de novos sensores para poluentes orgânicos (55%), seguidos de metais (30%), poluentes inorgânicos (10%) e materiais radioativos (5%) nos meios solo (39%), água (29%), ar (23%) e para outras aplicações (9%, principalmente análise de águas residuárias). Uma análise comparativa (Tabela 3) indica que a maioria das tecnologias emergentes é aplicável primariamente à análise de poluentes na fase gasosa, com exceção dos sensores biológicos, que só funcionam em ambientes aquáticos.

TABELA 3. Análise comparativa das várias tecnologias emergentes.

TECNOLOGIA	APLICABILIDADE*			
	ar	água	solo	screening
Fibras ópticas	a	a	n	a
Ondas acústicas	a	n	n	n
Polímeros condutores	a	a	n	a
Kits imunológicos	n	a	n	a
Biossensores imunológicos	n	a	n	a
<i>Reporter genes</i>	n	a	a	a

\* n: não aplicável diretamente, screening: baixo custo/análise

## MONITORAMENTO BIOLÓGICO

O monitoramento microbiológico de áreas contaminadas objetiva avaliar a capacidade de biodegradação da microbiota natural (Heitzer & Saylor, 1993). Esses dados são obtidos tradicionalmente com técnicas que incluem o enriquecimento de culturas de biodegradadores, sua contagem por plaqueamento em meios seletivos ou por determinação do número mais provável (MPN). As análises são demoradas e requerem mão-de-obra especializada. Um monitoramento microbiológico completo deveria fornecer informação sobre os seguintes parâmetros:

### Potencial de Biodegradação na Área Contaminada

Esse potencial é definido pela presença de genes que codificam enzimas capazes de tornar os poluentes menos tóxicos. A informação pode ser obtida diretamente, utilizando-se técnicas de PCR (reação em cadeia de polimerase) ou, em menor grau, indiretamente por metodologias de hibridização *in situ* com sondas genéticas fluorescentes específicas para bactérias portadoras desses genes (FISH, Saylor *et al.*, 1995).

### Potencial Biocatalítico da Área

Esse parâmetro é determinado pela quantidade de enzimas capazes de reagir com o poluente. Maneira indireta de avaliá-lo consiste em conduzir ensaios de biodegradação, usando microcosmos com material obtido do sítio contaminado. Alternativamente, as enzimas poderiam ser extraídas do solo e sua quantidade analisada por ensaios enzimáticos ou por testes



imunológicos específicos. Uma maneira de verificar se uma enzima está sendo produzida no solo pelos microrganismos consiste na extração e análise do mRNA correspondente a essa proteína (Sayler *et al.*, 1995).

### **Taxa de Biodegradação de Poluentes pela Microbiota *in situ***

A opção mais barata de remediação é a detoxificação de uma área contaminada por processos de auto-remediação, o que depende do conhecimento da taxa natural de biodegradação de poluentes e da identificação dos metabólitos produzidos para evitar que um tipo de composto tóxico seja substituído por outro pior. O meio mais simples e mais barato de medir a taxa de degradação natural é a instalação de poços de monitoramento contínuo em pontos críticos da área contaminada. A alternativa de obter os mesmos dados de microcosmos especiais instalados *in situ* é viável para fins de pesquisa (Acton & Barker, 1992), mas não em escala comercial. Nenhuma das tecnologias emergentes de monitoramento químico foi desenvolvida especificamente para detectar metabólitos. Na maior parte dos casos essas substâncias estarão presentes em quantidades muito pequenas e serão mais solúveis do que o material original devido ao seu maior grau de oxidação. Variantes de biossensores de luciferase ou testes imunológicos são as tecnologias de maior potencial para detecção de metabólitos no campo a custos compatíveis com as necessidades do mercado.

Apesar do rápido desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de imunologia na última década, a análise microbiológica ainda está distante de se tornar um componente essencial de estudos comerciais de áreas contaminadas. Os fatores que limitam a maior difusão de estudos microbiológicos são o seu alto custo unitário (entre US\$ 100 e US\$ 500 por amostra) e o fato de a informação crítica para julgar a qualidade de um sítio contaminado ser a quantidade de produtos químicos tóxicos. Análises microbiológicas são mais comuns quando há necessidade de se averiguar a possibilidade de biorremediação de uma área, sendo que nesses casos métodos tradicionais de análise ainda predominam largamente sobre tecnologias emergentes.

## **BARREIRAS PARA A INTRODUÇÃO DE TECNOLOGIAS EMERGENTES NO MERCADO**

A introdução de uma tecnologia emergente no mercado é processo complexo, demorado e de alto risco. No contexto do monitoramento de áreas contaminadas devem-se considerar duas questões importantes:

- a) quais são as barreiras enfrentadas pelas novas tecnologias?  
b) como essas novas tecnologias contribuirão para reduzir os custos de monitoramento?

Considerações econômicas à parte, um fator de importância fundamental que dificulta a disseminação de novas tecnologias para o monitoramento de áreas contaminadas é sua aceitação pelos profissionais da área, habituados a lidar com técnicas tradicionais de análise laboratorial, como cromatografia gasosa ou HPLC. Não é fácil convencê-los de que as novas tecnologias são equivalentes às tecnologias tradicionais. São necessários estudos comparativos de alto nível conduzidos em laboratórios distintos com amostras representativas dos diversos tipos de matrizes a serem analisadas. São estudos caros e, muitas vezes, as companhias que fabricam e comercializam os sensores não têm a capacidade financeira de bancá-los. O financiamento governamental poderia viabilizar esses estudos em universidades ou outras instituições de pesquisa independentes. Representantes de autoridades ambientais e da indústria deveriam ser incluídos nos comitês assessores. Esses assegurariam que a maior variedade possível de situações relevantes para a prática fosse testada. Seria também recomendável publicar os dados em revistas especializadas, nas quais os artigos são sujeitos à revisão crítica por especialistas.

As regulamentações dos órgãos de controle ambiental que prescrevem determinadas metodologias e a falta de endosso por parte das autoridades representam uma barreira adicional considerável à disseminação de tecnologias alternativas. A atitude conservadora é necessária para viabilizar a implementação de normas, mas pode também dificultar sua adoção pela sociedade, se não permitir, por exemplo, uma redução dos custos de *compliance* pela substituição de uma metodologia tradicional cara por um procedimento novo, mais barato. A substituição somente será viável se o método novo produzir resultados equivalentes ou melhores do que o tradicional com o mesmo grau de confiabilidade. Uma maneira de facilitar a adoção de novas tecnologias pelas autoridades ambientais sem prejudicar sua capacidade de impor e controlar a aplicação de normas seria a homologação das novas tecnologias por etapas. O processo se iniciaria com a regulamentação de seu uso para *screening* seguido da aplicação para monitoramento contínuo. A homologação como método-padrão de análise dependeria da avaliação crítica dos resultados obtidos durante vários anos de uso por muitos operadores diferentes. O procedimento permitiria testar a confiabilidade da nova tecnologia sem comprometer as normas, pois os métodos tradicionais continuariam a ser utilizados paralelamente à metodologia inovadora.

É difícil estimar o impacto das tecnologias emergentes aqui descritas, no custo de monitoramento químico de áreas contaminadas. O lança-

mento no mercado de um novo sistema de detecção de poluentes que esteja em competição direta com tecnologias estabelecidas só é viável se permitir uma considerável redução do custo de análise (60% no mínimo). A alternativa é de direcionar a aplicação da nova tecnologia para um nicho que ainda não é servido por outras técnicas, como por exemplo o monitoramento *in situ* de poluentes. Nesse caso, o preço unitário poderá ser maior. O mercado de análise química para caracterização e monitoramento de áreas contaminadas, porém, apresenta várias características que dificultam atingir as economias de escala necessárias para reduzir significativamente o custo de sensores.

- A variedade de substâncias a ser analisada é muito grande. É praticamente impossível desenvolver um sensor que possa medir todos os compostos com um mesmo princípio de detecção, com exceção, talvez, de testes imunológicos ou de biossensores baseados em *reporter genes*.

- O mercado é muito fragmentado no que se refere às matrizes de poluentes. A maioria das tecnologias emergentes está sendo direcionada para a análise de poluentes na fase gasosa, mas o que interessa mesmo é a concentração da substância na água ou no solo. Um sensor que tenha bom desempenho em meio gasoso, como por exemplo os sistemas de ondas acústicas de superfície, talvez não funcione em meio líquido.

- O setor é dominado por pequenos e médios fabricantes sem a capacidade financeira para atender o mercado em escala mundial e assim obter as economias de escala necessárias para reduzir o custo unitário do produto (Middelhoek, 1994). Grande parte das tecnologias emergentes foi desenvolvida em laboratórios de universidades ou em centros de pesquisa governamentais, onde iniciativas de projetos são norteadas mais pelo anseio de produzir inovação tecnológica (*technology push*) do que de satisfazer uma necessidade de mercado (*market pull*, Collins, 1992).

O impacto das tecnologias emergentes nos custos de monitoramento pode ser estimado para os diferentes setores de aplicação da seguinte maneira:

### **Screening**

As tecnologias que provavelmente terão impacto significativo nessa área são os testes imunológicos, biossensores baseados em *reporter gene technology* e sensores de polímeros condutores. O mercado de testes imunológicos está se expandindo rapidamente. A concorrência entre os fabricantes, economias de escala e novas tecnologias de produção de anticorpos poderão reduzir os custos significativamente no futuro. Biossensores bacterianos ou sensores de polímeros condutores poderiam competir economicamente com esses sistemas.

### Determinação de poluentes *in situ*

As tecnologias mais indicadas para essa aplicação são sensores de fibras ópticas, sistemas miniaturizados de cromatografia gasosa ou feixes de sensores. A maior parte desses sistemas terá um componente externo com os sistemas eletrônicos para medir e interpretar o sinal do sensor acoplado a uma ou várias sondas, que são introduzidas em poços de observação. Uma unidade que controle várias sondas simultaneamente custará por volta de US\$ 5,000, enquanto o preço das sondas individuais ficará entre US\$ 500 e US\$ 2,000.

### Análise de poluentes em laboratórios

Os testes imunológicos mais aprimorados permitem detectar poluentes com especificidade absoluta diretamente em amostras aquosas e com sensibilidade melhor do que a dos sensores comumente utilizados em cromatografia gasosa. Sistemas emergentes baseados em tecnologias ópticas, discutidos na seção "Novas tecnologias imunológicas", estão sendo introduzidos paulatinamente no mercado de análises clínicas. A adaptação desses sistemas para análise de poluentes poderia simplificar muito a detecção e quantificação das substâncias em laboratórios, o que poderia contribuir para uma redução significativa do custo de análise laboratorial.

## CONCLUSÃO

Novas tecnologias para medir a concentração de poluentes *in situ* e/ou efetuar *screening* de amostras no campo a custo relativamente baixo estão sendo introduzidas no mercado. A capacidade desses sistemas de acompanhar a redução da concentração de poluentes e o consumo de insumos em processos de remediação praticamente em tempo real viabiliza a implementação de estratégias de controle de processo adaptadas às condições específicas de cada local contaminado. Isso poderá reduzir significativamente o custo de recuperação de áreas contaminadas.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, D.W.; BARKER, J.F. *In situ* biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. **Journal of Contaminant Hydrology**. v. 9, p.325-352, 1992.
- ADELOJU, S.B.; WALLACE, G.G. Conducting polymers and the bioanalytical sciences: new tools for biomolecular communications. **The Analyst**. v. 121, p.699-703, 1996.
- ANON. **Market of study to determine needs and present usage of chemical sensor systems for environmental analytical applications** Ames: Iowa State University, Department of Energy, Ames Laboratory, 1996.

- BADLEY, R.A.; DRAKE, R.A.L.; SHANKS, I.A.; SMITH, A.M.; TEPHENSON, P.R. Optical biosensors for immunoassays: the fluorescence capillary-fill device. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. Series B, v.316, p.143-160, 1987.
- BARBER, T.E.; FISCHER, W.G.; WACHTER, E.A. On-line monitoring of aromatic hydrocarbons using a near-ultraviolet fiber-optic absorption sensor. **Environmental Science and Technology**, v.29, p.1576-1580, 1995.
- BARNARD, S.M.; WALT, D.R. Fiber-optic organic vapor sensor. **Environmental Science and Technology**, v.25, p.1301-1304, 1991.
- BROWNE, C.A.; TARRANT, D.H.; OLTENAU, M.S.; MULLENS, J.W.; CHRONISTER, E.L. Intrinsic sol-gel clad fiber-optic sensors with time-resolved detection. **Analytical Chemistry**, v.68, p.2289-2295, 1996.
- COLLINS, A.J. Problems associated with bringing a sensor technology to the market place. **Sensors and Actuators**. Series A, v.31, p.77-80, 1992.
- DRISCOLL, J.N.; LALIBERTE, R.; WOOD, C. **Field detection of lead in paint and soil by high-resolution XRF**. s.l.: American Laboratory, 1995. p.34H-34M.
- GARDNER, J.W.; BARTLETT, P.N. Application of conducting polymer technology in microsystems. **Sensors and Actuators**. Series A, v.51, p.57-66, 1995.
- GERLACH, C.L. New instrument brings PAH analysis to the field. **Environmental Science and Technology**, v.30, p.252-254, 1996.
- GÖPEL, W. New materials and transducers for chemical sensors. **Sensors and Actuators**. Series B, v.18-19, p.1-21, 1994.
- GRATE, J.W.; ABRAHAM, M.H. Solubility interactions and the design of chemically selective sorbent coatings for chemical sensors and arrays. **Sensors and Actuators**. Series B, v.3, p.85-111, 1991.
- GRATE, J.W.; MARRTIN, S.J.; WHITE, R.M. Acoustic wave microsensors. Part II. **Analytical Chemistry**, v.65, p.987A-996A, 1993.
- GRATE, J.W.; MARRTIN, S.J.; WHITE, R.M. Acoustic wave microsensors. Part I. **Analytical Chemistry**, v.65, p.940A-948A, 1993a.
- GRATE, J.W.; PATRASH, S.J.; ABRAHAM, M.H.; DU, C.M. Selective vapor sorption by polymers and cavitants on acoustic wave sensors: is this molecular recognition? **Analytical Chemistry**, v.68, p.913-917, 1996.
- HARBECK, R.J.; TEAGUE, J.; CROSSEN, G.R.; MAUL, D.M.; CHILDERS, P.L. Novel, rapid optical immunoassay technique for detection of group A Streptococci from pharyngeal specimens: comparison with standard culture methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.839-844, 1993.
- HEITZER, A.; SAYLER, G.S. Monitoring the efficacy of bioremediation. **TIBTECH**, v.11, p.334-343, 1993.
- HEITZER, A.; MALACHOWSKY, K.; THONNARD, J.E.; BIENKOWSKI, P.R.; WHITE, D.C.; SAYLER, G.S. Optical biosensor for environmental on-line measurement of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1487-1494, 1994.
- KANATZIDIS, M.G.; NYLANDER, C.E.; LUNDSTRÖM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensors and Actuators**, v.4, p.299-304, 1983.
- MEIGHEN, E.A. Genetics of bacterial bioluminescence. **Annual Review of Genetics**, v.28, p.117-139, 1994.
- MEULENBERG, E.P.; MULDER, W.H.; STOKS, P.G. Immunoassays for pesticides. **Environmental Science and Technology**, v.29, p.553-561, 1995.
- MIDDLEHOEK, S. Quo vadis silicon sensors? **Sensors and Actuators**. Series A, v.41-42, p.1-8, 1994.
- MOORE, E.L.; DE PAULA, R.P. Optical fibers and integrated optics. In: GÖPEL, HESSE, J.; ZEMEL, J.N., ed. **Sensors: a comprehensive survey** Weinheim: VCH, 1989. v.1, p.217-245.
- NELLEN, P.M.; LUKOSZ, W. Integrated optical input grating couplers as chemo and immunosensors. **Sensors and Actuators**. Series B, v.1, p.592-596, 1990.

- RAMSDEN, J.J. Observation of anomalous diffusion of proteins near surfaces. **Journal of Physical Chemistry**, v.96, p.3388-3391, 1992.
- ROBINSON, G. The commercial development of planar optical sensors. **Sensors and Actuators. Series B**, v.29, p.31-36, 1995.
- SAYLER, G.S.; LAYTON, A.; LAJOIE, C.; BOWMAN, J.; TSCHANTZ, M.; FLEMING, J.T. Molecular site assessment and process monitoring in bioremediation and natural attenuation. **Applied Biotechnology**, v.54, p.277-290, 1995.
- SCHADE, W.; BUBLITZ, J. On-site laser probe for the detection of petroleum products in water and soil. **Environmental Science and Technology**, v.30, p.1451, 1458, 1996.
- SEITZ, W.R. Chemical sensors based on immobilised indicators and fiber optics. **Critical Review in Analytical Chemistry**, v.19, p.135-173, 1988.
- SLOPER, A.N.; DEACON, J.K.; FLANAGAN, M.T. A planar indium phosphate monomode waveguide evanescent field immunosensor. **Sensors and Actuators. Series B**, v.1, p.589-591, 1990.
- VAN EMON, J.M.; GERLACH, C.L.A. Status report in field-portable immunoassay **Environmental Science and Technology**, v.29, p.312-317, 1995.
- WHITE, J.; KAUER, J.S.; DICKINSON, T.A.; WALT, D.R. Rapid analyte recognition in a device based on optical sensors and the olfactory system. **Analytical Chemistry**, v.68, p.2191, 2202, 1996.
- WHITE, J.; KAUER, J.S.; DICKINSON, T.A.; WALT, D.R. Rapid analyte recognition in a device based on optical sensors and the olfactory system. **Analytical Chemistry**, v.68, p.2191, 2202, 1996.
- YAMAZOE, N.; MIURA, N. Environmental gas sensing. **Sensors and Actuators. Series B**, v.20, p.95-102, 1994.

# 3

## PERSISTÊNCIA E BIOMAGNIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva  
Elisabeth Francisconi Fay

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento  
e Avaliação de Impacto Ambiental — CNPMA  
Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

### I. INTRODUÇÃO

Muitas vezes, há um conflito entre a necessidade de manter um nível de atividade de um xenobiótico no ambiente e o desejo de degradar esse composto químico para moléculas menos tóxicas e menos prejudiciais ao ambiente. Quando os pesticidas são aplicados diretamente no solo ou na água, pode ser importante uma maior persistência para que haja maior benefício agrícola e econômico. Porém, quando a atividade requerida para o pesticida está expressa às folhagens, não há necessidade de uma grande persistência e o ideal é que o excesso de pesticida que chegasse ao solo ou à água fosse rapidamente degradado.

A maioria dos pesticidas para proteção de culturas, desenvolvidos no início deste século, eram inorgânicos e muito estáveis no ambiente. Na década de 1940, com o advento e substituição dos pesticidas inorgânicos pelos orgânicos, acreditou-se que o problema da persistência estava resolvido, uma vez que os agentes degradativos biológicos e não biológicos, junto com a volatilização, eliminariam rapidamente os novos produtos. Observou-se, então, uma melhora no nível de controle de pragas e na quantidade de aplicações. Com a descoberta de que alguns pesticidas, principalmente os hidrocarbonetos clorados, não estavam sendo degradados, mas acumulados no ambiente, veio o descrédito desses conceitos e os estudos sobre persistência tornaram-se rotineiros (Alexander, 1973; Edwards, 1973).

Os xenobióticos são químicos poluentes da biosfera, embora nem todos os poluentes sejam compostos químicos xenobióticos. Esses compostos têm estruturas moleculares e seqüências de ligações químicas que não são reconhecidas pelas enzimas degradativas existentes e, portanto, resistem à biodegradação ou não são completamente metabolizados, resultando num acúmulo de alguns xenobióticos no ambiente. Entre eles estão incluídos hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH), que são derivados de petróleo, as bifenilas policloradas (PCB), usadas em transformadores e capacitores, os plásticos de todos os tipos etc. Se esses produtos trazem um benefício evidente, causam em contrapartida problemas por sua grande persistência no ambiente, a qual pode chegar a anos de duração, afetando a fauna, a flora e os microrganismos (Langenbach, 1995). As PCBs são altamente cloradas e bastante persistentes e os sedimentos, contaminados com esses produtos há mais de vinte anos, ainda apresentam altos níveis de contaminação (Atlas, 1990).

Pode-se imaginar muitas razões para que um composto orgânico xenobiótico seja recalcitrante à biodegradação: substituições incomuns com cloro ou outro halogênio, ligações incomuns ou seqüências de ligações, como em átomos de carbono terciários e quaternários, anéis aromáticos altamente condensados e moléculas de altíssimo peso molecular, como polietileno e outros plásticos. Outra razão mais sutil pode ser a falha do composto em induzir a síntese de enzimas degradadoras. A impossibilidade do composto penetrar nas células microbianas por falta de permeases adequadas, indisponibilidade do composto, devido à insolubilidade ou fenômeno de adsorção, e a toxicidade excessiva do composto parental ou de seus produtos metabólicos podem contribuir para a dificuldade de degradação.

Com freqüência uma simples troca nos substituintes de um pesticida pode fazer a diferença entre a recalcitrância e a degradação, pois as alterações modificam as propriedades das moléculas como substrato para o crescimento e metabolismo da microbiota do solo ou água, tornando-as mais ou menos persistentes nesses ambientes. A substituição de um átomo ou grupo substituinte por outro torna a molécula mais ou menos suscetível ao metabolismo microbiano (Atlas, 1990). Na Fig. 1 comparam-se as estruturas químicas de alguns pesticidas biodegradáveis e recalcitrantes. O herbicida 2,4-D é degradado em questão de dias, porém o 2,4,5-T, que difere só pela substituição de um cloro adicional na posição meta, persiste durante muitos meses. A substituição adicional interfere na hidroxilação e fragmentação dos anéis aromáticos. O profan é cindido rapidamente por amidasas microbianas e em algumas aplicações é necessária a adição de inibidores de amidasas. Para o propacloro, que tem um grupo amino terciário e não está sujeito ao ataque dessas



amidases, a persistência ocorre por tempo consideravelmente mais longo. O metoxicloro é menos persistente que o DDT porque os grupos *p*-metoxilas estão sujeitos a dealquilação, enquanto a substituição *p*-cloro confere ao DDT grande estabilidade biológica e química.

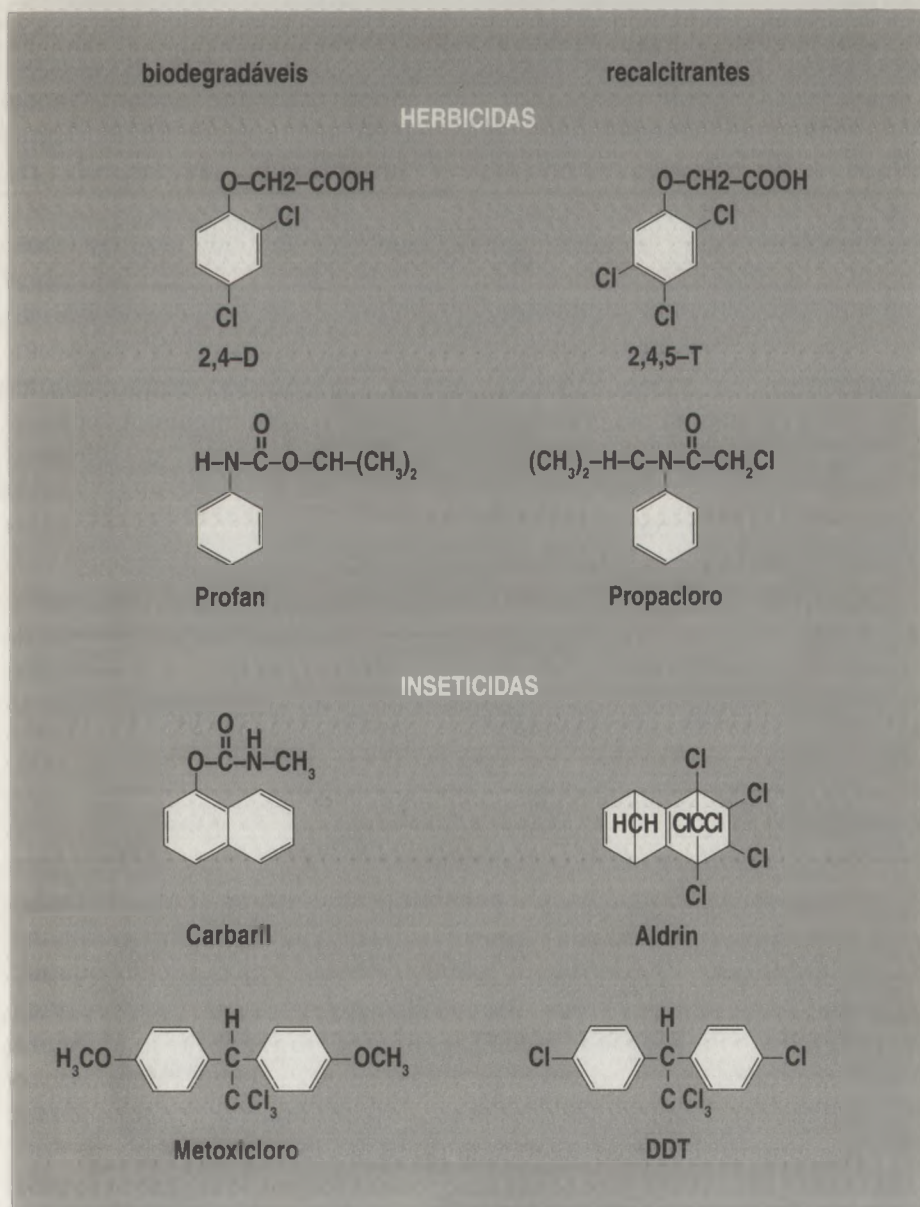


FIGURA 1. Estruturas químicas de alguns pesticidas biodegradáveis e recalcitrantes. (Atlas, 1990).

Os xenobióticos podem estar presentes de formas distintas nos solos, dissolvidos na água do solo, vaporizados no ar do solo, adsorvidos nas partículas minerais e orgânicas e oclusos nas partículas minerais e orgânicas. Cada um tem comportamento específico sob as várias condições ambientais e está sujeito às diferentes variações físico-químicas. Os xenobióticos aderidos às partículas minerais estão mais sujeitos às modificações de pH e potencial redox do que se fossem adsorvidos ao material orgânico. Os xenobióticos adsorvidos superficialmente podem chegar mais facilmente aos microrganismos — e conseqüentemente ser degradados — do que aqueles que estão oclusos dentro das partículas do solo.

Bioacumulação e bioconcentração são termos que descrevem a transferência de xenobióticos do ambiente externo para um organismo. Nos organismos aquáticos, a bioacumulação pode ocorrer pela exposição ao sedimento ou por via da cadeia alimentar (transferência trófica). A bioconcentração é o acúmulo, pelos animais aquáticos, do xenobiótico presente na água, através de exposição a rotas não alimentares. A biomagnificação é definida como a transferência do xenobiótico do alimento para um organismo. Nos ecossistemas aquáticos ainda existem controvérsias sobre os papéis relativos da bioconcentração e bioacumulação de xenobióticos na transferência trófica.

O presente capítulo é uma revisão dos princípios que determinam a degradação, persistência, bioacumulação e biomagnificação de moléculas xenobióticas. O objetivo do capítulo é auxiliar no entendimento dos conceitos relativos a esses parâmetros, através de uma ampla revisão de literatura.

## II. PERSISTÊNCIA

Os termos comportamentais **persistência** e **persistente** definidos por Frehse (1976) conceituam o período no qual um pesticida permanece inalterado, isto é, descreve a longevidade de um pesticida quando depositado em uma superfície. **Recalcitrante** é o termo usado por alguns autores para indicar substâncias que podem persistir no ambiente por muitos anos sem modificações. Todos os pesticidas tendem a desaparecer, mas em velocidades diferentes e isso é importante para que eles possam atingir o limite de tolerância dos resíduos.

O termo persistência é um termo relativo e, segundo o IBAMA (1990), a classificação dos compostos químicos, quanto à sua persistência, é dada pela porcentagem de desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  em 28 dias:

- 0 a 1% = Persistência alta (meia-vida acima de 180 dias)  
1 a 10% = Persistência média (meia-vida entre 90 e 180 dias)  
10 a 25% = Persistência reduzida (meia-vida entre 30 e 90 dias)  
Acima de 25% = Não persistente (meia-vida abaixo de 30 dias)

Somente uma pequena proporção de pesticidas teve seus resíduos detectáveis vários anos após a sua aplicação e, portanto, estes são extremamente persistentes no ambiente. Muitos desses pesticidas ainda são importantes na proteção de culturas e também do ponto de vista econômico, o que faz com que sejam extensivamente usados no mundo todo. Alexander (1966) propôs algumas explicações possíveis para sua prolongada persistência no ambiente:

- a) os organismos presentes podem apresentar perda do potencial enzimático ou biológico para degradar determinado produto;
- b) o pesticida pode ser incapaz de penetrar na célula;
- c) a concentração ou a natureza física do pesticida no ambiente podem inibir os organismos e suas enzimas;
- d) a molécula do pesticida pode estar inacessível, devido à adsorção, ou pode estar recoberta por compostos relativamente impenetráveis;
- e) a configuração estérica do pesticida previne ou impede o ataque enzimático;
- f) o ambiente é tóxico ou deficiente em algum fator essencial para o crescimento dos microrganismos capazes de degradar o pesticida;
- g) insolubilidade do composto e, portanto, indisponibilidade ao ataque microbiano.

Muitos microrganismos não podem utilizar o pesticida como fonte de carbono ou energia, mas poderão metabolizá-lo na presença de substratos alternativos. Esse fenômeno denominado de cometabolismo foi observado por Raymond *et al.* (1971) e Horvath (1972) em ambiente natural. É possível, assim, que a estabilidade de alguns pesticidas no ambiente seja em parte devido à perda de fontes cometabólicas alternativas de carbono ou energia.

Além disso, alguns pesticidas que são degradados *in vitro* podem persistir no ambiente porque os organismos responsáveis pela sua degradação perderam a capacidade competitiva e tornaram-se raros nesse ambiente.

Como visto, a persistência ambiental de um químico no solo está relacionada às suas propriedades. Um composto é persistente quando não hidrolisa ou biodegrada rapidamente (a taxa constante de transformação de primeira ordem é de  $<0,02 \text{ d}^{-1}$ ), tem baixa volatilização ou baixa constante da lei de Henry, alto coeficiente de partição e baixo potencial para mover-se e contaminar a água subterrânea. Um pesticida não persistente

é aquele que hidrolisa ou biodegrada rapidamente (a taxa de degradação de primeira ordem em solos é no máximo de  $0,02 \text{ d}^{-1}$ ), alta constante da lei de Henry, altamente solúvel em água (coeficiente de partição  $kd < 1$ ), alto potencial para movimentar-se na água e tem apreciável valor de fitotoxicidade (Himel *et al.*, 1990).

A vantagem de um pesticida persistente é a não aplicação freqüente e isso é um fator importante no controle de pragas em áreas de difícil acesso. Porém, a persistência pode trazer uma série de desvantagens, se o pesticida causar efeitos nocivos, quando sob longo tempo de exposição. Os pesticidas mais persistentes tendem a acumular-se no ambiente e eventualmente podem ser consumidos através dos alimentos e/ou da água.

As principais desvantagens dos pesticidas não persistentes são as seguintes:

- a) se os pesticidas têm amplo espectro (por exemplo, tóxico para grande número de insetos), poderão matar as pragas e os predadores, degradando em seguida. Em consequência, há reinfestação por pragas vindas de áreas adjacentes, livres de seus inimigos naturais;
- b) os pesticidas não persistentes mais efetivos são muitas vezes mais prejudiciais quando manuseados pelo homem e muitos usuários em áreas rurais não entendem ou não se preocupam com as advertências escritas, em linguagem técnica, no rótulo da embalagem.

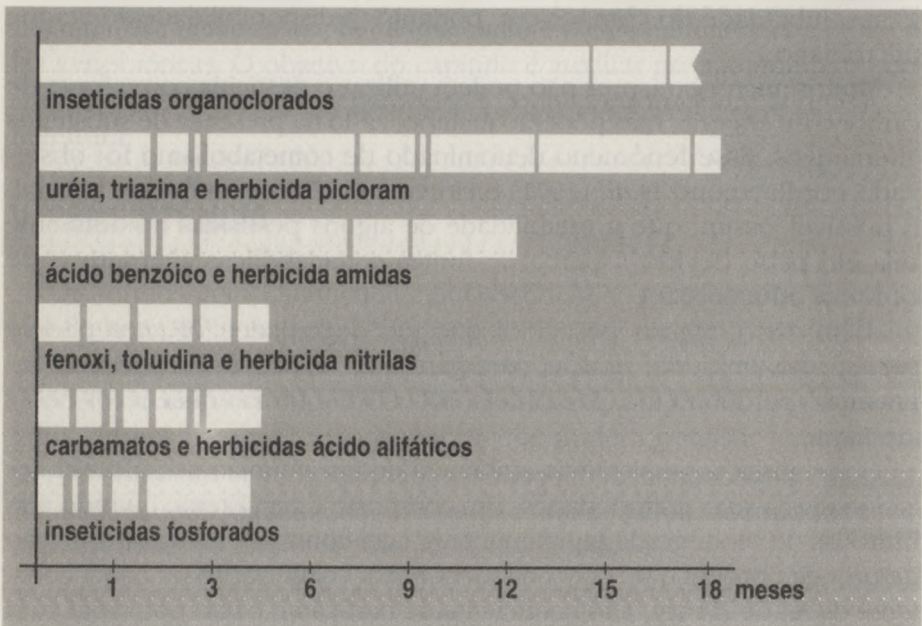


FIGURA 2. Persistência de pesticidas no solo (Kearney *et al.*, 1969).

## II. 1. Ordem de Persistência entre Classes de Pesticidas

Um conciso ponto de vista sobre a persistência de pesticidas no solo foi apresentado por Kearney *et al.* (1969), o qual está apresentado nas Figs. 2 e 3. Os valores de persistência representam o tempo necessário

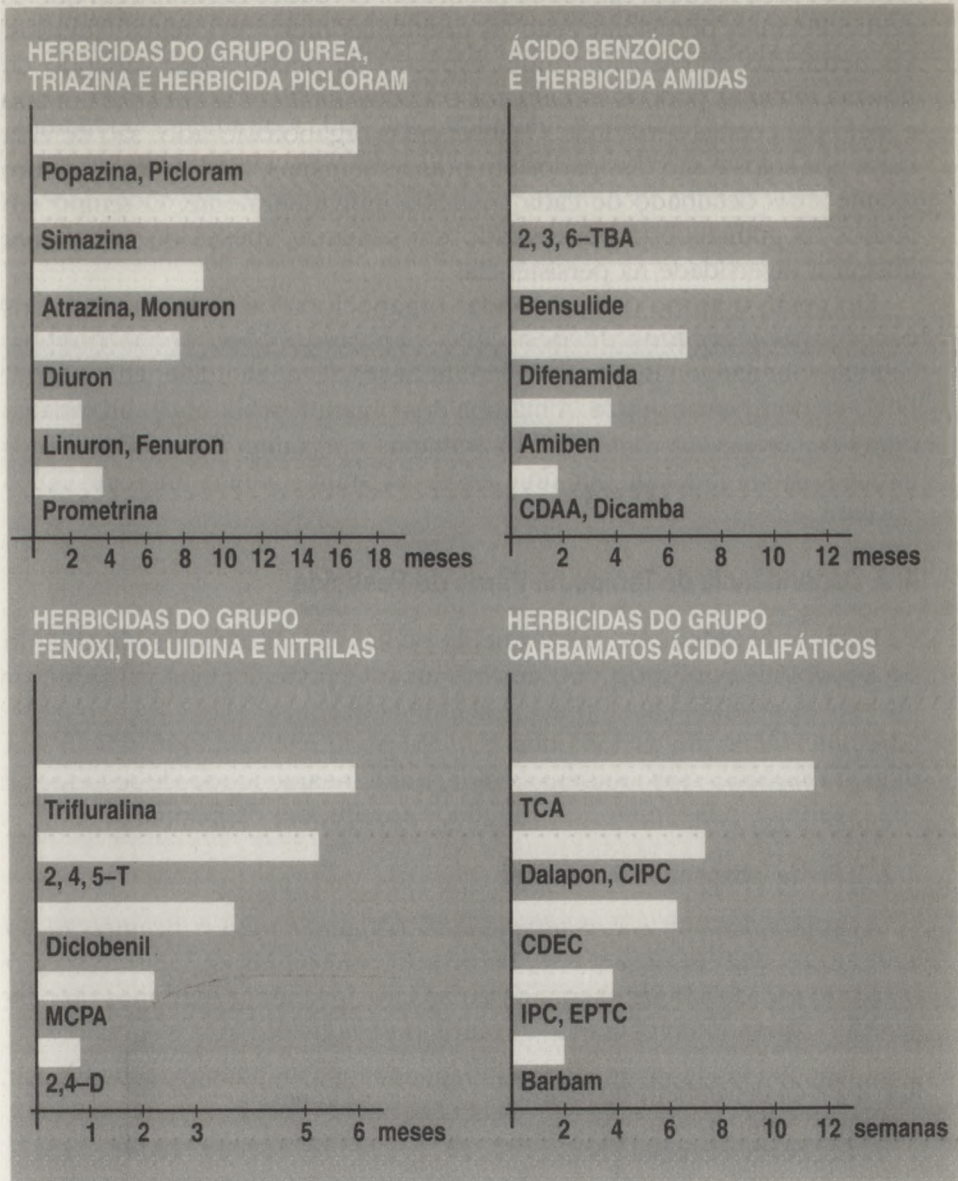


FIGURA 3. Comparação da persistência entre classes de herbicidas e inseticidas. (Kearney *et al.*, 1969).

para a bioatividade alcançar um nível de 75 a 100% do controle. Os valores são resultantes de condições agrícolas e quantidades normalmente aplicadas.

A comparação da persistência das maiores classes de herbicidas e inseticidas no solo é mostrada na Fig. 2, onde cada barra representa a persistência de uma ou mais classes de pesticidas. Os dados demonstram que os pesticidas mais persistentes são os inseticidas hidrocarbonetos clorados. Os herbicidas apresentam amplo espectro de persistência, variando de poucas semanas para os carbamatos e ácidos alifáticos a um ano, um ano e meio para certas s-triazinas. Os inseticidas organofosforados são de vida curta nos solos e são dissipados em poucas semanas. Na Fig. 3 tem-se um exame mais detalhado de cada pesticida individualmente. O tempo em ambos os gráficos está apresentado em semanas, meses ou anos, para ilustrar a diversidade na persistência.

Em geral, o grupo dos inseticidas organoclorados inclui quase todos os exemplos comuns de pesticidas persistentes em águas fluviais: hexaclorobenzeno (BHC), epóxido de heptacloro, dieldrin, DDE, DDT, DDD e endrin entre outros. A maioria dos organofosforados e carbamatos degrada completamente em oito semanas em águas fluviais, porém o paration pode persistir por dois anos em água e cinco anos em solos (Holum, 1977).

## II. 2. Dependência do Tempo na Perda do Pesticida

Enquanto podem ser precisamente conhecidas a data e a quantidade do xenobiótico aplicado, seu destino no solo pode ser obscurecido por interações no solo, clima, práticas culturais e tempo. Além disso, o desaparecimento de um xenobiótico no solo pode não somente refletir sua degradabilidade, mas também demonstrar a incapacidade de se detectar seus resíduos pelos métodos analíticos atualmente disponíveis.

### II. 2. 1. Perda independente do tempo

As aplicações únicas e as repetidas dão origem a uma concentração no solo, no modelo passo a passo, de acordo com o tempo. O arsênico e o mercúrio são dois bons exemplos desse fato, levando a extremos de persistência, quando comparados a outros pesticidas orgânicos sintéticos.

### II. 2. 2. Perda dependente do tempo

#### A. Resposta microbiológica

Os microrganismos do solo estão geralmente envolvidos nas alterações iniciais dos pesticidas orgânicos sintéticos, inativando-os, e provavel-

mente estão também envolvidos na degradação de seus resíduos. As bactérias quimiorganotróficas, fungos e actinomicetos, que utilizam compostos carbonados naturais para energia e síntese celular, são os microrganismos que predominam ativamente na biodegradação (Hiltbold, 1974). A resposta deles à adição de halogênicos e xenobióticos está na dependência de suas capacidades enzimáticas para reagir com a molécula do pesticida. A degradação microbiológica dos pesticidas foi definida por Audus (1960) como um processo pelo qual os microrganismos adaptam-se ao pesticida e produzem enzimas capazes de degradá-lo durante a "fase lag", seguida por um período de enriquecimento, quando os microrganismos adaptados multiplicam-se utilizando o substrato como fonte de carbono, conforme ilustrado na Fig. 4a. Quando o pesticida é aplicado no solo pela primeira vez, observa-se um período de adaptação antes que a degradação ocorra a uma taxa

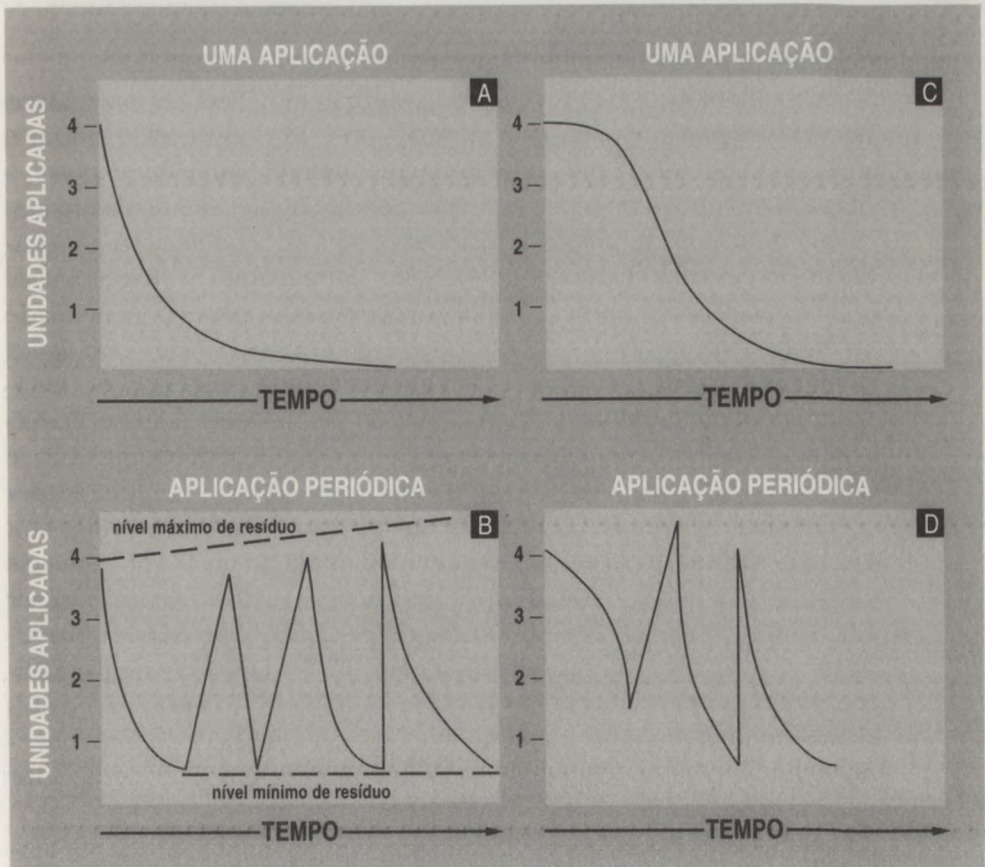


FIGURA 4. Perda de pesticidas no solo após uma aplicação (a, c) ou aplicações periódicas (b, d) (Kearney *et al.*, 1969).

significativa. Nas aplicações subseqüentes do mesmo produto, resulta uma degradação rápida e imediata com pequena ou nenhuma "fase lag". As aplicações periódicas de pesticidas degradáveis produziram então tipos de curva, como é mostrado na Fig. 4b, sendo que os níveis residuais do pesticida permaneceriam próximos a zero. A taxa de biodegradação em solos enriquecidos está relacionada à concentração do pesticida e à expansão do conjunto enzimático associado ao crescimento microbiano.

As aplicações repetidas de um mesmo pesticida podem também acelerar a degradação dos produtos formados. Por exemplo, o 2-amino-benzimidazol é rapidamente dissipado em solos que já foram expostos a seu parental, o carbendazim, com somente 6% de resíduo remanescente, após quatro dias da aplicação (Aharonson *et al.*, 1990). Nesses solos, a degradação de 2-amino-benzimidazol foi mais rápida do que a de seu parental.

## B. Resposta não microbiológica

Muitos xenobióticos não conseguem induzir as modificações enzimáticas necessárias para que os microrganismos possam efetivamente utilizar o carbono do pesticida para o próprio crescimento. Sem essa resposta, a degradação que ocorre está na dependência da intensidade da atividade bioquímica da população existente e sob a dependência da concentração do pesticida (Hiltbold, 1974). Nessa situação a ação microbiológica sobre o pesticida pode ser considerada como fator passivo. A atividade enzimática da população microbiana é determinada pelas condições químicas e físicas do ambiente solo, sem grande influência do tratamento com o xenobiótico. Mecanismos de perda, como a adsorção nas argilas ou superfícies orgânicas, volatilização, fotodecomposição e lixiviação, funcionam simultaneamente à degradação microbiológica para reduzir a concentração do pesticida após a aplicação (Fig. 4c). Uma vez determinada a taxa constante de perda do pesticida, os níveis residuais máximo e mínimo, após aplicações periódicas, poderão ser calculados. As aplicações periódicas de pesticidas degradáveis produziram curvas do tipo apresentado na Fig. 4d. Os níveis residuais máximo e mínimo permaneceriam paralelos à linha de base ou não exibiriam nenhuma acumulação progressiva sob condições de campo, quando o número de unidades de pesticida perdido em dado tempo for igual ao número de unidades aplicadas.

Observações sobre o efeito das aplicações repetidas de alguns herbicidas em campo, apresentadas por Fryer & Kirkland (1970), mostraram um enriquecimento quando aplicado MCPA ao solo, porém não



houve evidência de que a aplicação repetida de simazina no solo causasse enriquecimento e, dessa forma, tivesse influenciado na sua taxa de degradação. Com linuron foram observados resultados similares e a metade da dose aplicada, de 0,6 a 1,1 kg/ha<sup>-1</sup>, desapareceu do solo dentro de oito semanas. No entanto, em aplicações repetidas não houve estímulo para uma condição de enriquecimento. A taxa constante de persistência em aplicações repetidas é uma boa evidência da perda de enriquecimento microbiano.

Para a interpretação da perda de pesticida no campo foi também utilizada a cinética da reação. As curvas de desaparecimento sugerem que a perda da maioria dos pesticidas normalmente segue a reação de primeira ordem. As equações são ferramentas úteis para descrever a taxa de degradação de um xenobiótico e conseqüentemente sua persistência. As equações de primeira ordem são as mais comumente utilizadas pela simplicidade de uso. Elas possibilitam estimar a meia-vida, que é o tempo necessário para que haja dissipação de 50% do composto químico, independentemente de sua concentração inicial no solo. Hiltbold (1974) determinou a perda de monuron em solos argilosos, durante 10 semanas após uma aplicação pesada. Seus dados indicaram taxa de perda proporcional à concentração do monuron no solo, como seria o caso de uma reação de primeira ordem. Neste caso a meia-vida para o monuron foi de 4 semanas. Também foi observada uma função de perda de primeira ordem para simazina (Roadhouse & Birk, 1961). O estudo de simazina em campo, com seis concentrações diferentes, durante dois anos, apresentou um nível percentual de resíduos muito semelhante para todas as concentrações, indicando boa concordância com a cinética de primeira ordem.

A persistência dos inseticidas hidrocarbonetos clorados também permite a aplicação desses modelos de reações na interpretação dos resultados de experimentos de campo. Lichtenstein & Schulz (1965) compararam a persistência de aldrin e heptacloro aplicados em uma única dose (28 kg ha<sup>-1</sup>), com outros experimentos que receberam cinco doses anuais (5,6 kg ha<sup>-1</sup> para cada dose). Após a dose única, as concentrações de aldrin e heptacloro no solo decresceram, segundo uma reação de primeira ordem. Foi calculada a meia-vida de 7 meses para aldrin e um ano para heptacloro. A conversão de aldrin para dieldrin e de heptacloro para epóxido de heptacloro ocorreu com a perda inicial do composto parental. Uma vez que esses produtos da conversão são mais resistentes à degradação do que os compostos parentais, a persistência foi maior do que seria predita somente para a perda de aldrin e heptacloro. No final de cinco anos todo o resíduo

de aldrin estava na forma de dieldrin e 62% do resíduo de heptacloro estava na forma de epóxido de heptacloro. A aplicação total das cinco doses, quando comparada à dose única, resultou em mais resíduos no final de cinco anos. Enquanto somente 11 e 9% das doses únicas de aldrin e heptacloro persistiram por cinco anos, 19 e 18% desses pesticidas persistiram quando houve várias aplicações. A degradação dos resíduos que persistiram foi novamente avaliada num segundo período de cinco anos, no qual não houve aplicações de aldrin e nem de heptacloro (Lichtenstein *et al.*, 1970). A taxa de perda foi de primeira ordem com a meia-vida dos resíduos de aldrin (principalmente dieldrin) de 2,7 anos e de heptacloro (principalmente epóxido de heptacloro), de 2,5 anos.

A taxa de perda de um xenobiótico pode ser modificada durante a sua distribuição e o seu equilíbrio no solo, com um ou mais processos de perda sucessivamente predominantes. Normalmente esse ajuste é rápido e pode, às vezes, não ser detectado. A porcentagem perdida, quando são aplicadas baixas concentrações, muitas vezes excede às de altas concentrações durante o mesmo período. Esse processo foi observado por Nash & Woolson (1967) com DDT, durante os três primeiros anos após sua aplicação. Nos anos seguintes a perda de DDT foi praticamente a mesma entre as diferentes concentrações aplicadas, em concordância com a cinética de primeira ordem.

Edwards (1966) explicou a modificação na porcentagem de perda após a aplicação do xenobiótico como sendo o resultado de uma seqüência de processos de perda sobrepostos, iniciando com a perda na aplicação por deriva, seguida da perda através da volatilização, adsorção, lixiviação, além da perda ao longo do tempo por degradação enzimática.

### II. 3. Fatores que Influenciam a Persistência de um Pesticida

Na maioria dos casos, os pesticidas são substâncias orgânicas xenobióticas aplicadas intencionalmente nos ecossistemas terrestres. Após sua ação esses pesticidas deixam resíduos, considerados indesejáveis no ambiente. Por outro lado, a contaminação química do ambiente pode também ocorrer através do uso de *land-farming*, aterros sanitários etc., além de quantidades excessivas de pesticidas e fertilizantes, que podem contaminar o solo, a água superficial e a água subterrânea.

Os riscos ocasionados pelos xenobióticos à integridade do ambiente e a seus organismos naturais dependem de muitos fatores, tais como as propriedades tóxicas deles, sua persistência e mobilidade no ambiente e certas associações potencialmente perigosas com outros pesticidas ou

fertilizantes. Outras propriedades relevantes são a volatilidade, o potencial para acumulação e a degradabilidade do xenobiótico.

Após a entrada desses xenobióticos no ambiente solo, vários processos físicos e químicos determinam o comportamento de seus resíduos no ambiente. As propriedades do solo que influenciam as atividades microbianas e, portanto, a persistência dos pesticidas, incluem a umidade, conteúdo de matéria orgânica, condição redox, acidez, temperatura, adsorção/dessorção e constituintes minerais.

### II. 3. 1. Adsorção/dessorção

O transporte, transformação e efeitos biológicos das moléculas orgânicas no solo dependem muito de sua retenção pela fase organo-mineral do solo. A biodisponibilidade de um composto xenobiótico é de extrema importância, porque freqüentemente responde pela persistência de compostos que são biodegradáveis e que deveriam ser rapidamente decompostos. A indisponibilidade de uma molécula pode ser o resultado de sua sorção a sólidos no ambiente ou a sua oclusão nas partículas do solo, sedimentos ou aquíferos. Para o solo, sedimentos e seus constituintes em condições naturais, a adsorção é a passagem de um soluto da fase aquosa para a superfície de um adsorvente sólido, sendo a dessorção o processo inverso.

As superfícies sólidas do ambiente como os minerais de argila, a fração orgânica dos solos ou sedimentos, outros materiais carbonados complexos ou, algumas vezes, hidróxidos amorfos de Fe e Al podem afetar intensamente a atividade dos microrganismos naturais do ambiente. Essas superfícies podem alterar a disponibilidade de compostos orgânicos, modificar os níveis de vários nutrientes orgânicos e inorgânicos, modificar o pH ou a relação de  $O_2$ , liberar inibidores menos tóxicos, reter microrganismos ou inibir a atividade de enzimas extracelulares (Alexander, 1994). Algumas moléculas orgânicas são predominantemente sorvidas nos minerais de argila, enquanto outras são ampla ou inteiramente ligadas à matéria orgânica. Além da adsorção de substratos orgânicos, muitos outros nutrientes inorgânicos necessários aos microrganismos também sofrem adsorção.

Vários fatores influenciam a sorção de compostos orgânicos: o tipo e a concentração dos solutos na solução do solo, o tipo e a quantidade de minerais de argila, a quantidade de matéria orgânica no solo ou sedimento, pH, temperatura e o composto específico envolvido. Além destes, o tipo de cátion que está saturando a argila (Fe, Ca ou H), a capacidade de troca e a superfície específica também são importantes. A maioria dos principais processos de sorção ocorrem na superfície das argilas

e materiais húmicos, os quais têm grande superfície específica por unidade de área.

As argilas minerais são de dois tipos: 1) as lâminas de silício e alumínio estão dispostas na relação 1:1; 2) a relação entre as lâminas de silício e alumínio é de 2:1. Nas argilas 1:1, as lâminas estão firmemente juntas, não são expansíveis, têm menor área de superfície e menor capacidade de adsorção do que as argilas 2:1 (Pierzynski *et al.*, 1994). As moléculas são adsorvidas na superfície externa das argilas 1:1, enquanto nas argilas 2:1 os compostos orgânicos, nutrientes inorgânicos e água podem ser adsorvidos tanto interna como externamente, o que é frequentemente de grande importância.

A adsorção pode envolver forças físicas ou de Van der Waals, pontes de hidrogênio, troca iônica ou quimiossorção. Para os xenobióticos, compostos orgânicos com baixo peso molecular, a troca iônica é de maior importância. As moléculas positivamente carregadas aos valores de pH que prevalecem na natureza, são retidas pelas superfícies carregadas negativamente. A capacidade das argilas afetarem a biodegradação está na dependência de sua capacidade de troca catiônica.

A fração orgânica dos solos é responsável pela adsorção da maioria dos compostos, principalmente os hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros poluentes não polares. A extensão dessa retenção é diretamente correlacionada com o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), que é a medida da hidrofobicidade de um composto químico, e a porcentagem de carbono orgânico no solo ou sedimento (Alexander, 1994). Quanto maior o teor de matéria orgânica presente na fase sólida, maior é a sorção de moléculas hidrofóbicas. A matéria orgânica do solo pode absorver elementos traços poluentes, como por exemplo Pb, Cd, Cu, reduzindo dessa forma a chance de contaminação da água de superfície e da água subterrânea (Pierzynski *et al.*, 1994).

Para os microrganismos, a adsorção de substratos orgânicos tem grande impacto sobre seu crescimento e atividade. O efeito varia com o composto específico, com o mecanismo de ligação, com a força de retenção, quando os cátions orgânicos são substratos, e a capacidade do microrganismo usar o composto adsorvido naquele sítio. Este último fator ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que algumas espécies são capazes de usar os compostos adsorvidos, enquanto outras só podem metabolizar estas mesmas moléculas quando estão disponíveis na solução do solo. Em alguns casos, um composto biodegradável torna-se completamente resistente ao ataque microbiano, quando adsorvido. Uma inibição completa, como resultado da adsorção, é mostrada pela incapacidade dos microrganismos, em alguns solos, metabolizarem certos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) (Alexander, 1994). A velocidade de mine-

ralização do glifosato em muitos solos diminui com o aumento da ligação do herbicida aos colóides do solo (Nomura & Hilton, 1977).

Além da remoção do substrato orgânico da solução ou a ligação de enzimas extracelulares, a adsorção pode afetar a biodegradação de diversas maneiras (Alexander, 1994):

a) Os nutrientes orgânicos e os fatores de crescimento são também sorvidos, retirados da solução, reduzindo o crescimento microbiano.

b) O microambiente ao redor da partícula pode ser menos favorável à transformação do que a solução circundante, porque o pH ao redor das partículas carregadas é freqüentemente mais baixo. As partículas carregadas atraem e concentram  $H^+$  da solução.

c) A sorção também aumenta a concentração de nutrientes na superfície do adsorvente, permitindo o aumento do crescimento dos microrganismos próximos a superfície e podendo haver estímulo à biodegradação, principalmente se a solução do solo tiver baixa concentração de nutrientes.

d) Além disso, os próprios microrganismos podem ser adsorvidos e freqüentemente a maioria das células bacterianas nos ecossistemas com muita argila ou matéria orgânica particulada está associada, em maior número, à fase sólida. Como exemplo cita-se a biodegradação do naftaleno em solo. A população de bactérias degradadoras adsorvidas é maior, em torno de duas ordens de magnitude, quando comparada às bactérias degradadoras presentes na fase aquosa (Di Grazio *et al.*, 1990). Uma vez que as células estão adsorvidas na superfície, sua atividade fisiológica pode ser alterada e sua atividade metabólica pode ser maior, menor ou igual às células livres em solução.

Alguns fatores, como as características físico-químicas do adsorvente, características físico-químicas do adsorvido, reação do solo, acidez da superfície, temperatura e potencial elétrico da superfície argilosa, afetam a adsorção da molécula orgânica no solo.

### II. 3. 2. Matéria orgânica

A adição de materiais orgânicos aumenta a atividade microbiana e conseqüentemente acelera a degradação de muitos pesticidas; além disso, a fração orgânica do solo tem o principal papel no comportamento dos pesticidas no ambiente solo. A matéria orgânica freqüentemente domina a adsorção de pesticidas no solo, uma vez que as substâncias húmicas são predominantemente polímeros amorfos, que podem existir como partículas tridimensionais ou como envoltório de partículas minerais. Muitos xenobióticos com características lipofílicas difundem para dentro destas substâncias, podendo ser inserção um mecanismo de proteção contra os fatores de degradação, químicos, físicos e enzimáticos. Como

conseqüência, os xenobióticos podem adquirir maior persistência. Apesar da capacidade de troca catiônica (CTC) da matéria orgânica do solo ser relativamente alta na faixa de pH que predomina nos solos, ela é pH dependente e por essa razão a matéria orgânica dos solos possui tanto sítios hidrofílicos como sítios hidrofóbicos. Os sítios hidrofóbicos frequentemente dominam a retenção de pesticidas não iônicos na solução do solo. A competição com a água reduz o papel dos sítios hidrofílicos. É ampla a variedade de sítios potenciais de interação na superfície da matéria orgânica. Por isso numerosos tipos de interações na superfície com uma ampla variedade de adsorbatos podem nela ocorrer. Khan (1978a,b) citou algumas transformações abióticas de pesticidas que foram aumentadas pela matéria orgânica do solo. Essas transformações incluem a hidrólise de ésters organofosforados, a deidrocloração de hidrocarbonetos clorados, como DDT e lindane, a degradação de 3-aminotriazole, a S-oxidação de forate e a conversão de aldrin para dieldrin.

A matéria orgânica fortemente humificada encontra-se não só no solo como em sedimentos de lagos, rios e mares. Pesquisas em ecossistemas aquáticos têm mostrado que quantidades substanciais de xenobióticos ficam retidas nesses sedimentos, funcionando como verdadeiros vazadouros. Por esse motivo, deve-se evitar o revolvimento dos sedimentos, que acarreta a liberação desses produtos para a biosfera, atingindo a cadeia alimentar.

A matéria orgânica nativa ou adicionada ao solo também influencia a persistência dos pesticidas pelo aumento da atividade microbiana. Castro & Yoshida (1974) observaram, em solos alagados nas Filipinas, que a degradação dos inseticidas organoclorados DDT, endrin, heptacloro e os quatro isômeros do HCH ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) foi proporcional ao aumento do conteúdo de matéria orgânica. Em solos alagados pobres em matéria orgânica, a adição de palha de arroz e celulose aumentou a degradação desses inseticidas. Uma vez que os microrganismos respondem ao nível de substrato decomposto como os carboidratos, estes podem indiretamente afetar o processo microbiano, que resulta na degradação dos pesticidas no solo. Além do papel dos microrganismos na biodegradação, eles também apresentam superfícies para a retenção de moléculas, que tanto podem aumentar como retardar as transformações abióticas. Também a biomassa ativa tem efeito substancial na composição das fases líquida e gasosa do solo, como por exemplo a concentração de  $O_2$  e  $CO_2$  nessas fases.

### II. 3. 3. Umidade do solo

A umidade do solo afeta vários processos que contribuem para a dissipação, perda de pesticida em um certo volume de solo, sob condi-

ções de campo. Tem efeito direto e profundo na proliferação dos microrganismos e suas atividades, uma vez que compete pelos sítios de adsorção com o pesticida, determinando a quantidade de pesticida disponível ao ataque microbiano.

No microambiente do solo, a atividade da água e sua disponibilidade dependem das interações entre o conteúdo de água, a temperatura e a natureza do ambiente coloidal. A distribuição do tamanho dos poros, a estabilidade do agregado e a composição mineralógica influenciam a retenção da água contra a perda gravitacional e a captação pelos microrganismos e raízes de plantas. Os solos argilosos retêm água mais fortemente que os arenosos. A adsorção e a absorção pelas argilas e materiais orgânicos aumentam a viscosidade da água e limitam sua disponibilidade aos microrganismos.

O baixo conteúdo de umidade afeta a degradação do pesticida através da redução da biomassa microbiana e de sua atividade e por reduzir o pesticida na solução do solo (Moorman, 1994). Shelton & Parkin (1991) concluíram que o principal efeito do baixo conteúdo de umidade é sobre a atividade microbiana e não sobre a biodisponibilidade do pesticida. A umidade é um dos fatores que mais afetam a atividade microbiana, pois a água, por ser um componente do protoplasma celular, é elemento indispensável. Por outro lado, a umidade auxilia as trocas gasosas, dissolve e transporta os diferentes nutrientes (Alexander, 1977).

A aeração do solo está intimamente relacionada com os níveis de umidade. Por exemplo, após uma chuva forte ou inundação, como na cultura do arroz, o volume do solo é reduzido e os microrganismos anaeróbios, obrigatórios e facultativos, tornam-se predominantes. A inundação acelera a degradação de alguns pesticidas persistentes como os organoclorados. A ordem de persistência dos pesticidas em sistemas aeróbios geralmente segue a ordem: organoclorados > organofosforados = carbamatos. Porém, nem sempre a generalização é aplicável aos sistemas anaeróbios, devido à susceptibilidade de muitos, se não de todos, pesticidas organoclorados para biodegradação anaeróbia, com curvas de persistência tão baixas quanto ou menores do que as de alguns organofosforados e carbamatos (Matsumura, 1982). Os organoclorados contêm cloro na molécula orgânica e quanto mais átomos de cloro, maior a eletronegatividade da molécula, conseqüentemente mais difícil é a sua biodegradação, através do rompimento das ligações de cloro por microrganismos em condições aeróbias. Em condições anaeróbias, a degradação é mais eficiente porque o ambiente em torno dos microrganismos também é de alta eletronegatividade, facilitando o rompimento das primeiras ligações dos átomos de cloro. A partir daí, as ligações dos átomos de cloro restantes são rompidas com mais facilidade em condições aeróbias. No caso de hidrocarbonetos po-

liaromáticos, sua lipofilicidade e a presença de um carbono quaternário dificultam muito o acesso e, portanto, a ação de enzimas de degradação (Langenbach, 1995). As generalizações sobre a relação estrutura-biodegradabilidade em ambientes aeróbios parecem não ser aplicáveis a ambientes anaeróbios. Foi observado que o 3-clorobenzoato é degradado mas não o são o 2- e o 4-clo-robenzoato e o 2,4,5-triclorobenzoato é metabolizado mas não o são o mono e o diclorobenzoato, o que é totalmente diferente do que ocorre em meio aeróbio. Diferenças similares na relação estrutura-biodegradabilidade foram observadas por diferentes autores no metabolismo de fenóis, benzoatos e fenoxialcanoatos em condições anaeróbias (Alexander, 1994).

Em muitas áreas tropicais, caracterizadas pelas chuvas fortes intermitentes e estações de seca, os solos estão sujeitos a períodos alternados de alagamento e seca, com concomitante aumento nas atividades dos microrganismos anaeróbios e aeróbios. Nos solos, esses ciclos alternados de redução e oxidação permitem um ambiente favorável para a dissipação de maior número de moléculas orgânicas, quando comparados a um único sistema. Isso é importante para as moléculas que possuem anéis, uma vez que a reação de clivagem do anel requer oxigênio. Por exemplo, o diazinon foi hidrolisado em solos inundados, porém a porção do anel do seu produto de hidrólise foi clivada somente sob condições aeróbias, após a anaerobiose (Sethunathan *et al.*, 1991).

### II. 3. 4. Potencial de óxido-redução (Eh)

O termo Eh é definido como o potencial redox relativo ao eletrodo padrão de hidrogênio. Os tratamentos que modificam a atividade metabólica dos solos podem afetar não somente a degradação biótica dos pesticidas mas também a tendência de tornarem-se oxidados ou reduzidos abioticamente. A camada superior do solo apresenta uma velocidade maior na evaporação e trocas gasosas do que as camadas mais profundas. Portanto, a predominância de condições redutoras e com estas a probabilidade que os pesticidas sofram redução aumentam com a profundidade do solo.

O estado redox de um solo é um importante parâmetro ambiental no destino dos pesticidas. O potencial redox determina a relação entre a atividade dos compostos oxidados e reduzidos no equilíbrio. Isto não é indicativo da velocidade das reações de oxirredução. Altas energias de ativação podem inibir algumas reações de oxirredução, mesmo que o potencial redox do sistema indique que essas reações possam ocorrer. Na maioria dos casos há necessidade de um catalisador para que a reação redox ocorra e provavelmente as reações são catalisadas por microrganismos.



Os valores típicos de Eh em solos bem aerados estão entre 0,8 e 0,4 V, em solos moderadamente reduzidos entre 0,4 e 0,1 V e em solos reduzidos em torno de -0,1 V. Os solos altamente reduzidos têm Eh entre -0,1 e -0,3V e ocorrem em solos inundados (Wolfe *et al.*, 1990).

Em solos suficientemente reduzidos os metais Mn e Fe tendem a reduzir e com isso o potencial redox estabiliza. As formas reduzidas de cátions polivalentes são normalmente muito mais solúveis que as formas oxidadas. Em baixa aeração, podem estar presentes na solução do solo concentrações apreciáveis de espécies catiônicas reduzidas como Fe<sup>+2</sup>. Esta redução e conseqüente dissolução podem ter forte influência nas transformações abióticas dos pesticidas na fase líquida, uma vez que os metais têm ação catalítica. Em condições suficientemente redutoras, o sulfato pode ser reduzido, principalmente em solos ácidos, produzindo sulfetos que podem estar envolvidos na degradação de certos pesticidas (Paul & Clark, 1989). Os valores de Eh e pH do solo são muito dependentes um do outro.

O potencial redox da maioria dos solos, especialmente os ricos em matéria orgânica, cai em poucos dias após a inundação e sua queda é posteriormente acentuada na presença de algumas fontes orgânicas. Por exemplo, o grau de degradação de  $\beta$  e  $\gamma$ -HCH em diferentes solos foi relacionado ao potencial redox alcançado pelos solos após a inundação. A degradação desses isômeros ocorreu somente em solos com atividade microbiana capaz de alcançar potenciais de -40 a -100 mV dentro de poucos dias após a inundação (Matsumura, 1982). Os solos inundados produzem condições anaeróbicas, que afetam a rota e a velocidade do metabolismo do pesticida.

### II. 3. 5. Acidez do solo

A degradação de alguns pesticidas, principalmente os organofosforados e carbamatos, é afetada pelo pH do solo, enquanto a persistência dos pesticidas organoclorados raras vezes é afetada por esse parâmetro. A medida do pH é um critério importante como indicativo das reações microbianas nos solos.

Os valores de pH para um determinado microambiente devem estar relacionados ao tamanho dos organismos e à multiplicidade de enzimas, as quais são em sua maioria pH dependentes e estão relacionadas aos componentes celulares, como por exemplo as membranas. O pH ótimo das enzimas é afetado pelo fenômeno da adsorção. Os efeitos da modificação do pH na adsorção de compostos orgânicos são comumente utilizados para determinar os mecanismos de ligação de compostos ácidos ou básicos. Os herbicidas fracamente básicos, como as triazinas, podem

apresentar-se na forma neutra ou protonada, dependendo do pH do solo. Os compostos orgânicos fracamente ácidos apresentam-se tanto na forma de ânions como na forma de moléculas não dissociadas. Diminuindo o pH do solo, pode aumentar a adsorção, devido à grande adsorção do conjugado ácido-base (Pierzynski *et al.*, 1994).

Além dos efeitos diretos na molécula orgânica, o pH pode ter influência indireta na persistência, devido ao seu efeito na atividade microbiana e nos processos de adsorção/dessorção.

### II. 3. 6. Temperatura do solo

A temperatura é uma variável microambiental importante, devido ao seu efeito termodinâmico direto no metabolismo celular e na maioria das propriedades físicas e químicas do microambiente, incluindo potencial redox e o movimento de difusão dos líquidos e gases dentro do solo (Stotzky, 1972). No solo, ela afeta muitos processos que contribuem para a dissipação dos xenobióticos como a atividade microbiana, a volatilização e os processos de transportes. Dentro da faixa de temperatura normalmente encontrada nos solos agricultáveis (0 a 35°C), a velocidade de degradação geralmente aumenta com a temperatura e umidade. As altas temperaturas existentes nos trópicos poderiam favorecer a perda do xenobiótico, através da volatilização e do aumento da atividade microbiana. Castro & Yoshida (1974) demonstraram que o  $\gamma$ -HCH foi degradado mais rapidamente em solos alagados a 35°C do que a 25°C, possivelmente devido a um aumento na atividade microbiana e um rápido decréscimo no potencial redox a temperaturas mais altas.

As altas temperaturas apresentam problemas diferenciados aos microrganismos. Apesar das linhagens termofílicas poderem ser isoladas na maioria dos solos, as linhagens mesofílicas que sobrevivem às altas temperaturas como esporos dormentes são provavelmente as mais difundidas. A maioria das bactérias vegetativas e células eucarióticas mesofílicas está incapacitada acima de 40-50°C e morrem acima de 70-85°C. Estudos em laboratório demonstraram que as funções metabólicas individuais foram afetadas pelas altas temperaturas e que as modificações estruturais acompanharam passo a passo o aumento na temperatura (Moorman, 1994).

Outros fatores, além das propriedades físicas e químicas do solo, influenciam a persistência de um xenobiótico. São eles:

### II. 3. 7. Combinação de pesticidas

O impacto da aplicação de dois ou mais pesticidas combinados *versus* aplicação de um único pesticida na atividade microbiana envolvida na degradação dos pesticidas e transformações bioquímicas de importância

para a fertilidade do solo, merece estudos mais intensivos. Do ponto de vista econômico e de eficiência no uso de pesticidas, especialmente em agricultura tropical, o uso de combinações apropriadas poderia fornecer um meio potencial de aumentar a persistência de pesticidas prontamente biodegradáveis e de vida curta, como por exemplo a interação benomil-parathion (Matsumura, 1982). Entretanto, deve-se tomar cuidado, uma vez que o aumento da persistência de pesticidas degradáveis mas tóxicos, como muitos inseticidas organofosforados, podem gerar novos problemas de contaminação ambiental.

### **II. 3. 8. Dose**

A cinética de primeira ordem descreve as modificações na quantidade temporal de pesticidas. As proporções de perda são independentes das quantidades aplicadas, entretanto, a porcentagem de perda do pesticida pode diminuir em doses elevadas. Na Austrália, Weiss (1964), citado por Ferris & Haigh (1995), observou resíduos de simazina 27 dias após a última aplicação. Contudo, após 35 semanas, a taxa de aplicação não tinha efeito significativo na proporção de simazina remanescente, demonstrando que, para propósitos práticos, o comportamento de simazina no solo está de acordo com a cinética de primeira ordem.

### **II. 3. 9. Formulação**

Os ingredientes ativos dos herbicidas são formulados de formas bem diferentes, dependendo da toxicidade do produto, planta alvo, segurança e considerações ambientais. Sabe-se que a formulação tem influência na dispersão do ingrediente ativo. Segundo Ferris & Haigh (1995), nos solos australianos a propazina granular foi mais persistente do que a formulação pó-molhável e a comparação da persistência da atrazina granular e "flowable" produziu resultados semelhantes. Portanto, a formulação granular das triazinas tem sido considerada bastante persistente nos solos australianos. Pesquisas feitas na Inglaterra indicaram que existem pequenas diferenças entre a persistência de lenacil em formulação pó-molhável, propachlor e propizamida e suas suspensões concentradas correspondentes (Clay & Pomeroy, 1988).

### **II. 3. 10. Produtos da degradação**

A maioria das informações disponíveis sobre os produtos da degradação indicam o seu potencial para acelerar a degradação dos pesticidas que serão aplicados subsequente. No entanto, alguns produtos de degradação poderão prolongar a persistência de alguns pesticidas no solo.

Quando aplicado repetidamente ao solo, o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), um metabólito da hidrólise de clorpirifos e triclopir, diminui a degradação de clorpirifos (Somasundaram & Coats, 1989). Em concentrações de 100 ppm o TCP inibiu a degradação de carbofuran e DOWCO 429X em solos problemáticos, porém não teve efeito em concentrações de 1 e 10 ppm (Chapman & Harris, 1990). Estudos recentes de Somasundaram *et al.* (1990) e Felsot & Pedersen (1991) demonstraram a atividade antimicrobiana desse metabólito. Segundo os autores, o efeito inibidor de TCP poderia ser resultado de sua toxicidade microbiana. Contudo, os níveis necessários para afetar os microrganismos deveriam ser mais altos do que o efeito de uma simples aplicação de triclopir ou clorpirifos. Uma vez que os pesticidas ao serem aplicados no campo não são homogeneamente distribuídos através do solo, mas concentrados ao redor das partículas da formulação granular, podem ocorrer altas concentrações do pesticida ou metabólito em determinado microambiente.

Outro modo de promover a persistência é através da retardação cruzada. O fonofos, inseticida organofosforado, aumenta a persistência de EPTC em solos problemáticos (Roeth *et al.*, 1990). O dietolato usado na nova formulação do EPTC é estruturalmente muito semelhante ao fonofos. Em estudos sobre toxicidade, Somasundaram *et al.* (1990) observaram que a metil-fenil-sulfona, um metabólito do fonofos, foi mais tóxica que o seu parental para *Photobacterium phosphorum*. Essa atividade antimicrobiana do fonofos pode ser o resultado da toxicidade de seu produto de degradação metil-fenil-sulfona.

### III. BIOACUMULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA NA CADEIA ALIMENTAR

O uso global de pesticidas está se expandindo em escala e intensidade. Embora se conheçam muitas coisas a respeito das consequências ambientais dessa prática tecnológica nem todos os seus efeitos potenciais são conhecidos.

Os organismos têm principalmente três vias de exposição aos pesticidas no ambiente: a) através da ingestão de alimento ou água; b) respiração; c) contato externo com a pele ou exoesqueleto. A exposição do organismo ao pesticida pode ser proveniente de uma aplicação deliberada do químico para controle de pragas em áreas agrícolas ou pode ser pela exposição indireta, quando o organismo está exposto a baixos níveis de resíduos remanescentes de uma aplicação, ou erosão em área não alvo.

A molécula química que passar pelas várias barreiras do organismo pode ser metabolizada pelos tecidos ou ser armazenada. Se a velocidade

de excreção do xenobiótico for baixa ou se a molécula química não for metabolizada, haverá acúmulo da mesma no organismo, e a concentração pode chegar a um nível de equilíbrio dependendo da concentração externa à qual o organismo está exposto. Se a velocidade de excreção ou o metabolismo do xenobiótico for baixo e o químico for solúvel em gorduras ou for fortemente sorvido por outros constituintes do corpo, sua concentração final no organismo poderá ser maior do que sua concentração no meio ao qual esteve exposto. Isso é chamado de **bioacumulação**.

A preocupação com a bioacumulação de um xenobiótico teve início na década de 1960, devido a incidentes como a toxicidade a resíduos de mercúrio metílico em mariscos e falha na reprodução de aves, devido a resíduos de pesticidas clorados em espécies aquáticas. Os modelos de bioacumulação foram desenvolvidos na década de 1970, considerando então processos como a partição de químicos hidrofóbicos da água para os organismos aquáticos (Hamelink *et al.*, 1971). Na década de 1980, houve expansão do estudo da acumulação com o desenvolvimento de modelos de predição, incluindo a bioacumulação em sedimentos, biomagnificação na cadeia alimentar e carcinogênese em espécies nativas (Barron, 1995).

Considerando que o ambiente é formado por diferentes fases como água, ar, solo e biota, o xenobiótico, ao ser introduzido nesse ambiente, é distribuído entre as diferentes fases, de acordo com suas propriedades (Fig. 5).

No equilíbrio, as concentrações entre duas fases são caracterizadas pelo coeficiente de partição ( $K$ ), que é a razão da concentração de uma fase para a concentração em outra fase e é constante. Os sedimentos aquáticos são formados pelo depósito de partículas e colóides, podendo assim atuar como um sumidouro ou uma fonte de poluentes. A entrada de xenobióticos persistentes leva a concentrações nos sedimentos que, muitas vezes, podem exceder a contaminação da água em muitas ordens de magnitude, devido à partição do químico nos sítios de ligação do sedimento (Barron, 1995). O coeficiente de partição água-biota ( $K_B$ ) é freqüentemente denominado **fator de bioconcentração** e pode ter valores acima e abaixo de um milhão. Assim, a biota aquática pode bioacumular concentrações significantes de um substrato, que estava em concentrações muito baixas na água. Em alguns casos, essas concentrações de contaminantes na água são tão baixas que não podem ser detectadas pelas técnicas analíticas convencionais. A transferência do xenobiótico de um ambiente para um organismo resulta geralmente em concentrações mais altas dentro do organismo quando comparadas à da

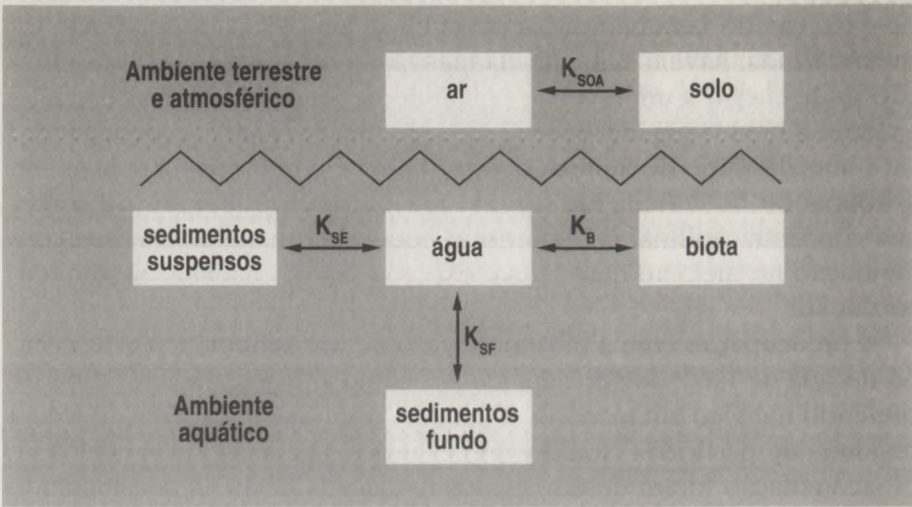


FIGURA 5. Representação diagramática da distribuição de um composto químico entre as fases do ambiente, com valores de partição  $K$  no equilíbrio (Connell, 1990a).

fonte. Isso indica que estão envolvidos dois processos básicos, primeiro a transferência direta do ambiente abiótico para um organismo e, segundo, a transferência dentro do alimento para o consumidor. Em ambos os casos, o subsequente aumento na concentração do xenobiótico, em relação à concentração da fonte, é considerado como resultado da bioacumulação. A transferência direta de um composto químico da água para um organismo é definida como **bioconcentração** (Connell, 1990a).

Num sentido mais amplo, a transferência de um xenobiótico do ar para a vegetação terrestre, biota terrestre de baixo nível trófico e biota de nível trófico mais alto é um processo análogo, porém a inclusão desses processos sob o termo bioconcentração é impróprio. A terminologia adequada a ser usada para distinguir esse processo da bioconcentração em ambiente aquático é **bioconcentração terrestre** (Connell, 1990a).

A transferência de um xenobiótico do alimento para um organismo é descrito como **biomagnificação**. Na Fig. 5, a transferência química da biota aquática de nível trófico mais baixo para a biota aquática de nível trófico mais alto, e da vegetação terrestre para a biota terrestre de nível trófico mais baixo e desta para a biota terrestre de nível trófico mais alto, pode ser vista como biomagnificação (Connell, 1990a). A biomagnificação não implica necessariamente em um aumento seqüencial na concentração com o nível trófico, mas a transferência de um xenobiótico do alimento para o consumidor nos diferentes níveis tróficos. O processo não é caracterizado por um simples equilíbrio como no caso da bioconcen-

tração, portanto um coeficiente de partição que indique uma situação de equilíbrio não seria apropriado, porém coeficientes de partição mais complexos provavelmente estão envolvidos com a biomagnificação. Quando o mecanismo de transferência é desconhecido ou não está bem especificado, o termo bioacumulação é utilizado, significando que a transferência ocorreu e a concentração no organismo é mais alta do que a concentração na fonte.

As evidências disponíveis indicam que em ecossistemas aquáticos os níveis tróficos mais altos podem adquirir compostos xenobióticos pela biomagnificação e bioconcentração, como indica a Fig. 5. No ecossistema terrestre o processo de partição do ar para a biota terrestre de nível trófico mais baixo e nível trófico mais alto normalmente não é significativo, porque na atmosfera ocorrem concentrações extremamente baixas do composto. Assim, nesses sistemas a biomagnificação é a predominante rota da bioacumulação.

De acordo com Connell (1990a), a biomagnificação e a bioconcentração envolvem rotas diferentes para os organismos e podem ter diferentes características de controle. Os animais aquáticos que respiram pelo ar, como as focas, baleias e golfinhos, bem como as espécies semi-aquáticas, como os pássaros aquáticos, necessitam de um organismo para a interface. Assim, o mecanismo de bioconcentração não pode operar e a biomagnificação é o único processo pelo qual os animais adquirem compostos xenobióticos. Nesse sentido, tais organismos são organismos terrestres e mais apropriadamente incluídos como biota terrestre de mais alto nível trófico. Por outro lado, organismos autotróficos, como os fitoplânctons e algumas bactérias, tiram seu alimento e  $O_2$  dos componentes dissolvidos na água. Com esses organismos há bioconcentração, uma vez que somente compostos xenobióticos disponíveis estão dissolvidos na água. Portanto, a biomagnificação só pode ser aplicada aos organismos aquáticos quando estes obtêm os compostos xenobióticos através dos resíduos na alimentação. Assim, esse mecanismo somente se relaciona aos organismos de níveis tróficos mais altos, que consomem matéria orgânica complexa como alimento. Incluem organismos como peixes, caranguejos e muitos invertebrados. Connell (1988), baseado em informações disponíveis na literatura, demonstrou que a bioconcentração é um processo de partição organismo-água, controlado por processos de difusão e outros relacionados, concluindo que:

- a) A biomagnificação opera com organismos aquáticos de respiração aérea.
- b) A bioconcentração opera com organismos autotróficos, como os fitoplânctons e algumas bactérias.

- c) Ambos os mecanismos variam em importância em vários grupos bióticos, dependendo de vários fatores, mas, em geral, a bioconcentração tem maior significado.
- d) A biomagnificação geralmente ocorre com compostos persistentes, tendo  $\log K_{ow}$  maior que 5 e com organismos que têm vida longa.

### III. 1. Bioacumulação de Xenobióticos

A bioacumulação de um químico por um organismo pode ser vista, na maioria das situações, como um processo de partição.

A ligação dos xenobióticos ao sedimento depende do conteúdo de carbono orgânico, tipo e conteúdo de argila, capacidade de troca catiônica, pH e área de superfície da partícula do sedimento (Connell, 1990a). O conteúdo de carbono orgânico do sedimento pode ser o fator de predição da biodisponibilidade do xenobiótico, uma vez que os xenobióticos hidrofóbicos podem ligar-se reversivelmente ao conjunto de carbono orgânico. O valor  $K_{oc}$  mede a tendência que um composto químico tem de sofrer partição entre a fase sólida e a solução do solo no sistema solo-água.  $K_{oc}$  é similar a  $K_{ow}$  e é expresso por:

$$K_{oc} = \frac{\mu\text{g adsorvido/g de carbono orgânico}}{\mu\text{g/ml em solução}}$$

$K_{oc}$  estima a quantidade de carbono orgânico adsorvido ao solo e pode ser usado para estimar:

- a extensão em que um soluto orgânico sofrerá partição no solo, quando a água movimentar-se através do perfil do solo;
- o grau em que os compostos químicos adsorverão na superfície do solo;
- a partição durante o escoamento superficial;
- a partição em sedimentos aquosos.

$K_{oc}$  pode ser medido experimentalmente ou estimado em relação ao  $K_{ow}$  pela seguinte expressão:

$$\log K_{oc} = \alpha \log K_{ow} + \beta,$$

onde  $\alpha$  e  $\beta$  são valores constantes dependentes da fase sólida e da solução (Connell, 1990a). A biodisponibilidade do xenobiótico, segundo Landrum *et al.* (1992a), pode diminuir com o aumento do tempo de contato entre o sedimento e o contaminante, fenômeno este conhecido como "envelhecimento do sedimento".

A teoria do equilíbrio da partição (EqP) da bioacumulação nos sedimentos está baseada na partição termodinamicamente dirigida entre o



xenobiótico hidrofóbico e o sedimento, a água presente nos poros do sedimento e o organismo. A teoria EqP assume que a ligação do xenobiótico ao carbono orgânico do sedimento está em equilíbrio com o xenobiótico dissolvido na fase aquosa do sedimento e o xenobiótico presente na fase lipídica do organismo exposto (Barron, 1995).

As limitações da teoria EqP incluem a hipótese de que as condições de equilíbrio existem e que o conteúdo de lipídeo é o principal determinante biótico da bioacumulação. É improvável a existência de um verdadeiro equilíbrio devido aos biodistúrbios, biodegradação, baixa ingestão do xenobiótico pelos organismos, heterogeneidade espacial e temporal da água contida nos poros do sedimento, variação no conteúdo de lipídeo, heterogeneidade em carbono orgânico, número de partículas e concentração do contaminante (Barron, 1995). A cinética da desorção do sedimento pode também tornar-se importante, quando as concentrações na água contida no poro são exauridas (Bierman, 1990).

### **III. 1. 1. Características gerais de xenobióticos que bioacumulam**

É necessário identificar as características distintivas dos compostos que apresentam bioacumulação, mas a literatura disponível não permite uma identificação inequívoca das características específicas requeridas. Além disso, a interação entre vários fatores e as características moleculares dificultam a indicação de fatores específicos que influenciam a bioacumulação. Porém, pode ocorrer declínio da bioacumulação pelos compostos que têm reduzida solubilidade em gorduras, alto peso molecular e incapacidade de penetrar nas membranas biológicas.

As características gerais dos compostos que governam a bioacumulação são interrelacionadas (Tabela 1). A natureza das ligações individuais confere aos metabólitos as propriedades de não polaridade e resistência à degradação. O aumento do tamanho molecular leva a um aumento do coeficiente de partição e um conseqüente e relacionado declínio da solubilidade em água, resultando num aumento da capacidade de bioacumulação. Connell (1988) constatou que o processo de bioacumulação leva um período de tempo para ocorrer e cresce com o aumento do peso molecular e outras características relacionadas com a maioria dos compostos. Como resultado, períodos relativamente longos são necessários para compostos com coeficientes de partição comparativamente mais altos. Então, é possível que, em muitos casos com compostos de pesos moleculares mais altos, o equilíbrio pode não ser alcançado e a bioacumulação obtida seja menor do que seria esperado. Isso significa que a cinética e outros fatores necessitam ser levados em consideração

para um entendimento claro do comportamento dos xenobióticos que podem bioacumular. Também, com a biota no ecossistema aquático real, o comportamento da bioacumulação deve diferir do obtido em experimentos de laboratório, devido às diferentes rotas de absorção, tempo de exposição etc.

TABELA 1. Características gerais de xenobióticos que exibem bioacumulação (Connell, 1990b).

CARACTERÍSTICAS	ASPECTOS QUE PROMOVEM BIOACUMULAÇÃO
Estrutura química	<b>Alta capacidade:</b> alta proporção de ligações C-C (alifática), C-C (aromática), C-H e C-halogênio.  <b>Capacidade limitada:</b> baixa proporção das ligações acima e presença de uma variedade de grupos funcionais.
Peso molecular	>100 dando uma capacidade máxima em torno de 350, declinando para uma muito baixa capacidade em torno de 600.
Dimensão molecular	Diâmetro <9,5 Å, área superficial molecular entre 208 a 460 Å <sup>2</sup> e volume molecular entre 260 e 760 Å <sup>3</sup> .
Estabilidade	Resistência à degradação refletida na persistência no solo, na ordem de anos.
Log K <sub>ow</sub>	>2 atingindo a capacidade máxima em torno de 6 e o declínio a uma capacidade muito baixa em torno de 10-12.
Solubilidade em água (mol/m <sup>3</sup> )	< 18 atingindo um máximo em torno de 0,002 e declínio da capacidade em valores mais baixos.
Grau de ionização	Muito baixo.

Lech & Bond (1980) revisaram os mecanismos pelos quais compostos lipofílicos podem ser biologicamente degradados. Uma rápida biodegradação não permite que ocorra bioacumulação como um todo, mas numa velocidade moderada poderá resultar em bioacumulação em extensão limitada. Entretanto, algumas vezes, diferentes velocidades podem ocorrer em diferentes grupos de organismos ou espécies, podendo esperar-se que grupos biologicamente distintos possam exibir diferentes fatores de bioacumulação para o mesmo composto.

### III. 1. 1. 1. Características moleculares básicas

Peso molecular (PM) é uma característica fundamental da molécula e tem uma relação muito vaga com a bioacumulação. Foi verificado que entre 150 compostos a bioacumulação foi significativa quando o peso molecular estava em torno de 100, atingindo um máximo ao redor de 350 e declínio com pesos moleculares mais altos (Brooke *et al.*, 1986). Entretanto Zitko (1980) sugere que compostos bioacumuláveis têm um limite superior de PM de 600, baseando seus dados nas cloroparafinas, hexabromobenzeno e PCBs.

Segundo autores como Opperhuizen *et al.* (1985) e Connel (1990b), o peso molecular não é um indicador muito confiável para o comportamento da bioacumulação, e sugerem que o conceito de permeação para bioacumulação requer "buracos" na superfície externa da membrana hidrofílica. Por um lado, o transporte da molécula é dependente da quantidade e tamanho dos "buracos" na membrana e, por outro, do tamanho molecular do composto. Esses autores sugerem que há uma perda da capacidade permeadora da membrana para moléculas hidrofóbicas com diâmetros maiores do que 9,5 Å (Angstrom). Assim, independentemente do peso molecular, compostos com diâmetro maior do que 9,5 Å não são esperados que bioacumulem, porém o diâmetro molecular geralmente está relacionado com o peso molecular.

A importância do peso molecular como característica de compostos que exibem bioacumulação provavelmente reflete a importância do tamanho da molécula nesse processo. As moléculas não eletrolíticas, com áreas superficiais entre 208 a 460 Å<sup>2</sup>, e volumes moleculares entre 260 a 760 Å<sup>3</sup>, estão na faixa de tamanho que usualmente apresentam bioacumulação (Connell & Schürmann, 1988).

### III. 1. 1. 2. Características estruturais e estabilidade dos xenobióticos

Os compostos que apresentam uma alta capacidade de bioacumulação mostram uma pequena diversidade na estrutura química e a maioria pertence ao grupo dos hidrocarbonetos clorados e poliaromáticos. Um número limitado de ligações químicas está presente nestes grupos: alifáticas C-C, aromáticas C-C, C-H, C-Cl (ou outro halogênio), que estão entre as ligações mais estáveis existentes em compostos orgânicos e conferem excepcional estabilidade aos compostos. Uma presença limitada de outras ligações pode aparecer em alguns compostos.

Assim como a estrutura química e os tipos de ligações têm influência na bioacumulação, outros aspectos estruturais, como a estereoquímica,

são também importantes. Entre os PCBs, vários autores encontraram influências da conformação sobre a quantidade do composto que é bioacumulado. A conformação dos PCBs é influenciada pelos xenóforos Cl. Quando os xenóforos, cloro, estão na posição 2, 6 e 2', 6', na conformação da molécula os dois anéis aromáticos não são coplanares, tendo um ângulo ao redor de 90° um em relação ao outro. Shaw & Connell (1984) desenvolveram um conjunto de coeficientes de correção para introduzir os efeitos dos fatores estereoquímicos na bioacumulação. Um declínio substancial na bioacumulação foi observada para compostos com átomos de cloro nas posições 2, 6, 2', 6'.

### III. 1. 1. 3. Lipofilicidade

Compostos com alta capacidade de bioacumulação usualmente contêm ligações alifáticas e aromáticas e, como estas são muito estáveis, são relativamente não polares e originam compostos não polares. Esses compostos apolares têm baixa solubilidade em água e alta solubilidade em gordura e são os que mais comumente bioacumulam na biota. A bioacumulação de xenobióticos aumenta com o aumento da lipofilicidade, a qual é convenientemente medida pelo coeficiente de partição octanol-água,  $K_{ow}$ , que é a relação entre a concentração no octanol dividida pela concentração na água, para um composto distribuído entre estas duas fases no equilíbrio, assumindo que só ocorre dissolução e não ocorrem outras interações (Atlas & Bartha, 1993).  $K_{ow}$  é muito útil para descrever o comportamento ambiental de um composto e é uma propriedade que pode ser usada para quantificar a capacidade de bioacumulação de um composto. Para compostos que têm potencial de bioacumulação, o  $K_{ow}$  normalmente varia entre 100 e 10 milhões. Como esses números são muito altos,  $K_{ow}$  é usualmente expresso como  $\log K_{ow}$ , dando uma faixa de valor entre 2 e 7 para a maioria dos compostos de interesse (Connell, 1990b).

Foi observado também que a solubilidade em água está relacionada ao  $K_{ow}$  pela equação geral:  $K_{ow} = a \cdot \text{constante} / \text{solubilidade em água}$  e, portanto, a bioacumulação aumenta com o declínio da solubilidade. Quando a solubilidade é menor que 0,02 a 0,002 moles/m<sup>3</sup>, há declínio da bioacumulação (Mackay, 1982 citado por Connel, 1990b).

### III. 1. 1. 4. Características da ionização

A lipofilicidade de compostos apolares pode ser substancialmente reduzida pela introdução de um grupo polar ou ionizável na molécula, como por exemplo grupos ácido, fosfato ou sulfonato. Esser & Moser (1982) observaram que o  $\log K_{ow}$  do naftaleno foi reduzido de

um valor aproximado de 3,5 para -1,5 pela introdução do grupo sulfonato. É esperado que a mudança de lipofilicidade se reflita na capacidade relativa de bioacumulação desses dois compostos.

Connell (1990b) relata vários outros efeitos das condições químicas sobre o valor de  $\log K_{ow}$ . Para informações mais detalhadas sobre esses efeitos consultar o referido autor.

### III. 1. 2. Fatores de bioacumulação

O termo usado para quantificar a bioacumulação de sedimentos no equilíbrio é o **fator de bioacumulação** (BAF), definido como a concentração química no organismo (composto químico em ng/g de tecido) dividido pela concentração no sedimento (ng/g de sedimento). Para o cálculo desse fator pode ser usado tanto o peso seco quanto o peso úmido, sendo que o uso do primeiro elimina a variabilidade que pode ocorrer, devido à hidratação do sedimento ou do tecido. O BAF é um número sem unidade entre zero e infinito (Barron, 1995).

### III. 2. Bioconcentração de Moléculas Xenobióticas

Bioconcentração é o acúmulo, pelos animais aquáticos, de compostos químicos presentes na água, através de rotas não alimentares. A bioconcentração pode ser vista simplesmente como o resultado de taxas competitivas de captação e eliminação de xenobióticos. Segundo Barron (1990), os passos do processo de captação incluem a distribuição do xenobiótico da água para o epitélio de absorção (ex. guelra), o movimento dos contaminantes através das barreiras (ex. muco, membrana) e a distribuição interna dos xenobióticos pelo fluido circulatório. Em geral os compostos químicos hidrofóbicos difundem através das células (permeação), enquanto os metais movem-se intracelularmente ou através de canais intracelulares (filtração) (Meyer *et al.*, 1980). A captação de um composto químico da água por um animal aquático pode ser vista como uma série de passos, onde cada qual pode governar a taxa de captação tanto quanto a extensão da acumulação (Hayton & Barron, 1990).

A partição de um xenobiótico é um determinante importante na bioconcentração. Os lipídeos são sítios importantes de armazenamento, devido à grande massa, distribuição extensiva e alta afinidade e capacidade para ligar compostos orgânicos hidrofóbicos. Bikel (1984) concluiu que, enquanto a lipofilicidade do composto químico determina a ligação aos lipídios, as características estruturais dos compostos químicos são importantes na determinação das ligações entre os contaminantes e outras macromoléculas.

No caso de compostos químicos solúveis em gordura, o processo de acumulação tem muita semelhança com o coeficiente de partição e é relacionado com o coeficiente de partição octanol-água do químico. As gorduras de reserva acumulam a maior parte dos inseticidas, principalmente DDT, concentrando-se por vezes de 100 a 150 vezes (Dorst, 1973). Portanto, numa cadeia alimentar um organismo com alto nível trófico pode acumular uma concentração bem maior do que aquela que poderia ser encontrada no ar, água e alimentos que serviram de base à sua cadeia alimentar.

Os inseticidas organoclorados em sua maioria são bioconcentrados através dos alimentos ou no ambiente. Assim, muitos resíduos podem ficar acumulados no corpo dos organismos. Mesmo pequenos invertebrados, como os protozoas aquáticos, podem bioconcentrar pesticidas, como o dieldrin, o dimetoato e o permetrin em seus tecidos a níveis que são 1.000 a 3.500 vezes maiores que os da água na qual eles vivem (Bhattacharjee *et al.*, 1988). Minhocas e moluscos acumulam resíduos de inseticidas organoclorados a níveis muito mais altos do que os encontrados no solo onde eles vivem (Edwards & Thompson, 1973). Diferentes tipos de organismos aquáticos também têm sido descritos como acumuladores de compostos lipofílicos.

### III. 2. 1. Estimativa da bioconcentração

O termo usado para quantificar a magnitude da bioconcentração é o **fator de bioconcentração** (BCF). O BCF é definido como a constante de proporcionalidade relativa à concentração de um composto químico em um animal aquático para a concentração na água sob condições de equilíbrio (ex.: peixe/água) (Vieth *et al.*, 1979). O BCF é uma estimativa da tendência de um xenobiótico acumular em animal aquático em condições de equilíbrio, com valores entre zero e o infinito. A unidade do BCF é expressa por volume de água por unidade de peso de tecido (ex.: ml/g) e pode ser visto conceitualmente como o volume de água que contém a quantidade do xenobiótico concentrado em 1 g de tecido animal (Barron *et al.*, 1990).

Os procedimentos usados para estimar o BCF são: métodos de equilíbrio, métodos de modelagem cinética e método da interrelação quantitativa estrutura-atividade (QSAR). O método do equilíbrio expõe o organismo a uma concentração constante do xenobiótico presente na água até o equilíbrio ser alcançado. O método cinético aplica uma representação compartimentalizada do organismo e estima o BCF pela taxa constante de captação e eliminação (ex.:  $BCF = K_{in}/K_{out}$ ) ou constante baseada na fugacidade. O método QSAR estima o BCF das propriedades fisi-

cas do químico. A maioria dos modelos QSAR é regressão linear das log transformações de BCF e a hidrofobicidade do químico, indexado pelo coeficiente de partição octanol-água (Landrum *et al.*, 1992b; Barron *et al.*, 1990; Isnard & Lambert, 1988).

### III. 3. Biomagnificação

A transferência de um xenobiótico do alimento para um organismo é definida como biomagnificação. Nem sempre há ingestão ou contato direto do organismo não alvo com o pesticida, mas este pode ser absorvido por um ser vivo no organismo no qual se concentrará, passando em seguida para o corpo de outro animal predador do primeiro, podendo assim intoxicá-lo, se este for sensível às doses em questão. O caso mais conhecido é o do *Turdus migratorius* (Barker, 1958; citado por Freedman, 1995). Aplicações maciças de DDT foram efetuadas nos Estados Unidos para evitar que os olmos fossem dizimados por uma doença transmitida por certos insetos. A fração de DDT que caiu no solo foi ingerida por minhocas muito pouco sensíveis a ele, mas que o concentraram em seus tecidos. Os tordos, consumindo as minhocas em grandes quantidades, ingeriram, muito tempo após o tratamento, doses consideráveis de substâncias tóxicas, às quais seu cérebro e sistema nervoso foram particularmente sensíveis. A morte surgiu após paralisias locomotoras e convulsões. A mortalidade dos tordos migradores foi, desse modo, extremamente elevada, atingindo 86% em certos casos, após um período de latência de três semanas depois do tratamento.

Tal concentração de substâncias tóxicas processa-se igualmente nas biocinases aquáticas, ao longo das cadeias alimentares, indo dos organismos planctônicos aos peixes e, em seguida, às aves aquáticas. Foi o que demonstraram Hunt & Bischoff (1960) citados por Freedman (1995), no caso de um lago da Califórnia (Clear Lake), tratado com DDD (ou TDE, metabólito do DDT) a partir de 1949, para destruir as larvas de mosquito. Aplicado em doses de uma parte para 70 milhões, o produto concentrou-se passando do meio líquido para o plâncton (5:1 milhão), em seguida para os peixes comedores de plâncton e para os peixes carnívoros, atingindo finalmente as aves que comem os peixes (mergulhões), em doses variando de 40 a 2.500 partes para 1 milhão, provocando uma mortalidade extremamente elevada em sua populações.

Devido ao caráter lipofílico desses compostos, as quantidades diminutas dissolvidas na água sofrem partição nos lipídios dos microrganismos procarióticos e eucarióticos. A concentração em suas células, quando comparadas à do meio circundante, pode ser aumentada entre 1 a 3 ordens de magnitude às prevalentes no ambiente (Fig. 6). Os mem-

bro dos níveis tróficos imediatamente superiores ingerem estes microrganismos. Somente 10 a 15% da biomassa são transferidos para o nível trófico mais alto, o resto é dissipado na respiração. O poluente lipofílico persistente, entretanto, não é degradado ou excretado numa extensão significativa e, então, é preservado praticamente sem perdas na pequena biomassa do segundo nível trófico. Conseqüentemente, sua concentração aumenta quase uma ordem de magnitude. A mesma coisa ocorre sucessivamente até níveis tróficos mais altos. O nível trófico máximo, composto por aves de rapina, mamíferos carnívoros, grandes peixes predatórios, pode ter no corpo uma quantidade de poluentes ambientais que excede a concentração ambiental por um fator de  $10^4$ - $10^6$  (Atlas, 1990).

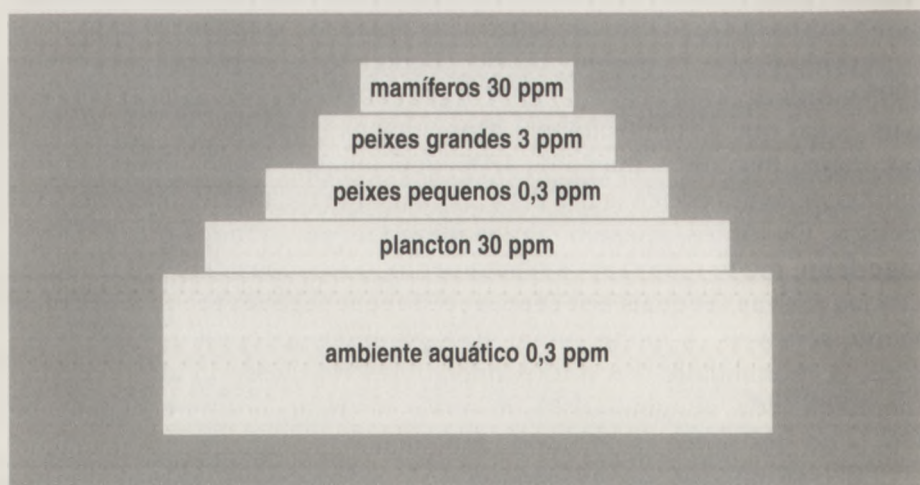


FIGURA 6. Biomagnificação do DDT. Concentrações muito pequenas de DDT dissolvidas podem passar ao plancton. Aumenta a concentração do contaminante devido ao tamanho progressivamente menor da biomassa de um nível trófico ao seguinte (Atlas, 1990).

Se o poluente é uma substância biologicamente ativa como um pesticida, em tais níveis ele pode causar a morte ou debilitar seriamente o organismo afetado. Ao DDT e a outros hidrocarbonetos clorados têm sido imputada a morte ou a não reprodução de muitas aves de rapina. Esses inseticidas, quando captados por essas aves, podem causar afinamento da casca do ovo e, conseqüentemente, problemas na reprodução (Cooper, 1991; Edwards, 1973a,b). No caso de aplicação local, mesmo em uma cadeia alimentar relativamente curta, como uma vegetação pulverizada → minhoca → pássaro, pode ser destrutivo para as aves. Por ser a alimentação humana proveniente de diferentes níveis tróficos, ele tem a posição menos exposta quando comparado a um animal total-



mente carnívoro. Todavia, antes do uso restrito do DDT, a média individual dos Estados Unidos, sem exposição ocupacional era de 4 a 6 ppm de DDT e seus metabólitos (Atlas & Bartha, 1993). Embora essa quantidade não tenha sido considerada extremamente perigosa, tornou-se clara a possibilidade de um aumento na contaminação dos níveis mais altos da cadeia trófica da ecossfera e isso levou à restrição do uso do DDT nos Estados Unidos e na maioria dos países desenvolvidos.

Com a queda do uso de inseticidas organoclorados tem sido registrada uma recuperação nas populações de muitas espécies de aves de rapina, mesmo que ainda ocorram resíduos em seus tecidos e ovos (Edwards, 1993). Outros autores, como Fleming *et al.* (1983), citados por Edwards (1993), observaram que, apesar da contaminação ambiental por organoclorados ter diminuído, alguma coisa ainda permaneceu e afetou as espécies de aves predadoras. Stickel (1984), citado por Edwards (1993), relatou também níveis altos de resíduos de DDT em aves de certas partes dos Estados Unidos, enquanto White & Krynitsky (1986) observaram quantidades consideráveis de resíduos de DDT em aves, lagartos e morcegos do Novo México e Texas, treze anos após ter sido banido o uso do DDT.

Os inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides, que substituíram amplamente os organoclorados, tendem a ter toxicidade mais aguda para as aves, mas não são armazenados nos tecidos destas em grandes quantidades.

### III. 3. 1. Etapas da biomagnificação

O processo fundamental na transferência trófica de um xenobiótico é a ingestão através da dieta. Nos peixes e nos mamíferos, a absorção ocorre primeiramente no intestino. A absorção intestinal de xenobióticos hidrofóbicos é dependente do conteúdo lipídico da fonte alimentar. Os triglicerídeos da dieta geralmente aumentam a biodisponibilidade e a absorção do xenobiótico parece ocorrer concomitantemente à absorção lipídica (Barron, 1995).

Nos vertebrados, os lipídeos e os xenobióticos contaminantes são inicialmente absorvidos por absorção passiva e provavelmente transporte facilitado (Van Veld, 1990). Os xenobióticos associados aos lipídeos são processados em vacúolos de gordura e quilomícrons (mamíferos) ou lipoproteínas de baixa densidade (peixes), que são subseqüentemente liberados na linfa e circulação sistêmica (Sire *et al.*, 1981).

### III. 3. 2. Fator de biomagnificação

Existem situações em que a acumulação de compostos xenobióticos não pode ser descrita por uma equação de equilíbrio relativamente sim-

ples entre o organismo e a água que o rodeia. A relação entre as concentrações no organismo e na fonte é usada para caracterizar o comportamento da bioacumulação de um composto. Quando a fonte é um alimento, a relação entre a concentração do composto no alimento ( $C_F$ ) e o consumidor ( $C_C$ ) é o fator de biomagnificação ( $B_F$ ).

O fator de biomagnificação é definido como a relação entre  $C_F$  e  $C_C$ , isto é,  $C_F/C_C$ , para um determinado tipo de alimento e para o consumidor ou grupo de consumidores específicos, num período determinado de tempo e sob condições ambientais especificadas. Normalmente, os valores obtidos pelo fator de biomagnificação são relativamente baixos, não havendo necessidade do uso de logaritmos (Connell, 1990a).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of the fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R., ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.113-127.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and biorremediation**. San Diego: Academic Press, 1994. 302p.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of pesticides. In: GUENZI, W.D., ed. **Pesticides and their effects on soil and water**. Madison: Soil Science Society of America, 1966. p.78-84. (ASA Special Publication, 8)
- ALEXANDER, M. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, p.611-647, 1973.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 467p.
- ATLAS, M.R.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 3.ed. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993. 583p.
- ATLAS, R.M. **Microbiologia: fundamentos y aplicaciones**. Mexico: Compania Editorial Continental, 1990. 887p.
- AUDUS, L.J. Microbial breakdown of herbicides in soil. In: WOODFORD, E.K.; SAGAR, G.R., ed. **Herbicides and the soil**. Oxford: Blackwell, 1960. p.1-19.
- BARRON, M.G. Bioaccumulation and bioconcentration in aquatic organisms. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON JR., G.A.; CAIRNS JR., J., ed. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers/CRC Press, 1995. p.652-666.
- BARRON, M.G. Bioconcentration. **Environmental Science and Technology**, v.24, p.1612-1618, 1990.
- BARRON, M.G.; STEHLY, G.R.; HAYTON, W.L. Pharmacokinetic modeling in aquatic animals I. Models and concepts. **Aquatic Toxicology**, v.18, p.61-65, 1990.
- BHATAGNAR, P.; KUMAR, S.; LAL, R. Uptake and bioconcentration of dieldrin, dimethoate and permethrin by *Tetrahymena pyriformis*. **Water, Air and Soil Pollution**, v.40, n.3/4, p.345-349, 1988.
- BICKEL, M.H. The role of adipose tissue in the distribution and storage of drugs. **Progress in Drug Research**, v.28, p.273-277, 1984.
- BIERMAN, V.J. Equilibrium partitioning and biomagnification of organic chemicals in benthic animals. **Environmental Science and Technology**, v.24, p.1407-1412, 1990.
- BROOKE, D.N.; DOBBS, A.J.; WILLIAMS, N. Octanol: water partition coefficients (P): measurement estimation and interpretation, particularly for chemicals with  $P > 10^5$ . **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.11, p.251-255, 1986.

- CASTRO, T.F.; YOSHIDA, T. Effect of organic matter on the biodegradation of some organochlorine insecticides in submerged soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.20, p.363-368, 1974.
- CHAPMAN, R.A.; HARRIS, C.R. Enhanced degradation of insecticides in soil: Factors influencing the development and effects of enhanced microbial activity. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R., ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p.92-96.
- CLAY, D.V.; POMEROY, R. Soil, adsorption, availability, mobility and persistence of suspension concentrate and wettable powder formulations of herbicides. In: CLAY, D.V.; POMEROY, R. ed. **Factors affecting herbicidal activity and selectivity**. Wageningen: European Weed Research Society, 1988. p.301-325.
- CONNELL, D.W. Bioaccumulation behaviour of persistent organic chemicals with aquatic organisms. **Review of Environmental Contamination and Toxicology**, v.102, p.117-154, 1988.
- CONNELL, D.W. Evaluation of the bioconcentration factor, biomagnification factor, and related physico-chemical properties of organic compounds. In: CONNELL, D.W., ed. **Bioaccumulation of xenobiotic compounds**. Boca Raton: CRC Press, 1990a. p.9-45.
- CONNELL, D.W. General characteristics of organic compounds which exhibit bioaccumulation. In: CONNELL, D.W., ed. **Bioaccumulation of xenobiotic compounds**. Boca Raton: CRC Press, 1990b. p.47-57.
- CONNELL, D.W.; SCHÜRMMANN, G. Evaluation of various molecular parameters as predictors of bioconcentration in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 15, p.324-328, 1988.
- COOPER, K. Effects of pesticides on wildlife. In: HAYES, W.J., LAWES, E.R., ed. **Handbook of pesticide toxicology**. New York: Academic Press, 1991. p.463-496.
- DI GRAZIO, P.M.; BLACKCURN, J.W.; BIENKOWSKI, P.R.; HILTON, B.; REED, G.D.; KING, J.M.H.; SAYLER, G.S. Development of a systems analysis approach for resolving the structure of biodegrading soil systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24/25, p.237-252, 1990.
- DORST, J. **Antes que a natureza morra: por uma ecologia politica**. São Paulo: Edgard Blucher/Editora da Universidade de São Paulo, 1973. 394p.
- EDWARDS, C.A. The impact of pesticides on the environment. In: PIMENTEL, D.; LEHMAN, H., eds. **The pesticide question: environment, economics and ethics**. New York: Chapman & Hall, 1993. p.13-46.
- EDWARDS, C.A.; THOMPSON, A.R. Pesticides and the soil fauna. **Residue Review**, v.45, p.1-79, 1973.
- EDWARDS, C.A. **Environmental pollution by pesticides**. London: Plenum Press, 1973a. 542p.
- EDWARDS, C.A. Insecticide residues in soils. **Residue Review**, v.13, p.83-132, 1966.
- EDWARDS, C.A. **Persistent pesticides in the environment**. 2.ed. Cleveland: CRC Press, 1973b. 170p.
- ESSER, H.O.; MOSER, P. An appraisal of problems related to the measurement and evaluation of bioaccumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.6, p.131-136, 1982.
- FELSOT, A.S.; PEDERSEN, W.L. Pesticidal activity of degradation products. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R., ed. **Pesticide transformation products: fate and significance in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. p.172-187.
- FERRIS, I.G.; HAIGH, B.M. Herbicide persistence and movement in Australian soils: implications for agriculture. In: ALTMAN, J., ed. **Pesticide interactions in crop production: beneficial and deleterious effects**. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- FREEDMAN, B. **Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1995. 606p.
- FRESHE, H. The perspective of persistence. In: SYMPOSIUM ON PERSISTENCE OF INSECTICIDES AND HERBICIDES, 1976, Croydon. **Proceedings**. Croydon: British Crop Protection Council, 1976. p.1-39. (BCPC Monograph, 17).
- FRYER, J.D.; KIRKLAND, K. Field experiments to investigate long-term effects of repeated applications of MCPA, triallate, simazine and linuron: report after 6 years. **Weed Research**, v.10, p.133-158, 1970.
- HAMELINCK, J.L.; WAYBRANT, R.C.; BALL, R.C. A proposal: Exchange equilibria control the degree chlorinated hydrocarbons are biologically magnified in lentic environments. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.100, p.207-210, 1971.

- HAYTON, W.L.; BARRON, M.G. Rate limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.9, p.151-155, 1990.
- HILL, I.R. Microbial transformation of pesticides. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L., ed. **Pesticide microbiology**. London: Academic Press, 1978. p.669-730.
- HILTBOLD, A.E. Persistence of pesticides in soil. In: GUENZI, W.D., ed. **Pesticides in soil and water**. Madison: Soil Science Society of America, 1974. p.203-222.
- HIMEL, C.M.; LOATS, H.; BAILEY, G.W. Pesticides sources to the soil and principles of spray physics. In: CHENG, H.H. ed. **Pesticide in the soil environment: processes, impacts and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.7-50.
- HOLUM, J.R. **Topics and terms in environmental problems**. New York: John Wiley & Sons, 1977. 729p.
- HORVATH, R.S. Microbial co-metabolism and degradation of organic compounds in nature. **Bacteriology Review**, v.56, p.146-155, 1972.
- IBAMA. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos** 2. ed. Brasília, 1990. 351p.
- ISNARD, P.; LAMBERT, S. Estimating bioconcentration factors from octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. **Chemosphere**, v.17, p.21-34, 1988.
- KEARNEY, R.C.; NASH, R.G.; ISENSEE, A.R. Persistence of pesticide residues in soil. In: MILLER, M.W.; BERG, G.G., ed. **Chemical fallout: current research on persistent pesticides**. Springfield: Charles C. Thomas, 1969.
- KHAN, S.U. Kinetics of hydrolysis of atrazine in aqueous fulvic acid solution. **Pesticide Science**, v.9, n.1, p.39-43, 1978a.
- KHAN, S.U. The interaction of organic matter with pesticides. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U., ed. **Soil organic matter: developments in soil science**. Amsterdam: Elsevier, 1978b. p.137-173.
- LANDRUM, P.F.; EADIE, B.J.; FAUST, W.R. Variation in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Diporeia* (spp) with sediment aging. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.11, p.1197-1201, 1992a.
- LANDRUM, P.F.; LEE II, H.; LYDY, M. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.11, p.1709-1712, 1992b.
- LANGENBACH, T. A biacumulação e a persistência de xenobiontes no ambiente. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, H.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE D. de S., ed. **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI. III Simposio Brasileiro sobre Microbiologia do solo**. Londrina: Anais... IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.119-136.
- LECH, J.J.; BOND, J.R. Relationship between biotransformation and the toxicity and fate xenobiotic chemicals in fish. **Environmental Health Perspectives**, v.34, p.115-118, 1980.
- LICHTENSTEIN, E.P.; SCHULTZ, K.R. Residues of aldrin and heptachlor in soil and their translocation into various crops. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.33, p.584-589, 1965.
- LICHTENSTEIN, E.P.; SCHULTZ, K.R.; FUHREMANN, T.W.; LIANG, T.T. Degradation of aldrin and heptachlor in field soils during a ten-year period. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.18, p.100-106, 1970.
- MATSUMURA, F. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In: MATSUMURA, F.; KRISHNA MURTI, C.R., ed. **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum Press, 1982. p.67-87.
- MEYER, S.E.; MELMON, K.L.; GILMAN, A.G. Introduction: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A., ed. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: MacMillan, 1980. cap.1.
- MOORMAN, T.B. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological and management effects. In: HATFIELD, J.L.; STEWART, B.A., eds **Soil biology: effects on soil quality**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p.121-163.
- NASH, R.G.; WOOLSON, E.A. Persistence of chlorinated hydrocarbon insecticides in soils. **Science**, v.157, p.924-927, 1967.

- NOMURA, N.S.; HILTON, H.W. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugar-cane soils. **Weed Research**, v.17, p.113-121, 1977.
- OPPERHUIZEN, A.; VELDE, E.W.; GOBAS, F. A. P.C.; LIEM, D. A.K.; STEEN, J.M.D.; HUTZINGER, O. Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. **Chemosphere**, v.14, p.1871-1874, 1985.
- PAUL, E.A; CLARCK, F.E **Soil microbiology and biochemistry**, San Diego: Academic Press, 1989 275p.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F **Soils and environmental quality** Boca Raton: Lewis Publishers/ CRC Press, 1994. 313p.
- RAYMOND, R.L.; JAMISON, V.W.; HUDSON, J.O. Hydrocarbon oxidation in microbial systems. **Lipids**, v.6, p.453-457, 1971.
- ROADHOUSE, F.E.B.; BIRK, L.A Penetration of and persistence in soil of the herbicide 2-chloro-4,6 bis (ethylamino)-S- triazine (simazine). **Canadian Journal of Plant Science**, v.41, p.252-260, 1961.
- ROETH, F.W.; WILSON, R.G.; MARTIN, A.R.; SHEA, P.J. Enhanced carbamothiate herbicide degradation: research in Nebraska. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. ed **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1990. p.23-26.
- SETHUNATHAN, N.; ADHYA, T.K.; BARIK, S.; SHARMILA, M. Degradation products of commonly used insecticides in Indian rice soils. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R., ed. **Pesticide transformation products: fate and significance in the environment**. Washington, D.C: American Chemical Society, 1991. p.43-60.
- SHAW, G.R.; CONNELL, D.W. Physicochemical properties controlling polychlorinated biphenyl (PCB) concentration in aquatic organisms. **Environmental Science and Technology**, v.18, p.18-23, 1984.
- SHELTON, D.R.; PARKIN, T.B. Effect of soil moisture on sorption and biodegradation of carbofuran in soil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, p.2963-2068, 1991.
- SIRE, M.F.; LUTTON, C.; VERNIER, J.M. New views on intestinal absorption of lipids in telostean fishes: An ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. **Journal of Lipid Research**, v.22, p.81-85, 1981.
- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R.; RACKE,K.D. Degradation of pesticides in soil as influenced by the presence of hydrolysis metabolites. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B24, p.457-478, 1989.
- SOMASUNDARAM, L; COATS, J.R.; RACKE,K.D.; STAHR, H.M. Application of the microtox system to assess the toxicity of pesticides and their hidrolysis metabolites. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.44, p.254-259, 1990.
- STOTZKY, G. Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v.2, p.59-137, 1972.
- VAN VELD, P.A. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. **Review of Aquatic Science**, v.2, p.185-189, 1990.
- VIETH, G.D.; DEFOE, D.L. BERGSTEDT, B.V. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.36, p.1040-1043, 1979.
- WHITE, D.H.; KRYNITSKY, A.J.; Wildlife in some areas of New Mexico and Texas accumulate elevated DDE residues. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.15, p.149-157, 1986.
- WOLFE, N.L.; MINGELGRIN, U.; MILLER, G.C. Abiotic transformations in water, sediments and soils. In: CHENG, H.H, ed. **Pesticides in the soil environment: processes, impact and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.103-168.
- ZITKO, V. Metabolism and distribution by aquatic animals. In: HUTZINGER, O., ed. **Handbook of environmental chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1980. p.221-234.





# 4

## DEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS

Regina Tereza Monteiro

Centro de Energia Nuclear na Agricultura — CENA  
Caixa Postal 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

### INTRODUÇÃO

O solo é utilizado para produzir mais de 90% do nosso alimento. Devido à presença de competidores das culturas, a utilização de pesticidas tem se tornado comum no manejo de plantas, insetos e fungos que apresentam significado econômico.

Atualmente, o Brasil representa o quinto mercado consumidor mundial de pesticidas, com cerca de 250 ingredientes ativos registrados no IBAMA. Globalmente são utilizados milhões de quilos de pesticidas por ano, com um mercado estimado em 27 bilhões de dólares. O maior consumidor é os Estados Unidos, com mais de 600 produtos registrados e 371 milhões de quilogramas aplicados em 1991 (Aspelin *et al.*, 1992).

Os herbicidas, por serem aplicados, em sua maioria, no solo, têm causado preocupações acerca de contaminações de águas. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) constatou recentemente a presença de 46 diferentes pesticidas em águas subterrâneas de 26 estados (Moorman, 1990). A maioria desses produtos são herbicidas e sua origem é atribuída principalmente a atividades agrícolas.

As lavouras brasileiras de maior consumo dos vários grupos destes produtos químicos são: soja, citros, cana-de-açúcar, hortaliças (tomate e batata), arroz, algodão, cereais, café, milho e frutas (Paulino, 1993).

A habilidade do solo de desintoxicar ou ligar esses produtos ou retardar-lhes o movimento, ajuda a reduzir a contaminação do ambiente. A degradação desses produtos pelos microrganismos do solo é considera-

do o fator principal que determina a persistência e o destino de um pesticida no solo.

A disponibilidade de um pesticida para as plantas, animais ou microrganismos no solo é determinada, principalmente, pela extensão de adsorção e taxa de desorção das partículas sólidas do solo (Anderson, 1984). Essas propriedades são dadas pela estrutura molecular do pesticida, sua concentração no solo, além da temperatura, umidade e características físico-químicas do solo.

## AMBIENTE DO SOLO

O solo é um ecossistema complexo e, do ponto de vista físico, é composto de material mineral (argila, silte e areia), poros cheios de ar ou água e matéria orgânica. Esta é um componente ativo e importante, no qual grosseiramente três frações podem ser delimitadas. A primeira delas é um componente macroscópico, particulado, composto de restos de plantas e animais em diferentes estágios de decomposição. A segunda é uma reunião de vários compostos orgânicos simples disponíveis, oriundos dos resíduos vegetais e animais (carboidratos, aminoácidos, proteínas). A terceira é um componente complexo, colorido escuro, largamente aromático e polimérico, denominado húmus, relativamente resistente à degradação (Cerri *et al.*, 1992). O período de reciclagem (*turnover*) dos detritos orgânicos, compostos solúveis e húmus é da ordem de 2-5 anos, 5-25 anos e 250-2500 anos, respectivamente (Stevenson, 1982).

Já em sentido prático, o solo pode ser visto como um vasto local de reciclagem, continuamente recebendo e reduzindo compostos de carbono e oxidando-os a  $\text{CO}_2$  e água. O solo é amplamente habitado por populações microscópicas de bactérias, fungos, protozoários e algas, e macroscópicas, tais como anelídeos e artrópodes, formando uma complexa teia de comunidade alimentar. A microflora do solo tem papel fundamental nos ciclos globais de nutrientes e carbono, participando de processos importantes como a nitrificação, desnitrificação e mineralização do carbono. Dos organismos ativos desse esforço de reciclagem, os fungos são particularmente efetivos e versáteis, possuindo a capacidade enzimática de degradar substratos bastante complexos e poliméricos, por exemplo, polissacarídeos, tais como celulose, hemicelulose, lignina, amido, quitina e glicogênio; e proteínas, como caseína, queratina e albumina. Por outro lado, as bactérias, em geral, são efetivas na degradação de produtos solúveis simples (Racke, 1990).

A degradabilidade é vista como um atributo desejável nos pesticidas atuais, pois a persistência prolongada leva à contaminação de outros



ambientes e também de águas subterrâneas. A importância do solo, como comunidade microbiana, em mediar a degradação de pesticidas, tem sido reconhecida desde muito tempo. A atividade microbiana foi mostrada por Audus, em 1939, como a responsável pela degradação do herbicida 2,4-D, em solo (Racke, 1990). Desde essa primeira descoberta tem havido um número considerável de trabalhos, mostrando a importância da degradação microbiana nas transformações dos pesticidas no solo.

Quando um pesticida chega ao solo, seu tempo de residência depende das propriedades físico-químicas desse solo, das forças de sorção, dinâmica do fluxo de água como transporte de soluto e de sua taxa de degradação. Isso é devido à partição do pesticida entre as três fases do solo, ou seja, partículas sólidas, solução e gases (Glotfelty & Schomburg, 1989). As partículas sólidas, de material mineral orgânico, ou seja, argila, silte, areia e matéria orgânica, são importantes no processo de adsorção dos pesticidas ao solo. O tipo e a concentração dos solutos na solução circundante, o tipo e a quantidade de minerais de argila e a quantidade de matéria orgânica, pH, temperatura e as propriedades do composto químico envolvido são também importantes, assim como o tipo de cátion que está saturando a argila (por exemplo, íons de Fe, Ca, Al ou H (Alexandre, 1994)). Portanto, em estudos de degradação, a quantidade de argila e matéria orgânica, o pH e a capacidade de troca catiônica são qualidades que devem ser levadas em consideração, principalmente quando se quer comparar a velocidade de degradação entre solos.

Quanto mais argiloso um solo, maior é o grau de adsorção e, se houver a presença de argila de grade 2:1, a adsorção será ainda maior. Havendo elevado teor de matéria orgânica, a adsorção será aumentada, porque tanto as argilas como os materiais húmicos possuem grande área de superfície por unidade de volume. Por exemplo, um grama de argila pode ter uma superfície de 20 a 80 m<sup>2</sup> (Alexandre, 1994).

O conteúdo de água no solo, além de responsável por fenômenos de transporte e absorção de solutos pelas plantas e outros organismos, apresenta competitividade pelos sítios ativos do solo, influenciando o grau de adsorção e toxicidade dos pesticidas (Bailey & White, 1964). Nesse contexto, Dao & Lavy (1968) observaram uma relação inversa entre adsorção de atrazina e o conteúdo de água no solo. Deste modo, baixas condições de umidade favorecem a adsorção do pesticida e, à medida que aumenta o conteúdo de água, diminuem a competição, reduzindo a adsorção das moléculas orgânicas.

A fase gasosa do solo tem composição semelhante à da atmosfera, com algumas diferenças principalmente quanto ao teor de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. O ar do solo ocupa o espaço dos poros que não têm água. A solução do

solo e o ar mantém proporções recíprocas, isto é, ao aumentar um, diminui o outro.

## PROPRIEDADES DOS PESTICIDAS

O comportamento do pesticida no solo e na água é regulado também por propriedades do composto como reatividade ( $P_a$ ), solubilidade em água ( $K_o$ ), pressão de vapor ( $PV$ ) e retenção no solo ( $K_{xc}$ ) (Weber, 1994).

Propriedades como solubilidade e reatividade levam a uma maior adsorção ao solo. No que se refere à solubilidade, quanto mais um pesticida estiver dissolvido na solução do solo, mais será arrastado com a água. Entretanto, a solubilidade não deve ser considerada por si só, mas sim relacionada com as outras propriedades, como a reatividade. Esta está ligada às cargas iônicas ou residuais que a molécula do pesticida apresenta, podendo ter propriedades básicas, ácidas, anfotéricas ou não-ionizáveis. Assim, um pesticida com cargas positivas tende a ser mais fortemente adsorvido aos colóides do solo. O  $pK_a$  ou o logaritmo negativo da constante de dissociação é um índice da força ácido-básica de um composto e é definido como o  $pH$  do qual metade do composto está na forma ionizada e metade na forma não-ionizada. Pesticidas pouco solúveis e de caráter alcalino se adsorvem fortemente. Herbicidas de caráter ácido, como dalapon, são pouco adsorvidos. Além disso, pesticidas solúveis em água são pouco ou quase nada adsorvidos. Pesticidas bastante solúveis mas com caráter alcalino, como hexazinone, ou com carga iônica positiva, como paraquat, são fortemente adsorvidos ao solo (Deuber, 1992). A adsorção também está associada ao caráter hidrofóbico das moléculas. Quanto maior a hidrofobicidade da molécula, maior é a sorção. A extensão dessa retenção é diretamente correlacionada com o coeficiente de partição octanol-água, o qual é expresso como valor  $K_{wo}$ , que é uma medida da hidrofobicidade de compostos.

Weber (1994) relacionou as propriedades e o comportamento dos pesticidas no solo, concluindo que os pesticidas N quaternários, os orgânicos contendo As e P ácidos, os fungicidas orgânicos metálicos, herbicidas dinitroanilinas e reguladores de crescimento, metabólitos de inseticidas organofosforados, piretróides e pesticidas não-iônicos são fortemente adsorvidos pelos colóides do solo e relativamente imóveis. Possuem meia-vida variando de muito curta a muito longa nos solos. Já os herbicidas ácido-carboxílicos e reguladores de crescimento, os ácido-hidróxidos, ácido aminosulfonil, herbicidas amidas e anilidas, pesticidas carbamatos e carbanilatos, fumigantes e pesticidas não-iônicos altamente solúveis na água são fracamente retidos pelos colóides do solo e relativamente móveis no

solo. Pesticidas com propriedades básicas, hidrocarbonetos clorados, feniluréias e tiocarbamatos são retidos em baixa ou alta quantidade e apresentam meia-vida curta ou longa no solo. A relação entre  $K_{oc}$  e  $K_{sp}$  difere entre as várias famílias dos grupos químicos, dependendo das propriedades de ionização e tipos de grupos funcionais presentes.

A estrutura molecular determina o grau que um pesticida entra em partição entre a água e os sólidos do solo. A quantidade dissolvida na solução do solo é, principalmente, um fator da estrutura individual do produto. Aumentando a quantidade de água do solo, aumenta a quantidade total do produto dissolvido na solução do solo. Anderson (1984) mostrou que, aumentando a quantidade de água no solo, a quantidade dos herbicidas diallato e triallato também aumentava, ocorrendo, com isto, aumento da taxa de metabolismo desses produtos. Ao ser adicionada para servir como solvente para os pesticidas, a água, conforme sua quantidade, determina a quantidade de microflora sobrevivente no solo (Anderson, 1984; West *et al.*, 1992).

## ADSORÇÃO

Adsorção é o processo pelo qual a molécula do pesticida é transferida da fase móvel (líquida ou gasosa) para a fase estacionária (sólida). A adsorção é reversível e pode seguir ambas as direções, adsorção ou desorção. É regida pela lei geral da dispersão, segundo a qual, em determinada composição do adsorvente e do adsorvido e sob certas condições externas, como temperatura e pressão, cada substância se distribui de tal forma que seu nível de concentração, em ambas as fases, permanece constante.

A adsorção é geralmente descrita utilizando isotermas de adsorção, em que a quantidade do adsorvido é relacionada com a concentração da espécie adsorvente, na solução em equilíbrio. Experimentalmente, as equações de Langmuir ou de Freundlich são comumente utilizadas para expressar as isotermas de adsorção de um pesticida, num dado solo. O grau de adsorção é julgado, comparando os valores de  $K$ , o qual é um parâmetro importante, determinado através da relação de concentrações entre as substâncias adsorvidas e as que estão dissolvidas. Quanto maior o valor de  $K$ , maior é a capacidade de adsorção da substância pelo solo. A adsorção está relacionada com a mobilidade do produto químico. Alta adsorção geralmente indica baixa mobilidade.

As duas características mais importantes e determinantes na adsorção do pesticida são o conteúdo de matéria orgânica no solo e a solubilidade do composto orgânico (Triegel & Guo, 1994).

O índice de retenção no solo ( $K_{oc}$ ) se refere à capacidade da molécula do pesticida se ligar ao carbono orgânico do solo. Foi inicialmente sugerido como um índice de sorção de compostos orgânicos não-iônicos pelo solo, sendo assumido que somente a fração orgânica do solo adsorvia os produtos químicos. Entretanto, esse é o caso de produtos muito lipofílicos. Moléculas polares orgânicas se ligam prontamente a superfícies orgânicas ou inorgânicas do solo (Weber, 1994). O valor  $K_{oc}$  de um produto se refere ao valor  $K_d$  dividido pela fração de carbono orgânico do solo ( $K_{oc} = K_d / \text{fração carbono orgânico}$ ) e  $K_d$  determina-se dividindo o valor do herbicida adsorvido (mg/kg) pelo herbicida dissolvido (mg/L).

A adsorção é um processo chave no comportamento de pesticidas no solo, pois está diretamente relacionada com a translocação, persistência, mobilidade e bioatividade desses produtos (Luchini, 1987).

A adsorção às superfícies tem sido considerada como um fator limitante da degradação dos pesticidas no solo. Allen & Walker (1987) encontraram forte correlação entre a quantidade de herbicidas absorvidos e sua degradação, havendo relação significativa entre respiração microbiana e quantidade de herbicida na solução do solo. Portanto, a biodisponibilidade do produto pode determinar o metabolismo microbiano. O produto de hidrólise, assim como o composto pai, podem estar disponíveis para exercer toxicidade ou prover nutrientes.

Somasundaram & Coats (1990) relacionaram a propriedade de mobilidade do pesticida no solo com a disponibilidade para degradação. Sugeriram que a técnica de cromatografia de camada delgada de solos (ccds) pode ser utilizada como um índice do comportamento da adsorção/dessorção do produto no solo. Nessa técnica o solo serve como adsorvente, o produto radiomarcado é aplicado em um ponto, no canto inferior da placa. Após o desenvolvimento das placas, em água, estas são secas, e então, cobertas com filme raio X por 2 a 3 semanas. Os valores de Rf (relação de frentes) de cada mancha é medido no auto-radiograma. Os mesmos autores observaram que produtos de hidrólise, como 2,4-diclorofenol, p-nitrofenol e ácido salicílico, após repetidas aplicações, induziram a uma degradação acelerada de seus produtos parentais. Os Rf desses metabólitos indicam mobilidade intermediária a alta. Eles foram utilizados como fonte de energia para os microrganismos e sua disponibilidade no solo contribuiu para um metabolismo rápido dos produtos pais. Esses autores concluíram, então, que os produtos de degradação (metabólitos) de alguns pesticidas são capazes de induzir a degradação acelerada de seus produtos pais. As propriedades de disponibilidade, baixa toxicidade microbiana e valor nutritivo podem favorecer a degradação dos compostos pais em solos com populações de microrga-

nismos degradadores. Portanto, uma das variáveis que determina o metabolismo do pesticida é sua disponibilidade para os sistemas microbianos que degradam esses produtos. O produto ou seus metabólitos devem estar disponíveis, para então exercer seus efeitos de toxicidade ou prover valor nutriente. A falta de disponibilidade de alguns produtos pode resultar em sua persistência.

Em nosso laboratório foram realizados testes de mobilidade e degradação, utilizando os mesmos solos e diferentes pesticidas. Foram empregados dois tipos de solos agrícolas, coletados próximos ao município de Piracicaba, SP. Foram classificados como sendo Areia Quartzosa (AQ) e Latossolo Vermelho Escuro (LVE), apresentando, respectivamente, as seguintes características: areia (%) 94,5 e 13; silte (%) 2 e 18; argila (%) 3,5 e 69; matéria orgânica (%) 1,2 e 3,7; pH ( $\text{CaCl}_2$ ) 4,3 e 4,7; CTC (meq/100 g) 3 e 4,8. Na tentativa de relacionar a mobilidade, avaliada por ccds e a degradação, avaliada através da quantidade de  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido, durante 28 dias de incubação, nas doses de 1 e 10 ppm de diversos  $^{14}\text{C}$ -pesticidas, apresentamos a Tabela 1. Com alguns produtos não foi observada correspondência com degradação e mobilidade, como alachlor, por exemplo. Um estudo da mobilidade e toxicidade de seus metabólitos talvez pudesse esclarecer melhor o fato. Por outro lado, os piretróides deltametrina, acrinatrina e permetrina não apresentaram mobilidade; entretanto, foi observado alto desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$ , durante o período de incubação. Provavelmente, isso se deve ao tipo de força de sorção entre as moléculas, uma vez que as propriedades gerais dos piretróides são: não iônicos, baixa solubilidade em água ( $K_{sp} = 0,001$  a  $0,33$  mg/L); alta a muito alta retenção ( $K_{oc} = 10^4$  a  $10^6$ ) e baixa volatilidade (PV =  $1,5 \cdot 10^{-9}$  a  $0,348 \cdot 10^{-6}$  mmHg)

## MECANISMOS DE DISSIPAÇÃO DE PESTICIDAS NO SOLO

Os pesticidas presentes no solo se tornam parte de processos de transporte e degradação, que afetam todos os produtos químicos orgânicos adicionados a um ecossistema dinâmico (Sawhney & Brown, 1989).

Há diversos processos de transporte dos resíduos de pesticidas dentro ou fora do ecossistema do solo. O transporte pelo processo de volatilização leva o pesticida do solo para a atmosfera. Pesticidas com pressão de vapor superior a  $10^{-16}$  mmHg a  $25^\circ\text{C}$  são grandemente afetados, e perdas de 80-90% em 24 horas já foram registradas (Triegel & Guo, 1994). Assim como a pressão de vapor aumenta com a temperatura, outros fatores também podem modificar a cinética da volatilização, como velocidade de ventos, umidade do ar e do solo e conteúdo de matéria orgânica.

TABELA 1. Valores de Rf de cromatografia de camada delgada de solos (ccds) e porcentagens de  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido de diversos pesticidas radiomarcados uniformemente nos carbonos do anel.

PRODUTO	SOLO	RF	% $^{14}\text{CO}_2$ EVOLUÍDO	
			1 ppm	10 ppm
diuron	AQ	0,81	3,02	3,89
	LVE	0,45	2,28	4,04
atrazina	AQ	1,00	0,64	0,58
	LVE	0,45	0,35	0,28
	AQ	1,00	1,27	1,03
alachlor	LVE	1,00	0,37	0,30
	AQ	0,00	2,57	2,33
trifluralina	LVE	0,00	1,96	1,30
	AQ	1,00	18,00	14,07
2,4-D	LVE	0,55	7,29	6,58
	AQ	0,00	20,35	10,15
permetrina	LVE	0,00	6,48	6,96
	AQ	0,00	76,08	83,58
deltametrina	LVE	0,00	35,46	39,26
	AQ	0,00	60,94	39,57
acrinatrina	LVE	0,00	1,21	0,53
	AQ	0,02	1,04	0,51
PCNB	LVE	0,02	0,55	0,40

Outro tipo de transporte é o movimento de pesticidas dissolvidos ou adsorvidos a partículas na solução do solo. Esses processos, denominados de lixiviação, têm sido relacionados com a contaminação de água subterrânea. Diversas vias têm sido descritas, mostrando o movimento de pesticidas dissolvidos na solução do solo. Processos de convecção e difusão são freqüentemente simultâneos, envolvendo o transporte na água que move gravitacionalmente ou com um gradiente de concentração. A evaporação e a transpiração resultam em movimento da água e,

conseqüentemente, das substâncias nela dissolvidas. Há o movimento de pesticidas através de macroporos, junto com o movimento da água correndo pelas tramas irregulares de canais construídos por minhocas, insetos, animais que cavam ou por raízes de plantas.

O transporte de pesticidas na água movendo-se sobre a superfície do solo, chamado de escoamento superficial ou *runoff*, é um dos principais processos de contaminação de águas de superfície. A água da chuva ou irrigação move-se carregando íons solúveis ou adsorvidos às partículas sólidas do solo.

Pesticidas com solubilidade em água superior a 10 mg/L tendem a se mover largamente na fase solúvel, enquanto pesticidas menos solúveis tendem a mover-se principalmente sorvidos em partículas de solos erodidos (Racke, 1990).

O entendimento da sorção, biodegradação e transporte de produtos químicos orgânicos no solo e aquífero é essencial para predizer o destino e o impacto desses produtos no ambiente.

## PROCESSOS ABIÓTICOS DE DEGRADAÇÃO

A degradação de produtos químicos, tais como pesticidas, pode ocorrer também através de processos químicos ou fotoquímicos. Muitos processos abióticos de degradação ativos no solo resultam na degradação parcial desses produtos, que posteriormente levam a ser degradados microbiologicamente ou se ligam a componentes orgânicos do solo. Exposição de resíduos de pesticidas a radiação ultra-violeta (UV) pode resultar em considerável fotodegradação. Tais processos podem ocorrer naturalmente na superfície do solo, das plantas ou outras superfícies, como a da água. Um dos fatores que afetam a degradação dos pesticidas e outros compostos orgânicos pela luz UV é a presença de compostos fotossensibilizadores, os quais facilitam a transferência da energia da luz para um receptor químico. Vários solventes são reconhecidos como fotossensibilizadores, como por exemplo a acetona. Portanto, o meio em que as substâncias reagentes estão dissolvidas ou suspensas afeta a natureza da reação fotoquímica, principalmente com relação à velocidade de reação e a produtos formados.

Reações abióticas, significativas, ocorrem entre os pesticidas e reativos inorgânicos e compostos orgânicos na solução e nas superfícies das partículas sólidas do solo. Reações hidrolíticas são importantes mecanismos de transformação de muitos pesticidas no solo, incluindo os organofosforados, inseticidas carbamatos e ésteres herbicidas (Tinsley, 1979).

Métodos abióticos na degradação de pesticidas em larga escala, para fins de remediação de locais contaminados com altas concentrações, são apresentados em detalhes por Krueger & Seiber (1984) mediante a utilização de unidades de ultra-violetas ou ozona, perborato de sódio (que libera peróxido de hidrogênio em solução) e sistemas aquosos com pH ácido, neutro ou alcalino.

O pH regula a quantidade de ligantes ou a taxa de degradação de produtos ionizáveis, mas normalmente não regula a taxa de degradação de compostos não iônicos (Weber *et al.*, 1993). O pH influencia indiretamente o movimento de alguns pesticidas no solo, afetando fortemente a adsorção; em baixos valores de pH a mobilidade é baixa. Em geral, a adsorção é fraca em pH neutro e alto (básico), levando ao aumento de mobilidade e aumento da degradação em solos alcalinos (Somasundaram & Coats, 1990).

## PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS DE DEGRADAÇÃO

A atividade microbiana é reconhecida como um dos fatores mais importantes na eliminação dos produtos químicos do ambiente. A função dos microrganismos na transformação de pesticidas vem, há tempo, sendo demonstrada em trabalhos de laboratório, comparando as proporções de degradação entre solos ativos e esterilizados (Lichtenstein & Schultz, 1964). Outros pesquisadores têm escolhido o uso do isolamento de microrganismos degradadores de pesticidas como evidência do envolvimento microbiano (Racke, 1990). Outra evidência ainda é que as condições do ambiente que influenciam a atividade microbiana, tais como temperatura, umidade, pH, afetam também a degradação dos pesticidas no solo (Chapman *et al.*, 1986).

Outro método comumente utilizado, que sugere que a biomassa influi na degradação dos produtos no solo, envolve a adição de nutrientes em solos tratados com o pesticida. O método tem sido utilizado para acelerar o metabolismo tanto de pesticidas prontamente degradáveis como os mais persistentes. A razão de se adicionar vegetais como nutrientes foi baseada na hipótese de que o aumento da taxa de carbono/nitrogênio (C:N) no solo poderia estimular a atividade microbiana e porque a depleção de N no solo pode induzir o ataque microbiano a fontes menos disponíveis de N, como de alguns pesticidas. Entretanto, foi mostrado que a degradação mais rápida de compostos na presença de restos de materiais vegetais está relacionada com atividade microbiana (Felsot & Dzantor, 1990).



A atividade microbiana é maior quando se acrescenta ao solo material vegetal do que quando somente se adicionam nutrientes, como por exemplo glicose (Anderson, 1984). A adição de material vegetal demonstra também que a degradação pode ocorrer por cometabolismo. Em outras palavras, a energia derivada de outros nutrientes adicionados leva ao metabolismo de pesticidas, do qual pouca ou nenhuma energia pode ser ganha (Anderson, 1984; Horvath, 1972). Na degradação do pesticida por cometabolismo ocorrem reações que não suportam crescimento microbiano.

Costa (1992) estudou a degradação de  $^{14}\text{C}$ -ametrina, radiomarcada nos carbonos do anel, em solo Areia Quartzosa, amostrado em região próxima de Piracicaba, SP, em condições de esterilizado, não esterilizado, e com adição de folhas secas de cana-de-açúcar, cultivada em solo tratado ou não com o mesmo herbicida, nos três anos anteriores à coleta. Em solos esterilizados, praticamente não foi observado desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$ . Com a adição de material vegetal oriundo de campos tratados e não tratados, a proporção de  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido foi respectivamente de 12 e 13 vezes maior do que em solo sem adição de substrato, mostrando que a degradação de ametrina ocorre principalmente por cometabolismo. A adição de solo rizosférico das mesmas culturas também aumentou a degradação, com desprendimento de 3,5 e 1,7 de  $^{14}\text{CO}_2$  em solos tratados e não tratados, respectivamente. Isso mostra que ocorreu uma seleção de microrganismos durante os três anos consecutivos de aplicação do herbicida no campo. A Fig. 1 mostra a evolução do  $^{14}\text{CO}_2$  evoluído nos diferentes tratamentos.

A atividade da enzima desidrogenase foi determinada no final de nove semanas de incubação, conforme metodologia descrita por Smith & Pugh (1979). A atividade microbiana assim determinada mostrou relação direta com desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$ , sendo maior nos tratamentos que apresentaram maior desprendimento de  $\text{CO}_2$ , ou seja, maior degradação. Outros trabalhos, com adição de material vegetal tratado ou não com os herbicidas simazina e bentazon (Burauei & Führ, 1988), mostraram que a degradação foi acelerada, com maior desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  nos solos com adição desses produtos por possuírem, as plantas, enzimas que podem metabolizar os compostos, tornando-os prontamente degradáveis pelos microrganismos do solo.

Métodos de estudos sobre degradação de compostos químicos são descritos em detalhes por Anderson (1990).

O tipo de formulação dos pesticidas também pode influenciar a degradação, como o caso de formulações granulares, as quais são mais persistentes do que os concentrados emulsionáveis. Os tipos de solventes,

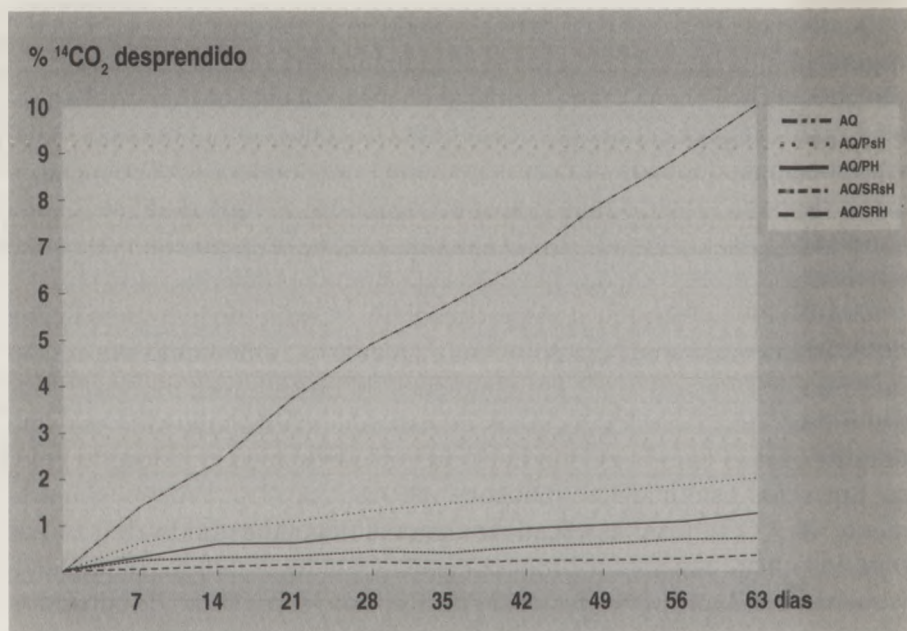


FIGURA 1. Porcentagem de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> desprendido em solo Areia Quartzosa (AQ), acrescido de folhas secas tratadas (PH) com o herbicida ametrina ou não (PsH), acrescido de solo rizosférico tratado (RH) ou não (RsH) e solo esterilizado (ES), durante 63 dias de incubação.

emulsificadores, antiespumantes, estabilizantes e algumas impurezas oriundas da síntese do ingrediente ativo são capazes, potencialmente, de afetar a biota e as propriedades físico-químicas do solo e, portanto, podem afetar a degradação. O tipo de formulação pode afetar também a volatilização e mobilidade dos ingredientes ativos no solo e, conseqüentemente, modificar a quantidade de pesticidas disponíveis para degradação.

As práticas agrícolas de manejo e cobertura vegetal também influenciam a atividade microbiana, com reflexos em suas características físicas, químicas e biológicas. A calagem e a adubação mineral ou orgânica favorecem o desenvolvimento microbiano de forma direta, pelo aumento do pH e da disponibilidade de nutrientes às células microbianas e, de forma indireta, pela maior produção vegetal, que acarreta aumento da atividade rizosférica. O manejo dos restos culturais e o grau de preparo do solo afetam sua temperatura, umidade, aeração e distribuição desses resíduos na camada arável do solo (Cattelan & Vidor, 1990).

A permanência de resíduos de pesticidas no solo depende também da prática agrícola, além da atividade microbiana, e a distribuição do produto é também influenciada por esta. Torrões dificultam a entrada de produtos

dentro e abaixo deles. A maior quantidade de microrganismos sobrevive na superfície, diminuindo com a profundidade. O perfil do solo consiste de vários horizontes e as diferenças entre eles podem englobar propriedades físico-químicas, temperatura, quantidade de água e ar. O pesticida é transportado através do perfil do solo, onde cada ambiente determina se a molécula adsorve ou é transformada. Com o intuito de observar a degradação do herbicida atrazina nos horizontes A, AB e B, amostras de solo Podzólico Vermelho-Amarelo Abrupto, da região de Pindorama, SP, foram coletadas, e  $^{14}\text{C}$ -atrazina aplicada na dose de 3 litros i.a./ha (Monteiro *et al.*, 1995). As amostras de solo foram incubadas com umidade constante de 70% da capacidade de campo, a 23°C, no escuro, durante 64 dias. O desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi proporcional à profundidade: após 64 dias da aplicação, o desprendimento nos primeiros 0-30 cm foi de 1,7%, nas profundidades de 30-50 cm e 50-60 cm apresentaram 1,4% e 0,8%, respectivamente. Conclui-se, através do Manual do IBAMA (1990), que no horizonte A a meia-vida de atrazina foi de 90 a 180 dias (persistência média) e nos horizontes AB e B superior a 180 dias (persistência alta). Johnson & Fuhrman (1993) estudaram a degradação de atrazina e metolachlor no horizonte C (0,87-1,07 cm) de um solo arenoso dos Estados Unidos, encontrando também baixo nível de degradação.

## ADAPTAÇÃO MICROBIANA À DEGRADAÇÃO

Alguns microrganismos são hábeis na utilização de certos pesticidas como única fonte de carbono. Espécies de *Rhodococcus* (Dick *et al.* 1990), *Arthrobacter* (Tam *et al.*, 1987) e *Flavobacterium* (Mueller *et al.*, 1988), por exemplo, isoladas do solo, utilizaram carbamotioatos, em meio de cultura, como única fonte de carbono. Outros microrganismos como *Pseudomonas* sp. podem utilizar diflubenzuron como única fonte de carbono e incorporar grandes quantidades desse produto. Cerca de até 10 mil ppm de diflubenzuron foram encontrados dentro de suas células. Entretanto, ocorre pouco metabolismo do composto, pois esse microrganismo é tolerante ao diflubenzuron absorvendo ou adsorvendo o composto, sem que este lhe seja letal. A tolerância, entretanto, pode estar relacionada com a degradação do produto (Booth *et al.*, 1983). O acúmulo do pesticida por microrganismos pode ocorrer por processos ativos ou passivos, significando apenas remoção temporária do produto do meio. Moléculas de organoclorados como DDT, dieldrin, aldrin e heptacloro foram detectadas em células de fungos (Musumeci, 1992), acumuladas em vacúolos.

Em alguns casos pode parecer um possível desenvolvimento de resistência pelos organismos-alvos. No campo, essa resistência pode ser resultado da degradação acelerada do produto a níveis não tóxicos. Esse parece ser o caso do inseticida carbamato carbofuran, que perdeu sua eficiência no controle de certos insetos em solos com histórico de sua aplicação nos Estados Unidos e Canadá (Racke, 1990). O fenômeno é chamado de biodegradação acelerada (*enhanced biodegradation*), por ocorrer a degradação mais rapidamente nestas áreas tratadas por 2 ou mais anos consecutivos, do que em áreas sem prévia aplicação do mesmo produto.

Provavelmente a aceleração da degradação seja resultado da proliferação dos microrganismos adaptados aos pesticidas em questão. Tais solos são referidos como "enriquecidos" (Smith & Lafound, 1990). Uma extensa revisão sobre degradação acelerada pode ser encontrada em Roeth (1986) e Rack & Coats (1990), com exemplos ocorridos.

A degradação acelerada pode ser devida à degradação do produto por via catabólica, por espécies de fungo, bactéria ou actinomiceto. Portanto, é de se esperar que o número de microrganismos degradadores aumente em solos com seguidas aplicações de um mesmo produto. Por exemplo, Cullimore (1981) encontrou um grande número de organismos degradadores de 2,4-D em solo tratado durante 32 anos seguidos. Em altas doses (1,12 kg/ha) o número deles foi ao redor de 5.700 microrganismos/g solo e, em doses mais baixas (0,42 kg/ha), de 2.500 microrganismos/g solo.

Para enumerar e isolar microrganismos degradadores de herbicidas de solo com degradação acelerada, Mueller *et al.* (1989) utilizaram meio mínimo, com adição de 20 mg/L de herbicida como fonte de carbono e 25 mg/L de TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) como um indicador dos organismos capazes de utilizarem o herbicida empregado. Microrganismos ativos utilizam o pesticida como fonte de carbono e também reduzem o TTC, que é incolor, a um composto colorido; assim, microrganismos degradadores aparecem como colônias vermelhas (Skipper, 1990).

Moorman (1988) desenvolveu uma técnica utilizando  $^{14}\text{C}$ -NMP (número mais provável) para enumerar os microrganismos degradadores do herbicida carbamato EPTC. Esse autor concluiu ainda que o aumento na taxa do metabolismo foi provavelmente o maior responsável pelo aumento nas taxas de degradação, mais do que o aumento das populações de degradadores de EPTC.

Lee (1984) isolou 29 fungos e 9 bactérias que puderam degradar EPTC. Obrigawitch (1983) observou que a meia-vida de EPTC em solos com degradação acelerada passou de 13 para 4 dias.

Monteiro *et al.* (1996) mostraram ocorrer degradação acelerada do propanil em solos com repetidas aplicações desse herbicida. Spessoto

(1996) isolou, dos mesmos solos com degradação acelerada, após diversas repicagens em meio mínimo com propanil como única fonte de carbono, fungos do gênero *Fusarium*. Spurr & Souza (1974) observaram também que fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani*, cresceram em meio de cultura, tendo aldicarbe como única fonte de carbono.

Reconhece-se também que há diferença na susceptibilidade dos pesticidas à degradação acelerada, com base na estrutura química e disponibilidade do produto, necessitando-se que seja acessível ao catabolismo microbiano. Há relatos na literatura de degradação acelerada de fungicidas, inseticidas e herbicidas. Entretanto, algumas classes de pesticidas, por exemplo inseticidas carbamatos, herbicidas tiocarbamatos e ácidos fenoxialcanóicos, têm mostrado ser especialmente susceptíveis à degradação acelerada (Racke, 1990). Dentro desses grupos aparecem produtos resistentes à degradação acelerada, como os herbicidas fenoxialcanóicos 2,4,5-T, devido à toxicidade de seus metabólitos. O 2,4,5-triclorofenol não serve como substrato microbiano, ao contrário de 2,4-diclorofenol (Somasundaram & Coats, 1990).

A procura de microrganismos degradadores de pesticidas ou outros produtos químicos é facilitada, se a degradação estiver relacionada diretamente com a produção de enzimas, as quais poderiam ser ensaiadas com maior rapidez. Também facilitaria o reconhecimento de linhagens que pudessem estar causando ineficiência do produto no campo. Reed *et al.* (1990) observaram aumento de atividade da urease em solos tratados com os inseticidas carbofuram e ethoprop. Esses autores relacionaram também a atividade das enzimas fosfatase e fosfodiesterase, entre outras, com a diversidade das vias metabólicas dos microrganismos degradadores. A outra enzima desidrogenase é recomendada para estudo sobre os efeitos de pesticidas nos microrganismos, uma vez que essa enzima fornece informações sobre a respiração e, portanto, sobre a atividade dos microrganismos (Smith & Pugh, 1979). Santos & Monteiro (1994) e Santos (1992) estudaram a atividade das enzimas desidrogenase, fosfatase e urease, em solo de mata, terra roxa estruturada da região de Piracicaba, SP, na presença de endosulfan e aldicarbe. Esses inseticidas causaram efeitos deletérios nas populações de algas e protozoários e inibição das enzimas desidrogenase e fosfatase, mas por outro lado, não foi observada alteração na atividade da urease.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. 1st.ed. New York: Academic Press, 1994, 322p.
- ALLEN, R.; WALKER, A. The influence of soil properties on the rates of degradation of metamitron, metazachlor and metribuzin. **Pesticide Science**. v.18, p.95-111, 1987.

- ANDERSON, J.P.E. Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.483-489, 1984.
- ANDERSON, J.P.E. Principles of an assay systems for biodegradation. **Advances in Applied Biotechnology Series**, v.4, p.129-145, 1990.
- ASPELIN, A.L.; GRUBE, A.H.; TORLA, R. **Pesticide industrial sales and usage 1990 1991 marked stimates**. Washington: EPA, 1992.
- AUDUS, J.L. **Herbicides and the soil**. Oxford: Blackwell, 1960. p.1-19
- BAILEY, G.M.; WHITE, J.L. Review of adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids, with implications concerning pesticide bioactivity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.12, p.324-332, 1964
- BOOTH, G.M.; WEBER, D.J.; ROSS, L.M.; BURTON, S.D. BRADSHAW, W.S.; HESS, W.M.; LARSEN, J.R. Mechanisms of pesticide resistance in non-target Organisms. In: GEORGHIOU, G.G.; SAITO T. ed. **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum Press, 1983. p.387-409
- BURAUDEL, B.; FÜHR, F. The enhanced mineralization of simazine and bentazon in soil after plant uptake. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v.151, p.131-314, 1988.
- CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações da biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p.133-142, 1990
- CHAPMAN, R.A.; HARRIS, C.R.; HARRIS, C.J. Observations on the effect of soil type, treatment intensity, insecticide formulation, temperature and moisture on the adaptation and subsequent activity of biological agents associated with carbofuran degradation in soil. **Journal of Environmental Science and Health**. New York, v.B21, p.125-141, 1986.
- CERRI, C.C. O ciclo do carbono no solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.73-90.
- COSTA, M.A. Biodegradação de <sup>14</sup>C-ametrina em Areia Quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico. Piracicaba: CENA/USP, 1992. 107p. Dissertação de Mestrado.
- CULLIMORE, D.R. The enumeration of 2,4-D degraders in Saskatchewan soils. **Weed Science**, Champaign, v.29, p.440-443, 1981
- DAO, T.H.; LAVY, T.L. Atrazine adsorption on soil as influenced by temperature, moisture content, and electrolyte concentration. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.32, p.629-633, 1968.
- DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas: fundamentos** Piracicaba, 1992. v.1, 431p.
- DICK, W.A.; ANKUMAH, R.O.; McCLUNK, G.; ABOU-ASSAF N. Enhanced degradation of S-ethyl N,N-dipropylcarbamothioate in soil and by an isolated soil microorganism. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. **Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment**. Washington, DC: ACS, 1990. p.98-112. (ACS Symposium Series,426).
- FELSOT, A.S.; DZANTOR, E.K. Enhancing biodegradation for detoxification of herbicide waste in soil. In: RACKE, K.D.; COATS J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington,DC: ACS, 1990. p.249-268. (ACS Symposium Series,426).
- GLOTFELTY, D.E.; SCHOMBURG, C.J. In: SAWHNEY, B.L.; BROWN, K. **Reactions and movements of organic chemicals in soils**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. cap.7.
- HORVATH, R.S. Microbial co-metabolism and degradation of organic compounds in nature. **Bacteriological Reviews** v.36, p.146-155, 1972.
- IBAMA. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. 2ed. Brasília, 1990. 351p.
- JOHNSON, R.M.; FUHRMAN, J.J. Degradation of atrazine and metolachlor in subsoils from an Atlantic Coastal Plain Watershed. In. **Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil**. Madison: Soil Science of America e American Society of Agronomy,1993. p.27-31. (SSSA Special Publication, 32).
- KRUEGER, R.F.; SEIBER, J.N. **Treatment and disposal of pesticide wastes** Washington: ACS, 1984. 368p. (ACS Symposium Series, 259).

- LEE, A.T. EPTC (S - ethyl N; n-dipropylthiocarbamate) degrading microorganisms isolated from a soil previously exposed to EPTC. **Soil Biology and Biochemistry**, vol.16, p.529-531, 1984.
- LICHTENSTEIN, E.P.; SCULTZ, K.R. The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorus insecticides in soils, with special emphases on parathion. **Journal of Economic Entomology**, v.57, p.618-627, 1964.
- LUCHINI, L.C. Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 91p. Dissertação de Mestrado.
- MONTEIRO, R.T.R.; DELGADO, D.; QUEIROZ, B.P.V. Degradação de 14C-atrazina nos horizontes a, ab e b de um solo Podzólico Vermelho-Amarelo Abrupto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995. **Resumos Expandidos** Viçosa, 1995. v.4, p.2407-2409.
- MONTEIRO, R.T.R., SPESSOTO, A.M., LEÃO, J.C. Enhanced Biodegradation of the herbicide propanil in Brazilian Soils. In: GAYLARDE, C.C.; SÁ, E.L.S. DE; GAYLARDE, P.M. **Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposim**.2, Gramado, 1996. p.15-18.
- MOORMAN, T.B. Populations of EPTC- degrading microorganisms soils with accelerated rates of EPTC degradation. **Weed Science**, v.36, p.96-101, 1988.
- MOORMAN, T.B. Adaptation of microorganisms in subsurface environments: Significance to Pesticide Degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J. R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.167-180(ACS Symposium Series, 426)
- MUELLER, J.G., SKIPPER, H.D., KLINE, E.L. Loss of butylate-utilizing ability by a *Flavobacterium*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.32, p.189-196, 1988.
- MUELLER, J.G., SKIPPER, H.D., LAWRENCE, E.L., KLINE, E.L. Bacterial stimulation by carbamothioate herbicides. **Weed Science**, v.37, p.424-427, 1989.
- MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSA, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.341-360.
- OBRIWITCH, T.; WILSON, R.G.; MARTIN, A.R.; ROETH, F.W. The influence of temperature, moisture, and prior EPTC application on the degradation of EPTC in soils. **Weed Science**, v.30, p.175-181, 1983.
- PAULINO, S.R.A industria de pesticidas agrícolas no Brasil, dinâmica inovativa e demandas ambientais. Campinas: UNICAMP, 1993. 171p. Dissertação de Mestrado.
- RACKE, K.D. Pesticide in the soil microbial ecosystem. In: RACKE, K. D.; COATS, J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.1-12. (ACS Symposium Series, 426).
- RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced biodegradation of insecticides in the midwestern corn soils. In: RACKE, K.D. & COATS, J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment** Washington: ACS, 1990. p.68-81. (ACS Symposium Series, 426).
- REED, J.P.; KREMER, R.J.; KEASTER, A.J. Spectrophotometric methodologies for predicting and studing enhanced degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.240-248. (ACS Symposium Series, 426).
- ROETH, F.W. Enhanced herbicide degradation in soil with repeat application. **Review of Weed Science**, v.2, p.45-65, 1986.
- SANTOS, T.M.C.; MONTEIRO, R.T.R. Número de microrganismos e atividade da urease na presença de aldicarbe e endossulfan no solo. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.51, p.123-130, 1994.
- SANTOS, T.M.C. Avaliação do número e atividade enzimática de microrganismos na presença de aldicarbe e endossulfan no solo. Rio Claro: IB/UNESP, 1992. 143p. Tese Doutorado.
- SAWHNEY, B.L.; BROWN, K. **Reactions and movements of organic chemicals in soils**. Madison: Soil Science Society of America, 1989.
- STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: John Wiley, 1982.
- SKIPPER, H.D. Enhanced biodegradation of carbamothioate herbicides in South Caroline. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.37-52. (ACS Symposium Series, 426).

- SMITH, S.N.; PUGH, G.J. Evaluation of dehydrogenase as a suitable indicator of soil microflora activity. **Enzyme microbial technology**. Guildford, v.1, p.279-281, 1979.
- SMITH, A.E.; LAFOUND, G.P. Effects of long-term phenoxyalkanoic acid herbicide field applications on the rate of microbial degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.14-22. (ACS Symposium Series, 426).
- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.128-140. (ACS Symposium Series, 426).
- SPESSOTO, A.M. Biodegradação do herbicida <sup>14</sup>C-propanil em solos secos e alagados. Piracaba: CENA/USP, 1996. 103p. Dissertação de Mestrado.
- SPURR, H.W.; SOUZA, A.A. Potential interactions of aldicarb and its metabolites on nontarget organisms in the environment. **Journal of Environmental Quality**. Madison, v.3, p.130-133, 1974.
- TAM, A.C.; BEHKI, R.M.; KHAN, S.U. Isolation and characterization of an S-ethyl-N,N-dipropyltiocarbamate degradation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, p.1088-1093, 1987.
- TINSLEY, I.J. **Chemical concepts in pollutant behavior**. New York: John Wiley, 1979.
- TRIEGEL, E.K.; GUO, L. Overview of the fate of pesticides in the environment, water balance; runoff vs. leaching. In: HONEYCUTT, R.C.; SCHLACKER, D.J., **Mechanisms of pesticide movement into ground water**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p.1-13.
- WEBER, J.B.; BEST, J.A.; GONESE, J.V. Bioavailability and bioactivity of sorbed organic chemicals. In: **Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil**. Madison: Soil Science Society of America, 1993. 260p.
- WEBER, J.B. Properties and behavior of pesticide in soil. In: HONEYCUTT, R.C.; SCHLACKER, D.J. **Mechanisms of pesticide movement into ground water**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 15-41.
- WEST, A.W.; SPARLING, G.P.; FELTHAM, C.W.; REYNOLDS, J. Microbial activity and survival in soils dried at different rates. **Australian Journal of Soil Research**, v.30, p.209-222, 1992.



# 5

## DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DE XENOBIÓTICOS

Elisabeth Francisconi Fay  
Célia Maria Maganhotto de Souza Silva  
Itamar Soares de Melo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento  
e Avaliação de Impacto Ambiental — CNPMA  
Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

### INTRODUÇÃO

A maior parte do fenômeno da poluição por pesticidas envolve compostos orgânicos chamados de xenobióticos (xeno = estranho, biótico = vida), os quais são sintetizados pelo homem e não têm semelhanças com os compostos químicos naturais. Uma das características essenciais de uma molécula xenobiótica é seu comportamento quanto à reatividade. Os compostos orgânicos mineralizáveis podem tornar-se parcial ou totalmente resistentes à mineralização pela adição de um substituinte. Estes substituintes podem ser denominados de **xenóforos**, isto é, que são fisiologicamente incomuns ou que são totalmente não fisiológicos (Alexander, 1994).

De todos os compostos que atingem o solo intencionalmente, os pesticidas 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. Além disso, existem mais de 1.000 xenobióticos registrados como pesticidas, com uma grande variação na estrutura química das moléculas. Dos xenobióticos empregados como pesticidas 65% são herbicidas, 25% inseticidas e 7% fungicidas. Os restantes 3% incluem nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscicidas e outros. Em função da importância econômica dos pesticidas e da degradação ambiental que causam, alguns estudos têm sido feitos para o estabelecimento de características estruturais da molécula, que permitam a biodegradação desses químicos de modo a evitar danos ecológicos.

A degradação de uma substância em outra pode ser promovida por processos físicos, como o calor ou a irradiação ultravioleta, por reações químicas decorrentes do pH ou da ação de certas substâncias no ambiente, e por processos biológicos, através de enzimas existentes em animais, plantas e microrganismos. A biodegradação é o único processo que permite a degradação de um xenobiótico até  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3$ , e outros compostos inorgânicos, eliminando assim os produtos de transformação intermediária, muitas vezes tóxicos (Atlas & Bartha, 1993). As propriedades dos produtos originados da degradação dos pesticidas são geralmente diferentes das propriedades dos parentais, tanto na atividade biológica como em características de toxicidade, volatilidade e adsorvidade. Portanto, em relação aos compostos pesticidas, é necessário saber quanto do composto parental ou de sua atividade biológica permanece no solo ou na água, após determinados períodos de sua aplicação. Também é necessário identificar e quantificar os produtos da degradação. A não degradação de muitos xenobióticos acarreta seu acúmulo gradativo no ambiente com impacto a longo prazo, resultando na adaptação da biota com o estabelecimento de um novo equilíbrio no ambiente. Em função dos grupos funcionais, a estrutura química mais do que a quantidade aplicada do pesticida é de primordial importância para a degradação não biológica. Além disso, poucas substâncias foram estudadas em relação à sua degradação não biológica no ambiente, tendo este capítulo a função de discorrer sobre a degradação abiótica através de uma vasta busca da literatura disponível.

O desaparecimento do pesticida de um ecossistema não significa necessariamente que ele tenha sido degradado por microrganismos, uma vez que a perda dos pesticidas pode ocorrer por lixiviação, volatilização e degradação química e fotoquímica. Só recentemente tornou-se amplamente reconhecida a importância dessas transformações abióticas no destino dos pesticidas no ambiente.

## DEGRADAÇÃO QUÍMICA

São extremamente difundidos os fenômenos de transformações químicas que ocorrem no solo. Essas reações são mediadas pela água, que funciona como meio de reação, como reagente ou ambos. A hidrólise e a oxidação são fenômenos comuns nesse tipo de degradação, porém são pouco relatadas as reações químicas de isomerização. As reações de substituição nucleofílica, outras que não a hidrólise, podem ocorrer nos reagentes dissolvidos na solução do solo ou com grupos reativos do húmus do solo. Podem ocorrer também dismutações e reações com ra-

dicais livres (Goring *et al.*, 1975). Entende-se por dismutação o processo químico em que um elemento com um número de oxidação se transforma originando compostos em que o elemento tem dois ou mais números de oxidação.

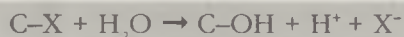
Devido à sua composição, o solo representa um meio efetivo para a condução de tais reações, isto é, contém oxigênio, água, superfícies adsorventes reativas e os xenobióticos. A catálise pode ocorrer pela superfície das argilas, óxidos e íons metálicos, superfícies orgânicas e materiais orgânicos que podem ser separados do solo. Além disso, as enzimas extracelulares estão amplamente distribuídas e estabilizadas no solo e têm papel importante na degradação de muitos pesticidas, representando um ponto de transição entre a degradação química e a microbiológica intracelular (Goring *et al.*, 1975).

## REAÇÕES HIDROLÍTICAS

A hidrólise é um processo significativo na determinação do destino dos pesticidas. Para a maioria dos compostos, pode ser a rota dominante para a sua transformação no ambiente, onde é freqüentemente necessária a hidrólise de determinados grupos funcionais antes do início da degradação microbiana. Entretanto, alguns grupos funcionais orgânicos são relativamente ou completamente inertes à hidrólise sob determinadas condições de reações existentes em muitos ecossistemas.

Os grupos funcionais potencialmente suscetíveis à hidrólise são: 1) amidas; 2) anilidas; 3) carbamatos; 4) epóxidos; 5) ésteres alifáticos e aromáticos; 6) haletos de alquila e arila; 7) nitrilas; 8) oximas; 9) triazinas; 10) ésteres fosfóricos (Wolfe *et al.*, 1990).

No ambiente, as reações hidrolíticas podem ser biologicamente mediadas ou podem ocorrer via processos abióticos. Para as reações bióticas hidrolíticas, a velocidade da hidrólise é proporcional à biomassa bacteriana e/ou à concentração de enzimas específicas no meio. Na hidrólise abiótica, a velocidade da reação é função de parâmetros químicos, como pH, matéria orgânica e íons metálicos dissolvidos. Para muitos compostos xenobióticos, tanto o processo de hidrólise biótico como o abiótico contribuem para seu desaparecimento no ambiente. Generalizando, segundo Pierzynski *et al.* (1994), a reação de hidrólise em compostos orgânicos é:



Portanto, a hidrólise é uma reação que envolve a transformação química de um pesticida, pela reação com a água, a qual resulta na quebra de uma ligação e formação de uma nova ligação carbono-oxigênio.

As reações hidrolíticas não biológicas no solo são aceleradas, devido às reações de catálise pela sorção. As argilas são responsáveis pela catálise e degradação de muitos pesticidas (Armstrong & Konrad, 1974). A degradação química foi observada experimentalmente em solos e argilas esterilizados, o que inibiu toda a atividade microbiana. A argila catalisou a hidrólise do o, o dimetil, o-(2-4-5-triclorofenil) tiofosfato, efeito atribuído aos grupos hidroxila da superfície do mineral (Fig. 1) (Manahan, 1994).

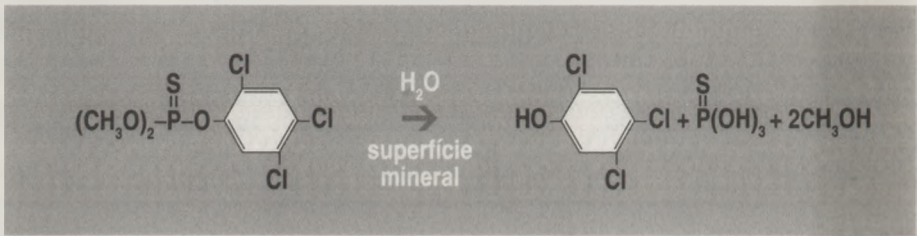


FIGURA 1. Hidrólise catalisada por argila.

O conhecimento da taxa de degradação e transformação de pesticidas no solo é importante para as práticas agrícolas e a segurança ambiental. O solo é um meio químico e biológico complexo e é esperado que a sorção dos pesticidas pelas partículas sólidas afete a cinética da hidrólise. Também devido à grande atividade microbiológica, é difícil separar os processos bióticos dos abióticos, pois para a maioria dos pesticidas as degradações químicas e biológicas ocorrem simultaneamente (Wolfe *et al.*, 1989).

As enzimas e outros compostos bioquimicamente produzidos no solo podem estar envolvidos na transformação de xenobióticos. A esterilização que destrói organismos vivos pode igualmente afetar as reações químicas abióticas que também são dependentes das substâncias geradas por processos biológicos. Os processos de esterilização podem também alterar os constituintes não biológicos do sistema tratado. Assim, por exemplo, calor e radiação podem afetar o conteúdo de radicais livres do solo (Wolfe *et al.*, 1990).

Sharom *et al.* (1980) demonstraram que a proporção de areia/silte/argila tem função importante na hidrólise de compostos orgânicos. Quanto maior a fração argila, maior é a velocidade da hidrólise. Os minerais 2:1 têm maior efeito na hidrólise do que os 1:1, provavelmente por apresentarem maior área superficial e maior capacidade de troca catiônica (CTC). Dependendo da CTC e do tipo de argila, certos íons metálicos como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  podem catalisar a hidrólise de determinados compostos orgânicos. Embora raramente seja o principal constituinte do

solo em volume e, muitas vezes, possa estar quase totalmente ausente, a fração orgânica também é muito importante para os processos de degradação. Ela adsorve e retém preferencialmente a maioria dos pesticidas e torna disponível uma grande variedade de grupos funcionais reativos, além de ser o principal local de atividade microbiana. O carbono orgânico é importante adsorvente para os pesticidas no solo e há indicativos de que tem efeito nos processos bióticos e abióticos (Wolfe *et al.*, 1989).

No solo as reações catalisadas pela sorção envolvem, principalmente, dois grupos de pesticidas: os herbicidas cloro-s-triazinas e os inseticidas organofosforados. A hidrólise química das s-triazinas tem papel importante na degradação desses pesticidas no solo (Fig. 2). Armstrong *et al.* (1967) observaram a formação de hidroxiatrazina como produto de degradação da atrazina em percolados de colunas de solo. Essa hidrólise ocorreu em solo esterilizado a pH 3,9. A velocidade da hidrólise, ao mesmo pH, foi dez vezes maior na presença de solo do que em sua ausência, o que indicou que a hidrólise da atrazina foi catalisada pelo contato com o solo. Em pesquisas paralelas, Harris (1967) observou que a conversão parcial de atrazina, simazina e propazina a seus hidroxideriva-

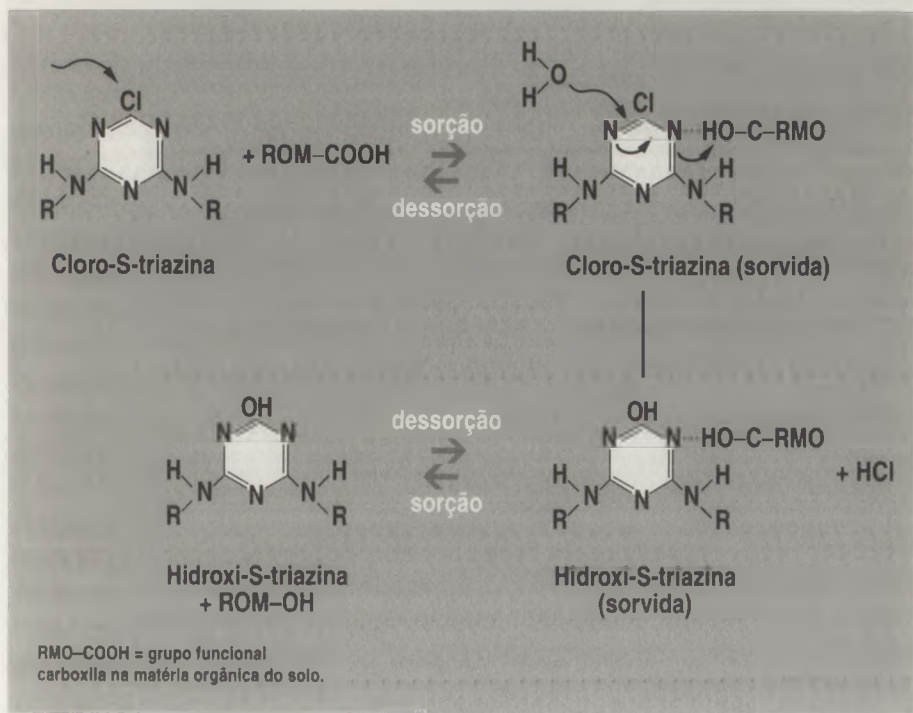


FIGURA 2. Modelo proposto para a hidrólise catalisada pela sorção em cloro-s-triazinas no solo (Armstrong & Konrad, 1974).

dos ocorreu durante a incubação do solo a 30°C por 8 semanas. Os hidroxiderivados não foram afetados pela adição de 200 ppm de azida de sódio, que é um inibidor microbiano.

Numerosos fatores afetam a velocidade de hidrólise das s-triazinas no solo, entre eles o pH e o conteúdo de matéria orgânica. Em geral, a velocidade da hidrólise é maior em solos com alto teor de matéria orgânica e baixo pH (Armstrong *et al.*, 1967). A interação com substâncias húmicas solúveis pode alterar a transformação abiótica de pesticidas. A tendência dos ácidos húmicos de complexar cataliticamente cátions metálicos indica que as transformações abióticas, similares às que ocorrem na superfície dos sólidos, podem ser catalisadas pela associação metal-pesticida-substâncias húmicas solúveis. Os ácidos fúlvicos e húmicos na solução do solo têm peso molecular mais baixo do que os da fase sólida. A hidrólise química da atrazina em solução aquosa é grandemente acelerada pela presença de ácidos fúlvicos (Khan, 1980). É também esperado que o pH influencie a hidrólise diretamente, uma vez que esta é geralmente pH dependente, ou indiretamente pela sorção do químico nas partículas do solo. O mecanismo de catálise do solo parece estar diretamente relacionado com a adsorção de atrazina (Armstrong & Chesters, 1968). Brown & White (1969) observaram que a montmorilonita foi o mineral mais efetivo na hidrólise de doze herbicidas s-triazinas em solos argilosos.

O mecanismo de degradação química dos organofosforados envolve principalmente a hidrólise catalisada pela sorção das ligações éster. Essa hidrólise leva a uma degradação parcial, embora seus produtos exibam propriedades pesticidas (Coward *et al.*, 1971). A velocidade e os produtos da hidrólise dos organofosforados são influenciados por fatores como sorção, temperatura, pH e a força iônica do sistema. Aparentemente os fatores mais importantes são o pH e a sorção (Armstrong & Konrad, 1974). Os organofosforados sofrem comumente hidrólise alcalina, o que resulta na detoxificação desses pesticidas. Além disso, a suscetibilidade desses compostos à hidrólise alcalina está relacionada à sua atividade biológica (Khan, 1980).

A degradação do diazinon, malation e ciodrin ocorre por hidrólise química (Armstrong & Konrad, 1974). O malation e o ciodrin sofrem hidrólise básica, enquanto o diazinon sofre hidrólise ácida. O diazinon foi degradado em solo autoclavado e não autoclavado, porém seu desaparecimento foi mais rápido em solo ácido esterilizado. A degradação de diazinon é acelerada por um aumento na temperatura, conteúdo de umidade do solo e baixo pH (Khan, 1980). A Fig. 3 mostra como ocorre a degradação do diazinon e malation em solos.

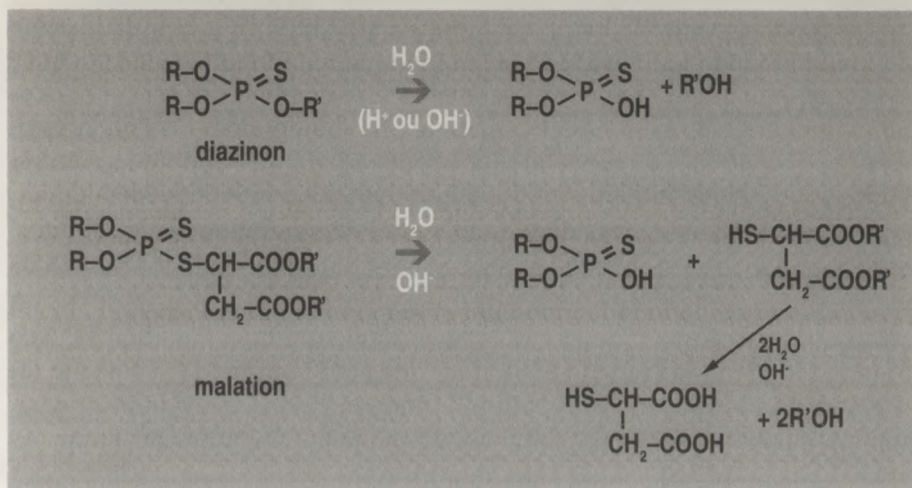


FIGURA 3. Rotas de degradação química de inseticidas organofosforados no solo.

## DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA

As reações fotoquímicas resultam da absorção de fótons de energia radiante pelas moléculas. A energia  $E$  de um fóton da luz visível ou ultravioleta é dada pela equação  $E = hn$ , onde  $h$  é a constante de Planck e  $n$  a frequência da luz. A frequência é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda. A radiação ultravioleta tem maior frequência do que a luz visível e é, portanto, mais energética, podendo quebrar a ligação química das moléculas que a absorvem. Portanto, as reações fotoquímicas ocorrem mesmo na ausência de catalisadores em temperaturas mais baixas do que as freqüentemente requeridas. Essas reações têm um papel importantíssimo na determinação da natureza e destino final das espécies químicas no ambiente (Manahan, 1994).

Pelos dados da literatura, a fotólise é dependente do compartimento do ambiente onde está o pesticida durante a irradiação. Os produtos formados pelas transformações induzidas pela luz solar são chamados de fotoprodutos ou produtos da fotólise (Somasundaram, 1991). A fotólise é primariamente um fenômeno de superfície e extremamente significativa na vegetação, na superfície do solo, na água e na atmosfera. Dentro da faixa de comprimento de onda da luz ultravioleta emitida pelo sol (290 a 450 nm) existe energia suficiente para agir sobre os compostos químicos, provocando transformações. Portanto, a fotólise direta só ocorrerá, se a molécula absorver radiações com comprimento de onda acima de 290 nm (Pierzynski *et al.*, 1994).

Uma vez que os pesticidas podem ser lixiviados pela água, volatilizados para a atmosfera, adsorvidos pelas superfícies e também sofrer partição nos filmes orgânicos, seu comportamento fotoquímico em cada um desses compartimentos deve ser conhecido (Moilanen *et al.*, 1975). A temperatura do solo não somente afeta a volatilização como também a fotólise (Wolfe *et al.*, 1990).

A superfície do solo recebe uma grande quantidade de poluentes, oriundos de diversas fontes. A aplicação aérea ou superficial dos pesticidas resulta numa aplicação direta sobre a superfície do solo, onde ficam sujeitos a transformações químicas, fotoquímicas e microbiológicas. Nos primeiros 0,5 cm da camada do solo, o ambiente químico é diferente do solo como um todo. As fases sólida, líquida e gasosa estão muito próximas da interface solo/atmosfera e estão sujeitas à irradiação solar. As radiações eletromagnéticas são responsáveis por várias modificações químicas no ambiente e representam uma rota potencialmente importante na transformação e/ou degradação de pesticidas aplicados ao solo. Devem ser considerados os efeitos da radiação solar na interface solo-atmosfera, incluindo modificações diurnas na temperatura e umidade do solo e a luz solar que induz modificações no conteúdo orgânico e na atividade microbiana. O conteúdo de matéria orgânica do solo e a atividade microbiana associada também influenciam a estabilidade dos químicos aplicados na superfície do solo. O calor do sol e o meio fotooxidante podem afetar significativamente o crescimento dos microrganismos e conseqüentemente o metabolismo dos compostos orgânicos na fração superficial do solo. A luz solar pode afetar os xenobióticos no solo também pela ação nas propriedades físicas dessa fração (Miller *et al.*, 1989).

Freqüentemente os produtos de degradação são idênticos aos produzidos pelas reações químicas e biológicas. Entretanto a fotólise, em alguns casos, produz uma única estrutura (Khan, 1980).

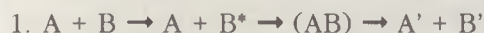
É importante salientar que a molécula não necessita absorver diretamente a energia radiante para que ocorra o processo fotoquímico. Se uma molécula (aceptora) está em contato com outra espécie (doadora) excitada pela luz, esta pode transferir a energia de excitação para a aceptora, que pode, então, sofrer a reação fotoquímica como se houvesse adquirido a energia luminosa diretamente. Esse processo é chamado de fotossensibilização. Um bom exemplo de fotossensibilização pode ser observado em laboratório: a rápida conversão de aldrin (77%) a fotodieldrin, por luz ultravioleta de baixa energia, em solução de benzeno, na presença de benzofenona como fotossensibilizador. Na ausência de benzofenona é observado menos de 1% de conversão (Rosen, 1972).

No ambiente, a fotólise indireta ocorre quando outras espécies que não pesticidas absorvem a energia da luz e iniciam uma série de reações,



que resultam na transformação do pesticida. Espécies orgânicas e inorgânicas, que ocorrem naturalmente, absorvem a energia requerida para as reações subseqüentes. Embora a identidade desses fotossensibilizadores seja geralmente desconhecida, as substâncias húmicas, minerais de argila e metais de transição provavelmente estão envolvidos na fotólise indireta (Wolfe *et al.*, 1990).

Particularmente no solo, o processo de fotólise indireta pode ser mais importante do que o processo direto, devido à absorção competitiva da luz pelos vários componentes do solo. Tanto a fotooxidação direta como a indireta são comuns e a distinção entre os dois processos é difícil. Devido ao efeito atenuante da energia pelo solo, a velocidade de fotólise direta dos pesticidas na superfície do solo é substancialmente mais baixa, relativamente à fotólise em água destilada (Wolfe *et al.*, 1990). Em laboratório, o efeito dos solventes torna-se um fator importante na definição tanto da velocidade da reação quanto da natureza dos produtos da reação. O meio e o solvente podem influenciar o resultado de uma reação fotoquímica de duas maneiras: 1) podem ser fotossensibilizadores ou 2) podem atuar como parceiros da molécula do pesticida energizado pela luz. A diferença pode ser expressa nas seguintes equações:



em que A é uma molécula de pesticida e B é uma molécula que promove reações fotoquímicas. Na equação (1) B é o fotossensibilizador e, portanto, é energizado primeiramente pela luz. Então reage com o pesticida (A) para formar o produto da reação fotoquímica A'. Na equação (2) B é um reagente (solvente ou meio) para o pesticida, que será energizado pela luz para produzir o produto A'.

A extensão da fotodegradação depende do tempo de exposição, da intensidade do comprimento de onda da luz, do estado físico do pesticida, da natureza do suporte sólido ou solvente, pH da solução e presença de água ou fotossensibilizadores (Khan, 1980). A irradiação se modifica com a latitude, estação do ano e hora do dia. A Fig. 4 apresenta o espectro de distribuição da irradiação solar ( $E_o$ ) em quatro diferentes épocas do ano (40° N) e demonstra como a luz solar varia estacionalmente, principalmente para curtos comprimentos de onda.

Também os produtos microbianos podem promover reações fotoquímicas de dois modos: o primeiro é pela atuação dos produtos microbianos como fotossensibilizadores, isto é, que absorvem energia da luz e a transmitem à molécula do pesticida, e o outro modo é pela função dos produtos microbianos como doadores e aceptores de elétrons,

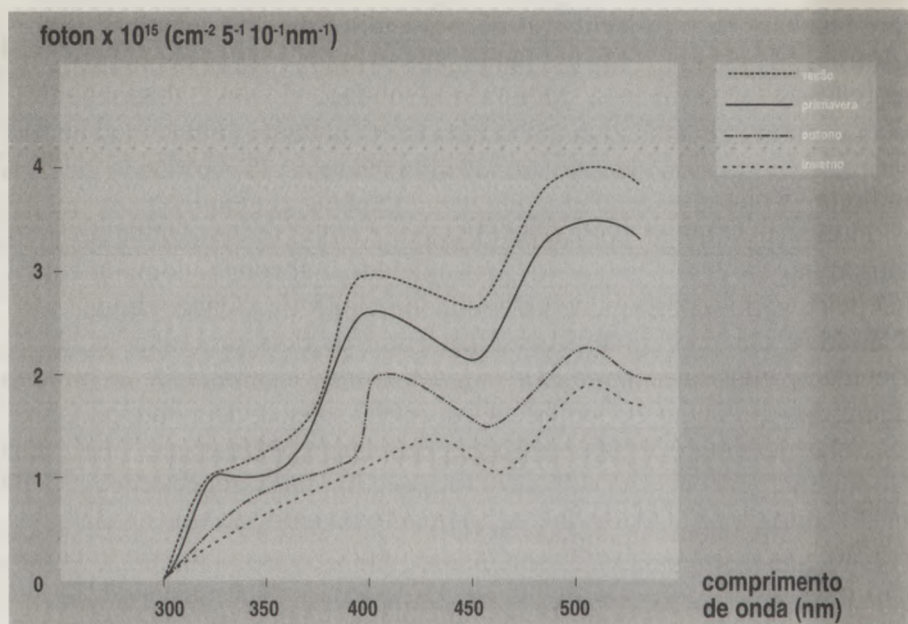


FIGURA 4. Irradiação solar que alcança a terra em quatro diferentes épocas do ano (Wolfe *et al.*, 1990).

ou grupos reagentes de compostos químicos, como por exemplo  $\text{H}^+$  e  $\text{HO}^-$ , que são freqüentemente necessários para as reações fotoquímicas.

Concluindo, a fotólise de um pesticida requer dois eventos: absorção da radiação (diretamente ou através de fotossensibilizadores) e a transformação da espécie eletronicamente excitada por processos químicos. A primeira etapa química numa fotorreação envolve a clivagem de ligação, usualmente homolítica, que produz radicais livres. A energia da radiação é suficiente para quebrar a maioria das ligações covalentes, isto é, 300 nm correspondem a 95 kcal/mole. A fotodegradação no ambiente ocorre em comprimentos de onda acima de 290 nm, uma vez que a camada de ozônio absorve a maioria das radiações eletromagnéticas emitidas pelo sol abaixo deste comprimento de onda. Muitos pesticidas, especialmente os organoclorados, têm sua banda de absorção abaixo de 290 nm e por isso sua fotólise é lenta (Ruzo *et al.*, 1972). A energia luminosa absorvida pelas moléculas dos pesticidas pode ser dissipada de diversas formas, entre elas a liberação de energia através de reações químicas.

A ampla faixa de pesticidas suscetíveis a reações fotoquímicas demonstra a importância potencial dessas reações na degradação de pesticidas no ambiente. Apesar da fotólise de pesticidas no ar e água ser

ocorrência comum, é duvidoso que a fotólise de pesticidas no solo tenha um significado prático. Nos experimentos conduzidos, poucos casos têm sido registrados e todos são suspeitos, devido à dificuldade de excluir outros caminhos de decomposição ou perda no solo. Em alguns casos, uma pequena fotólise seria esperada no solo, embora a energia radiante seja fortemente absorvida pelo solo e portanto relativamente não disponível para degradação fotoquímica, mesmo na superfície do solo (Goring *et al.*, 1975). Os fotoprodutos gerados no solo são frequentemente diferentes daqueles gerados em solução no laboratório, uma vez que o ambiente químico é distinto em solos secos e soluções aquosas. Os solos oferecem uma superfície de adsorção que potencialmente pode alterar a distribuição dos fotoprodutos por restrição de movimento e configuração do estado excitado das moléculas.

Dentre as reações fotoquímicas temos a hidrólise, dealogenação, oxidação, isomerização e polimerização.

## HIDRÓLISE: REAÇÃO NUCLEOFÍLICA

Um exemplo de reação fotonucleofílica é a substituição de um átomo de cloro de um anel benzeno por  $-OH$  em solução aquosa contendo agentes nucleofílicos (Fig. 5) (Matsumura, 1982).

Na faixa da luz solar acima de 280 nm, a ligação H-OH não é quebrada para fornecer o agente nucleofílico necessário para a reação (Castro, 1964). A fonte mais comum de agentes nucleofílicos neste caso é o íon hidroxila ( $OH^-$ ), o qual pode ser substituído pelo íon cianeto ( $CN^-$ ) para produzir o produto correspondente p-cianofenol.

A hidrólise é a reação fotoquímica predominante sobre os carbamatos e organofosforados em soluções aquosas. Para os muitos substratos que sofrem hidrólise espera-se que possam sofrer ataque fotoquímico.

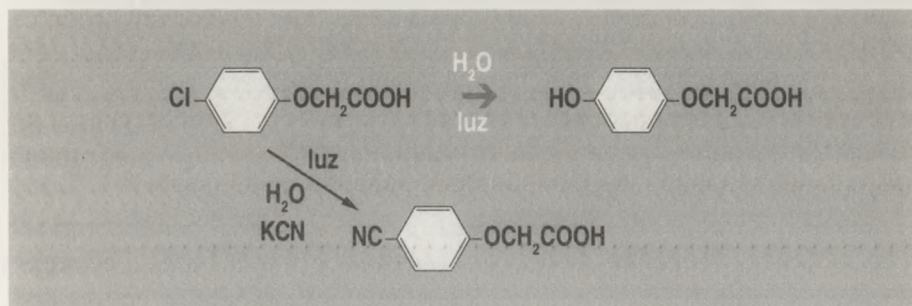


FIGURA 5. Reações fotoquímicas nucleofílicas.

## DEALOGENAÇÃO

É a reação fotoquímica mais comum. Devido à alta energia envolvida, a irradiação ultravioleta pode dealogenar diretamente mesmo os halogênios estáveis ligados a anéis aromáticos (Fig. 6). Alguns exemplos destas reações fotoquímicas ocorrem nas bifenilas policloradas (PCB), monuron e pentaclorofenol (PCP).

Outros exemplos são os isômeros de BHC, mirex e clordane. É necessário salientar que, quando há abundância de doadores de prótons, como nos alcanos saturados e flavoproteínas, o resultado final da dealogenação lembra as reações redutivas (Ruzo *et al.*, 1974; Crosby & Leitis, 1969).

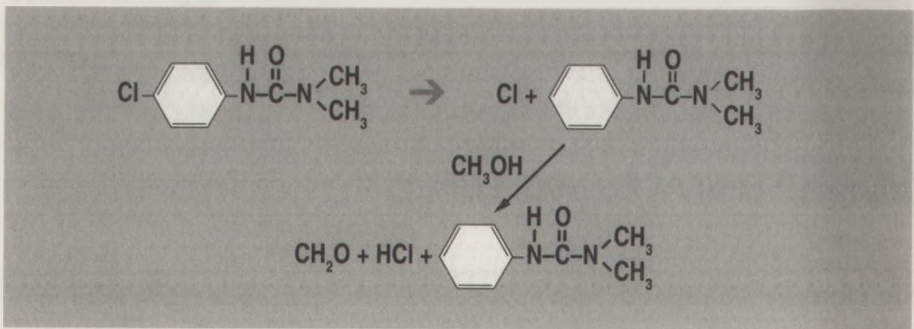


FIGURA 6. Decloração catalisada por reação fotoquímica.

## OXIDAÇÃO

As reações de fotooxidação são as mais significativas na interface solo-atmosfera. A luz solar, o oxigênio atmosférico e a variedade de agentes fotossensibilizadores em potencial que estão presentes oferecem, em conjunto, um ambiente fortemente oxidante. A oxidação pode ocorrer por diferentes rotas, como é demonstrado pelo herbicida monuron em solução aquosa, sob a ação de luz ultra violeta (Fig. 7). Por uma rota, os grupos N-metil são removidos sucessivamente como o observado em aminas e amidas. O anel aromático também pode ser hidroxilado, mas o que aparenta ser uma reação de oxidação aromática, na qual o cloro do anel é substituído por um grupo hidroxila, é realmente uma reação de substituição (Crosby, 1976).

As reações fotoquímicas de oxidação ocorrem normalmente como resultado das reações entre moléculas de pesticida fotoativadas e o oxigênio. Assim, essas reações ocorrem mais facilmente na atmosfera do que em soluções aquosas, apesar de que o oxigênio dissolvido em alguns ca-

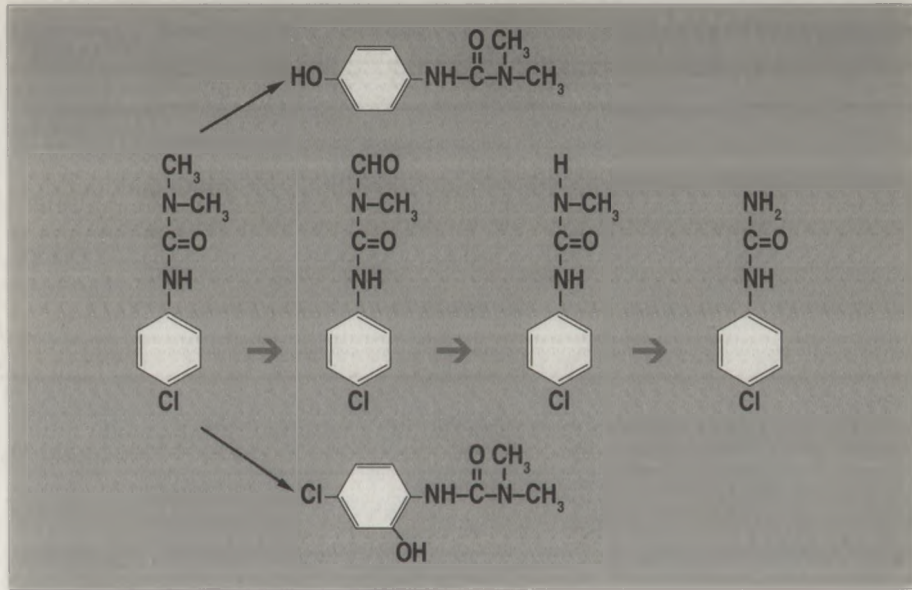


FIGURA 7. Fotoxidação do monuron.

Os solos podem reagir com os pesticidas para dar produtos oxidados. Talvez a reação fotooxidativa mais freqüentemente encontrada no campo dos pesticidas seja a conversão de P = S para P = O no caso dos organofosforados. Um processo de oxidação com significância toxicológica é essa conversão de tiofosfatos para fosfatos, que geralmente resulta em compostos de maior toxicidade. O paration, por exemplo, é diretamente fotooxidado a paraoxon assim como o é indiretamente nas partículas do solo na presença de ozônio e luz UV (Fig. 8) (Wolfe *et al.*, 1990). Isso é análogo ao processo de ativação por organismos superiores para compostos mais tóxicos (= potência anticolinérgica) (Grumwell & Erickson, 1973).

Tanto as substâncias húmicas como a fração inorgânica dos solos podem causar fotooxidação indireta em compostos orgânicos pela formação de radicais livres, que podem reagir com o oxigênio. As substâncias húmicas também podem transferir elétrons diretamente aos xenobióticos e ocasionar transformações dos compostos.

Os piretróides sofrem reações fotooxidativas, embora nesse caso as reações sejam complexas, e somente pode-se supor a natureza das reações envolvidas, através dos produtos formados. Por exemplo, a partir do resmetrin formam-se benzaldeído, ácido benzóico e 5-hidroxi-3-oxo-4-fenil-1-ciclopentenil metanol. As piridinas também sofrem reações fotooxidativas, e como exemplo pode-se citar a reação de diquat e paraquat, dando carbonil e ácido carboxílico, respectivamente.

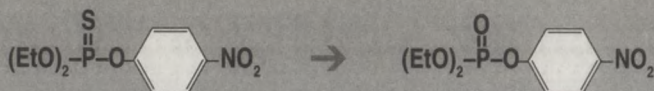


FIGURA 8. Reação de conversão de paration a paraoxon.

Os fenoxierbicidas sofrem oxidação, redução e substituição, principalmente hidrólise, em soluções aquosas, quando ativados pela luz solar (Fig. 9) (Crosby, 1976).

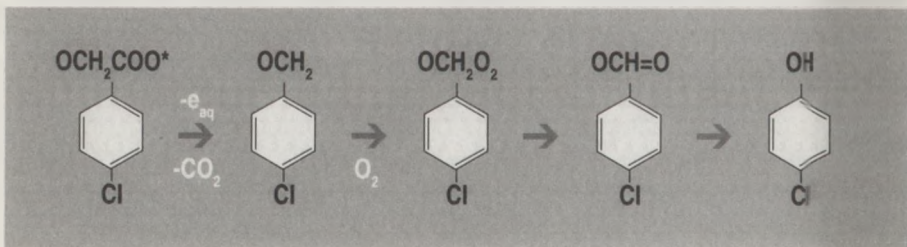


FIGURA 9. Fotooxidação de fenoxierbicidas.

## ISOMERIZAÇÃO E POLIMERIZAÇÃO

Freqüentemente ocorrem rearranjos intramoleculares pelas reações fotoquímicas, as quais produzem produtos isomerizados, como o dieldrin, primeiro composto onde foi observada a isomerização. Outros inseticidas ciclodienos também têm processos de isomerização semelhantes, como por exemplo heptacloro, epóxido de heptacloro, trans e cisclordano, aldrin e endrin.

Outras reações complexas de polimerização também podem acontecer com anilinas substituídas e o pentaclorofenol. Das anilinas são formados os azo e anilinoazobenzenos (Matsumura, 1982). É conhecida em solos a ocorrência de dimerização de anilinas substituídas formando azobenzeno (Fig. 10).

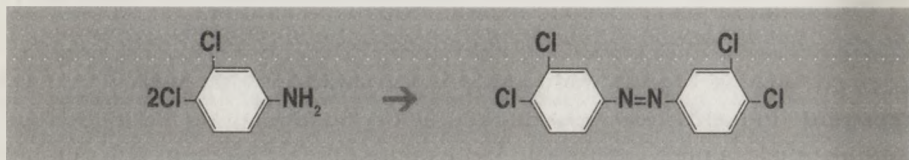


FIGURA 10. Dimerização de dicloroanilinas.

## CONCLUSÃO

Maiores conhecimentos foram adquiridos com o entendimento dos processos e fatores que influenciam o destino dos pesticidas no ambiente. Contudo, o aspecto dos processos da dissipação de muitos pesticidas requer o entendimento das transformações desses produtos no ambiente. As reações de transformação de pesticidas no solo podem ser bióticas ou abióticas. A degradação biótica normalmente é mais significativa que a abiótica, porém, a decomposição abiótica pode ser significativa para pesticidas específicos em solos. As transformações bióticas e abióticas podem resultar no mesmo composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and biorremediation**. San Diego: Academic Press, 1994. 302p.
- ARMSTRONG, D.E.; CHESTERS, G. Adsorption catalysed chemical hydrolysis of atrazine. **Environmental Science & Technology**, v.2, p.683-689, 1968.
- ARMSTRONG, D.E.; CHESTERS, G.; HARRIS, R.F. Atrazine hydrolysis in soil. **Proceedings of the Soil Science Society of America**, v.31, p.61-66, 1967.
- ARMSTRONG, D.E.; KONRAD, J.G. Nonbiological degradation of pesticides. In: GUENZ, W.D., ed. **Pesticides in soil and water**. Madison: Soil Science Society of America, 1974. p.123-131.
- ATLAS, M.R.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundaments and applications**, 3.ed. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993. 583p.
- BROWN, C.B.; WHITE, J.L. **Agronomy Abstract**. p.89, 1969.
- CASTRO, C.E. The rapid oxidation of iron (II) porphyrines by alkyl halides. A possible mode of intoxication of organisms by alkyl halides. **Journal of the American Chemical Society**, v.86, p.2310-2311, 1964.
- COWART, R.P.; BONNER, F.L.; EPPS JR., E.A. Rate of hydrolysis of seven organophosphate pesticides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.6, p.231-234, 1971.
- CROSBY, D.G. Non-biological degradation of herbicides in the soil. In: AUDUS, L.J. ed. **Herbicides: physiology, biochemistry, ecology**. London: Academic Press, 1976. v.2, p.65-97.
- CROSBY, D.G.; LEITIS, E.J.J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.17, p.1036-1040, 1969.
- GORING, C.A.I.; LASKOWSKI, D.A.; HAMAKEN, J.W.; MEIKLE, R.W. Principles of pesticide degradation in soil. In: HAQUE, H.; RIZWANUL, FREED, V.H., ed. **Environmental dynamics of pesticides**. New York: Plenum Press, 1975. p.135-172.
- GRUMWELL, J.R.; ERICKSON, R.H. Photolysis of parathion, o, o-diethyl, o-(4-nitrophenyl) thiophosphate news products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.21, p.929, 1973.
- HARRIS, C.I. Fate of two S-triazine herbicides in soil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.15, p.157-162, 1967.
- KHAN, S.U. **Pesticides in the soil environment**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1980. 240p.
- MANAHAN, S.E. **Environmental chemistry**. 6.ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 811p.
- MATSUMURA, F. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In: MATSUMURA, F.; KRISHNA MURTI C.R., ed. **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum Press, 1982. p.67-87.

- MILLER, G.C.; HERBERT, V.R.; MILLER, W.W. Effect of sunlight on organic contaminants at the atmosphere-soil interface. In: SAWHNEY, B.L., BROWN, K., ed. **Reactions and movement of organic chemicals in soils**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p.99-110.
- MOILANEN, K.W.; CROSBY, D.G.; SODERQUIST, C.J.; WONG, A.S. Dynamic aspects of pesticide photodecomposition. In: HAQUE,R.; FREED, V.H., ed. **Environmental dynamics of pesticides**. New York: Plenum Press, 1975. p.45-60.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis Publishers: CRC Press, 1994. 313p.
- ROSEN, J.D. The photochemistry of several pesticides. In: MATSUMURA, F.; BOUSH, G.M.; MISATO, T., ed. **Environmental toxicology of pesticides**. New York: Academic Press, 1972. p.435-447.
- RUZO, L.O. Photochemical reactions of the synthetic pyrethroids. In: HUTSON, D.H.; ROBERTS, T.R., ed. **Progress in pesticide biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1972. v.2, p.1-33.
- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Pesticide transformation products in the environment. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R., ed. **Transformation products: fate and significance in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. p.2-9.
- WOLFE, N.L.; METWALLY, M.S.; MOFTAH, A.E. Hydrolytic transformations of organic chemicals in the environment. In: SAWHMY, B.L.; BROWN, K., ed. **Reactions and movement of organic chemicals in soils**. Madison: Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1989. p.229-242.
- WOLFE, N.L.; MINGELGRIN, U.; MILLER, G.C. Abiotic transformations in water, sediments and soils. In: CHENG, H.H., ed. **Pesticides in the soil environmental Processes: impact and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.103-168.



# 6

## BIODEGRADAÇÃO DE FUNGICIDAS BENZIMIDAZÓIS

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva  
Itamar Soares de Melo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento  
e Avaliação de Impacto Ambiental — CNPMA  
Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

### INTRODUÇÃO

Dentre os fungicidas orgânicos com ação sistêmica dentro da planta, os benzimidazóis são os mais conhecidos e, talvez, os mais utilizados, devido à sua propriedade e eficácia no controle de fitopatógenos de importância econômica. Os fungicidas sistêmicos desse grupo, como o benomil, o tiofanato metílico, o tiabendazol e o carbendazim se caracterizam por uma alta seletividade, atuando em poucos processos do metabolismo dos fungos. O uso contínuo desses produtos na agricultura tem resultado em uma pressão de seleção na população dos patógenos com subsequente surgimento de linhagens extremamente resistentes (Picinini, 1994). Além disso, a grande quantidade de produto que chega ao solo pode contaminar os lençóis freáticos e afetar a vida selvagem, principalmente no caso de moléculas mais resistentes e recalcitrantes, como o carbendazim. Entre os benzimidazóis, o primeiro composto desenvolvido foi o tiabendazol, introduzido em 1961 como um vermífugo utilizado em medicina humana e veterinária. A seguir, foram introduzidos o benomil, carbendazim e ferberidazol. O ferbendazol, mebendazol, oxibendazol e parabendazol possuem propriedades anti-helmínticas e são utilizados na medicina veterinária, ao passo que nocodazol foi descrito como sendo ativo contra tumores em mamíferos, incluindo o homem (Davidse, 1982).

O benomil, [metil-[1-(butilcarbamoil)-1H-benzimidazol-2-il-carbamato], introduzido em 1967 como fungicida sistêmico, é o mais extensivamente utilizado na agricultura para controlar uma ampla gama de fungos patogênicos, além de apresentar propriedades acaricidas (Rajagopal *et al.*,

1984a). O destino desse produto no ambiente não está totalmente esclarecido e um dos motivos que dificultam tal elucidação diz respeito à sua baixa solubilidade, fato que dificulta o acompanhamento do comportamento do benomil na água. Outra razão é que, uma vez dissolvido na água, o benomil degrada rapidamente para carbendazim (metil-benzimidazol-2-il-carbamato) (Clemons & Sisler, 1969).

O carbendazim (MBC), produto da hidrólise do benomil e da ciclização degradativa do tiofanato metílico, é um composto estável, insolúvel em água e um fungicida menos sistêmico que o benomil, devido à sua dificuldade em penetrar na cutícula da planta (Rajagopal *et al.*, 1984b). Outros metabólitos posteriores a carbendazim foram registrados por Siegel (1975), que, estudando plantas de morango tratadas com  $^{14}\text{C}$ -carbendazim, observou, após 88 dias, a presença de carbendazim (32%) junto com 2-amino-benzimidazol (10% a 18%). O 2-amino-benzimidazol (2-AB) também tem sido isolado como produto de degradação do benomil (Baude *et al.*, 1974). As estruturas químicas dos compostos benomil, carbendazim e 2-AB estão apresentados na Fig. 1.

Outros dois fungicidas, tiofanato e tiofanato-metílico, apesar de não serem considerados benzimidazóis, devem sua atividade antifúngica à formação de carbendazim nos tecidos vegetais (Yasuda *et al.*, 1973).

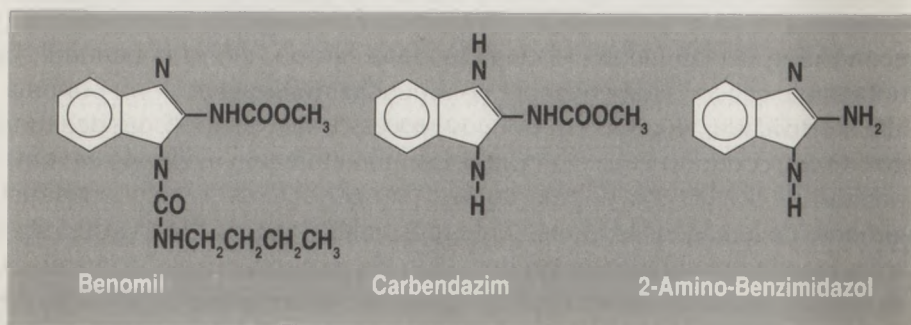


FIGURA 1. Estruturas químicas dos compostos benomil, carbendazim e 2-amino-benzimidazol.

## MUTAGENICIDADE DOS BENZIMIDAZÓIS

O benomil e seus produtos de conversão compartilham de um mesmo modo de ação, isto é, interferem na divisão das células dos fungos, agindo principalmente no crescimento micelial (Davidse, 1982). A atividade biológica dos compostos benzimidazóis é de interferir com a formação e funcionamento dos microtúbulos, que estão presentes em células eucarióticas.

Os microtúbulos são um componente essencial do citoesqueleto dos eucariotos e utilizados para diversas funções, incluindo motilidade flagelar, segregação cromossômica e manutenção da morfologia celular (Sullivan, 1988; Bray, 1992). A tubulina, a subunidade estrutural protéica dos microtúbulos, é um heterodímero de duas proteínas relacionadas:  $\alpha$  e  $\beta$ . Foi descoberto recentemente um novo membro da família, a  $\gamma$  tubulina, mas esta proteína parece não ser um componente do microtúbulo (Oakley & Oakley, 1989; Oakley *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991 e Oakley, 1992). Os múltiplos genes  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas estão sujeitos a uma regulação diferencial durante o desenvolvimento e diferenciação em numerosas espécies, que permitem aos organismos estabelecerem múltiplos e complexos programas para a expressão da tubulina em diferentes células e tecidos (Sullivan, 1988).

Os eucariotos apresentam sensibilidade diferenciada para cada composto benzimidazol (Davidse & Flach, 1977). A afinidade do benzimidazol à tubulina é o principal fator que determina a atividade do fungicida nos organismos. Assim, quanto maior a afinidade de ligação do benzimidazol com a tubulina, mais sensível é o organismo ao fungicida. Uma mutação, que reduza a afinidade de ligação da tubulina com o benzimidazol sem afetar o funcionamento normal da tubulina, dá origem a uma linhagem resistente. A resistência a benomil tem sido descrita com alteração na proteína  $\beta$ -tubulina, que diminui a ligação do fungicida à proteína (Osmani & Oakley, 1991).

A primeira evidência de que o benomil (ou carbendazim) age sobre o fuso mitótico foi apresentada em experimentos com *Aspergillus nidulans* (Hastie & Georgopoulos, 1971; Kappas *et al.*, 1974). As linhagens diplóides da espécie demonstraram um aumento na instabilidade nuclear e uma maior proporção de segregantes haploides na série tratada com o fungicida, em relação à série controle (Hastie, 1970). Nesses organismos foi obtida a evidência de um mecanismo de mutação por não-disjunção cromossômica (Kappas *et al.*, 1974). Segundo os autores, o próprio benzimidazol não foi considerado um agente mutagênico neste ensaio e a análise genética dos segregantes, após o tratamento com o fungicida, demonstrou que a quebra cromossômica e possivelmente também o "crossing-over" mitótico não poderiam ser a causa do aumento da frequência de diplóides segregantes. Além disso, os haplóides segregantes poderiam somente ser formados através da não-disjunção mitótica. Seibert *et al.* (1970), testando benomil em um sistema de conversão gene-mitose com *Saccharomyces cerevisiae*, não observaram atividade mutagênica do composto.

Já Hastie & Georgopoulos (1971) obtiveram mutantes de *Aspergillus nidulans*, induzidos por radiação ultravioleta, os quais foram resistentes a benomil em várias concentrações. Os autores sugeriram que a indução

de mutação de ponto pelo benomil poderia produzir mutantes resistentes, que seriam então favorecidos pela pressão seletiva contra os fungos sensíveis. Por exemplo, após a constatação da ineficácia de benomil contra *Botrytis cinerea* em ciclâmen, Bollen & Scholten (1971) isolaram uma linhagem do patógeno capaz de crescer em meio de cultura suplementado com altas doses do fungicida. Em amostras de cascas de bananas tratadas com benomil, Griffe (1973) isolou três linhagens resistentes e três linhagens sensíveis de *Colletotrichum musae*. Em cultivos de tomate e morango tratados com benomil, Stauton & Kavanagh (1975) observaram que 92 e 46% desses cultivos, respectivamente, abrigavam linhagens de *B. cinerea* resistentes ao fungicida. Por outro lado, Jones & Walker (1976) observaram o desenvolvimento de linhagens resistentes do fungo *Venturia inaequalis*, em maçã, nos três anos de uso regular de benomil.

Uma linhagem de *Trichoderma viride* que apresenta resistência ao carbendazim foi caracterizada por Goldman *et al.* (1993), a qual apresenta dois genes  $\beta$ -tubulina (*tub1* e *tub2*). Os autores demonstraram que uma mutação no gene *tub2* conferiu resistência ao carbendazim e através, de comparações na seqüência do *tub2* da linhagem mutante com o tipo selvagem, revelaram que uma simples substituição do aminoácido tirosina pela histidina na posição 6 foi a responsável pela resistência ao carbendazim. Essa mutação de ponto, uma transição de C para T, pôde simultaneamente conferir resistência a carbendazim e nocodazole.

As mutações  $\beta$ -tubulina (*benA* e *benC*) também foram extensivamente analisadas em *A. nidulans*. Dos vinte alelos *benA*, que foram seqüenciados e analisados quanto às alterações a benomil (Jung & Oakley, 1990; Osmani & Oakley, 1991), dezoito alelos conferiram resistência ao benomil, tiabendazol (TBZ) e nocodazol, enquanto dois alelos conferiram resistência ao TBZ e supersensibilidade a outros compostos. Essas mutações foram substituições simples de aminoácidos. Doze delas foram substituições para o aminoácido 6, duas para o aminoácido 165, quatro a cinco para o aminoácido 198 e duas para o aminoácido 200.

Em *Neurospora crassa*, a mutação para resistência a benomil foi identificada no aminoácido 167 (Orbach *et al.*, 1986) e mais recentemente uma substituição no aminoácido 198, conferindo resistência ao carbendazim e sensibilidade a dietofencarb (Fujimura *et al.*, 1992).

A resistência aos compostos químicos, em fungos, é freqüentemente controlada por genes. As barreiras para as trocas gênicas entre populações diferentes, incluindo incompatibilidade negativa e incompatibilidade sexual, são freqüentes em fungos (Burnett, 1983 e Brasier, 1987, citados por Faretra & Pollastro, 1993). Faretra & Pollastro (1993), estudando mutantes isolados de *Botryotinia fuckeliana* (*B. cinerea*) cruzados com linhagens-referência de "mating type" conhecidas, determinaram a base genética das

diferenças na fertilidade sexual e na resistência aos fungicidas benzimidazóis e dicarboximidas. Os autores demonstraram que os isolados de *B. fuckeliana*, que apresentavam resistência aos fungicidas benzimidazóis e dicarboximidas, levam mutações no mesmo gene *Mbc1* e/ou *Daf1* da linhagem-referência. Assim, os isolados que causam problemas na agricultura, devido à resistência a esses fungicidas, são provavelmente mutantes alélicos. Três categorias de alelos foram identificadas nesta pesquisa, com respeito a cada gene: os responsáveis pela sensibilidade normal aos fungicidas (*Mbc15* e *Daf15*), os que causam baixa resistência (*Mbc1LR* e *Daf1LR*) e os que causam alta resistência (*Mbc1HR* e *Daf1HR*).

## ADSORÇÃO E MOBILIDADE DOS BENZIMIDAZÓIS NOS SOLOS

O benomil apresenta baixa solubilidade em água e é imóvel no solo. Estudos de lixiviação e escoamento superficial têm demonstrado que o benomil e seus dois metabólitos, carbendazim e 2-amino-benzimidazol, são imóveis no solo e raramente lixiviados ou movimentados significativamente a partir do sítio de aplicação (Baude *et al.*, 1974; Rhodes & Long, 1974; Austin & Briggs, 1976; Solel *et al.*, 1979). O carbendazim, aplicado em solução ou suspensão, mediante um sistema de irrigação por gotejamento, manteve-se restrito a uma camada de 0-10 cm de profundidade e num raio horizontal de 10 cm ao redor do gotejador (Solel *et al.*, 1979). A lixiviação de benomil e carbendazim, em colunas de solo, foi insignificante, sendo detectados somente na superfície (Hine *et al.*, 1969; Aharonson & Kafkafi, 1975; Solel *et al.*, 1979).

O movimento nos solos de benomil e, em particular, de carbendazim, triplicou com a adição de ácidos surfactantes, possivelmente devido a um aumento na protonação e conseqüentemente um aumento na solubilidade de carbendazim (Pitbaldo & Edgington, 1972).

Estudos em diferentes solos indicaram um aumento na adsorção de MBC, em função do aumento da acidez da suspensão dos solos (Aharonson & Kafkafi, 1975). As isotermas de adsorção são dependentes do pH e isso foi atribuído à ionização de MBC em valores baixos de pH, havendo a adsorção dessas moléculas protonadas ao solo. Em valores de pH constante, um aumento na força iônica resultou num decréscimo da quantidade do fungicida adsorvido. Dios Cancela (1992) verificou a adsorção de carbendazim em turfa e montmorilonita como uma função do cátion trocável e temperatura. A capacidade de adsorção desse fungicida no solo foi dependente da matéria orgânica, do nitrogênio e do conteúdo argiloso, tanto quanto da capacidade de troca catiônica.

Comparando solos argilosos e arenosos, Liu & Hsiang (1994) demonstraram que as isotermas de adsorção do benomil apresentaram, em situação de equilíbrio, uma interrelação quase linear entre a quantidade adsorvida do fungicida e sua concentração na solução. Segundo os autores, esse fato ocorreu devido ao alto conteúdo de matéria orgânica e à capacidade de troca catiônica do solo argiloso. Helweg (1977) e Musumeci *et al.* (1980b) já haviam observado a forte adsorção de carbendazim em solos ricos em matéria orgânica.

Demonstrou-se também que a maior quantidade de benomil foi captada pelas plantas em solos arenosos, quando comparados a solos argilosos (Fuchs *et al.*, 1970), e que ambos, o movimento do benomil no solo e sua captação pelas plantas, foram afetados pela composição e porosidade do meio (Aharonson & Kafkafi, 1975). Além disso, os autores estabeleceram que a velocidade e a quantidade total da captação de benomil pela planta foram maiores quando as plantas cresceram em solos com baixo conteúdo de matéria orgânica e alto pH.

## IMPACTO DOS BENZIMIDAZÓIS SOBRE OS MICRORGANISMOS

O solo é um sistema vivo que suporta muitas associações microbianas, tanto benéficas como patogênicas. Estas associações são muito sensíveis a distúrbios físicos e químicos ou mesmo a alterações no modo de cultivo, o que afeta drasticamente o equilíbrio microbiano.

Os pesticidas, quando aplicados em quantidades recomendadas, geralmente não afetam a população microbiana nativa do solo ou, então, causam uma mudança temporária em certos componentes da população microbiana (Grossbard, 1976; Matsumara & Benezet, 1978; Alexander, 1981). Os microrganismos podem utilizar os pesticidas como substrato, tirando energia ou utilizando-os como nutrientes para o metabolismo.

O equilíbrio microbiano na rizosfera ou zona de influência da raiz deve-se à atividade das plantas e dos microrganismos, os quais são influenciados pelos pesticidas. O aspecto mais importante da rizosfera, quando comparado ao solo livre de raiz, diz respeito ao maior número e atividade de microrganismos.

Os microrganismos que compreendem a rizosfera e o rizoplano são: bactérias, fungos, actinomicetos, algas, protozoários, nematóides e outros componentes da microfauna. Não há evidência de que as espécies de plantas favoreçam as populações microbianas específicas, além das relações simbióticas bem estabelecidas entre rizóbio e leguminosas, entre bactérias diazotróficas e gramíneas e as associações micorrízicas.

Os fungicidas podem atingir o solo, não só pela incorporação direta mas também através do tratamento de sementes, por aplicação na parte aérea da planta ou incorporação de folhas ou frutos tratados no solo. Os efeitos não previstos dos fungicidas nos microrganismos do solo são diferentes sob condições físicas, químicas e biológicas do solo, além daqueles associados à natureza e concentração do produto. Quando atingem o solo, os fungicidas reduzem a população dos patógenos, dos antagonistas e de outros microrganismos (alguns responsáveis pela mineralização da matéria orgânica, solubilizadores de fosfato, estimuladores do desenvolvimento da planta, simbioses etc.). As populações dos antagonistas e dos demais microrganismos benéficos interferem direta ou indiretamente na população dos patógenos. Além dos efeitos sobre os antagonistas, os fungicidas podem afetar outras atividades microbianas do solo, as quais são responsáveis, por exemplo, pela manutenção da fertilidade. A atividade metabólica da população microbiana depende do número de indivíduos, assim como a atividade de cada um deles. O efeito de fungicidas numa das atividades pode não estar correlacionado com a mudança no número total de indivíduos.

O destino ambiental de fungicidas está relacionado com as propriedades químicas e físicas dos produtos, quantidade e frequência de uso, condições meteorológicas etc. Os fungicidas benzimidazóis, devido à quantidade e frequência de uso para controle de determinadas doenças, têm causado sérios problemas com o surgimento de novas linhagens resistentes. Efeitos sobre a vida selvagem não têm sido bem estudados, apesar da importância desses produtos na agricultura mundial.

A vida selvagem, dentro dos campos agrícolas, está mais sujeita provavelmente à exposição dos fungicidas. Estes são aplicados diretamente no solo, em tratamento de sementes e na parte aérea das plantas com grande parcela carregada para o solo, principalmente em culturas de importância econômica e suscetíveis a muitos patógenos.

O número de bactérias em geral aumenta após um tratamento com fungicidas, provavelmente como resultado da eliminação dos fungos e um decréscimo na competição. Alguns trabalhos demonstraram que o benomil nas concentrações de 1 a 50  $\mu\text{g/ml}$  não inibiu a população bacteriana do solo, mas a estimulou (Hofer *et al.*, 1971; Peeples, 1974, Van Faassen, 1974; Siegel, 1975; Wainwright & Pugh, 1974). Contudo múltiplas aplicações de benomil no solo, ao contrário, inibiram as bactérias do solo (Foster & Mcqueen, 1977). Van Faassen (1974) observou que, em solos arenosos não tratados previamente com benomil, o número de bactérias aumentou com a concentração aplicada do fungicida (2,5 kg i.a.  $\text{ha}^{-1}$ ). Mas no mesmo solo, com aplicação prévia de 2 kg i.a.  $\text{ha}^{-1}$  de benomil,

uma segunda aplicação do fungicida, sob condições de laboratório, diminuiu a contagem total de bactérias de 200 para 1.000 vezes.

A aplicação foliar de benomil (0,6%) em plantas de trigo aumentou a contagem bacteriana da rizosfera (43%) e diminuiu a ocorrência de *Pseudomonas fluorescens* (16%), *Agrobacterium* (50%) e fungos (67%) (Moubasher *et al.*, 1984). O benomil, aplicado em combinação com thiram e sulfato de estreptomicina, mostrou-se inócuo para a população de *Pseudomonas fluorescens* num solo adubado organicamente, apesar de ter ocorrido um aumento significativo na população bacteriana total em solos não adubados (Ferris & Michel, 1981).

O derivado fungitóxico de benomil, 2-amino-benzimidazol (2-AB), inibiu marcadamente o crescimento de *Pseudomonas* sp. na concentração de 250 µg/g e completamente em 500 µg/g (Fuchs & De Vries 1978a).

A aplicação dos fungicidas ethazole, tiofanato-metílico + maneb e tiofanato-etílico + thiram, nas concentrações utilizadas pelas práticas agrícolas, produziu um aumento de 2 a 5 vezes no número total de bactérias (Smiley & Craven, 1978). Das bactérias encontradas, 0,4 a 2% foram *Bacillus* esporulantes e seu número permaneceu uniforme, indiferente ao tratamento.

Os compostos benzimidazóis nas concentrações de 500 a 1.000 µg/g agiram como inibidores para *Bacillus* sp., com a toxicidade aumentando na ordem: 2-amino-benzimidazol > carbendazim > tiabendazol > benomil (Fuchs & De Vries, 1978a).

Tanto benomil como seus produtos de hidrólise, MBC e 2-AB não apresentaram nenhum efeito sobre a nitrificação em solos alagados, exceto quando foram utilizadas altas dosagens de MBC (1.000 µg/ml) e de 2-AB (de 100-1.000 µg/ml) (Ramakrishna *et al.*, 1979). Segundo o mesmo autor, os dois metabólitos foram menos tóxicos do que o composto parental, o benomil 2-AB foi tóxico a *Nitrosomonas* sp. e *N. agilis* enquanto o MBC não teve nenhum efeito, mesmo na concentração de 10 µg/ml.

Apesar dos poucos registros de efeitos inócuos de benomil sobre a população fúngica (Hofer *et al.*, 1971; Peeples, 1974; Van Faassen, 1974), a presença do benomil reduziu de duas a três vezes a população destes organismos e actinomicetos do solo (Siegel *et al.*, 1975; Foster, 1975). Assim, alguns autores postularam que o benomil tem ação fungistática e não fungicida (Hofer *et al.*, 1971; Ponchet & Tramier, 1971; Raynal & Ferrari, 1973).

Muitas espécies de fungos mostraram-se insensíveis ao benomil, na concentração de 1 µg/ml, porém poucos e principalmente os Ficomicetos e membros de Stilbaceae demonstraram insensibilidade em concentrações maiores que 10 µg/ml (Raynal & Ferrari, 1973).



Oku *et al.* (1979) observaram que os fungos tolerantes a benomil foram mais numerosos após 35 dias de tratamento do solo com benomil quando comparados aos solos não tratados. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* foram predominantes em solos tratados (Winsley & Huang, 1970; Peebles, 1974). Segundo Agnihotri (1974), Peebles (1974) e Catska & Vransky (1976), *Gliocadium*, *Penicillium* e *Trichoderma* predominam em solos tratados com fungicidas, sendo que espécies de *Trichoderma* são as melhores recolonizadoras. Analisando a composição das espécies de *Trichoderma* encontradas em solos tratados, Mughogho (1968) observou que muitas espécies, incluindo *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii* e *T. viride*, foram encontradas com maior frequência. É bem provável que *Trichoderma* spp. adquira resistência natural com aplicações continuadas de benomil. Já, as linhagens de *T. viride*, isoladas de solos agrícolas, têm mostrado serem sensíveis a baixas concentrações de benomil e tiofanato metílico (Baicu, 1982). O benomil, na concentração de 1 µg/ml, têm afetado o crescimento micelial e reduzido completamente a esporulação de *T. harzianum* e *T. viride*, isolados de solos sem histórico de aplicação do mencionado fungicida (Silva, 1991). *Trichoderma* spp. é um importante fungo do solo, saprofítico, responsável pela decomposição da matéria orgânica, pelo antagonismo de muitos fitopatógenos, nesse caso produzindo enzimas líticas e antibióticos voláteis e não voláteis (Melo, 1996).

A aplicação de benomil diretamente no solo (1,21 kg i.a ha<sup>-1</sup>) ou através de pulverização (11,2 kg i.a. ha<sup>-1</sup>), diminuiu os fungos nematófagos (Kapur *et al.*, 1981). *Arthrobotrys oligospora* foi o menos afetado. As populações de *Dactylaria haptotyla*, *Stylopaga hadra* e *Monacrosporium ellipsosporium* diminuíram inicialmente, mas recuperaram-se totalmente em 2 meses, enquanto que *Harposporium anguillulae* e *Dactylaria cândida* apresentaram recuperação parcial.

A associação micorrízica também é afetada pela ação do benomil, principalmente os gêneros *Endogone* e *Glomus*, em cultivos de cevada, trevo, milho, cebola, soja e trigo (Bailey & Safir, 1978; Boatman *et al.*, 1978; De Bertoldi, 1978). O crescimento da hifa de *Glomus coledonicum* foi completamente inibido em concentrações extremamente baixas (10 µg/ml) de benomil (Carr & Hinkley, 1985). Porém, outros fungos Zigomicetos parecem ser relativamente insensíveis ao benomil (Bollen & Fuchs, 1970; Edgington *et al.*, 1971).

Segundo Edgington *et al.* (1971), o benomil é tóxico para um amplo espectro de fungos, mas não para a totalidade dos grupos taxonômicos. Entre os Deuteromicetos, os grupos sensíveis são Phialosporae (*Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Verticillium*), Arthrosporeae, Symptodulosporae e Aleuriomorphae, enquanto alguns gêneros de Annelosporae

e Blastoporaes são sensíveis. Todos os Porosporae (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Stemphylium*) não são inibidos. Kirby (1972) e Woodcock (1977) também observaram que os Oomicetos não são sensíveis a benomil. Os Ficomicetos não foram sensíveis e os Basidiomicetos demonstraram respostas de moderada sensibilidade e insensibilidade (Bollen & Fuchs, 1970).

O carbendazim, por sua vez, tem mostrado ser trinta vezes menos tóxico a *Saccharomyces pastorianum* e tão tóxico a *Neurospora crassa* e *Rhizoctonia solani* quanto o benomil (Clemons & Sisler, 1969). Segundo os autores, esse efeito sobre a levedura deve-se meramente a uma fraca penetração do composto. Evidências sobre o modo de ação de MBC em *N. crassa* mostra que, embora as sínteses de RNA e proteína não sejam inibidas, a ação de MBC parece envolver a síntese de DNA ou algum processo intimamente relacionado, como a divisão nuclear ou celular (Clemons & Sisler, 1971).

Os fungicidas que alteram a população de actinomicetos no solo afetam também as suas funções. Van Faassen (1974) relatou que, após 6, 21, 50 e 80 dias de incubação em solos tratados com benomil nas concentrações acima de 100 µg/g, houve um aumento no número de actinomicetos proporcional ao aumento da concentração. Resultados semelhantes foram descritos por Hofer *et al.*, (1971). Segundo os autores, os microrganismos utilizam alguns compostos que estão unidos à formulação do benomil ou este fungicida tem uma ação semelhante à vitamina para eles.

Ao contrário dos resultados expostos acima, Siegel (1975) registrou que o benomil inibe temporariamente os actinomicetos.

## O PROBLEMA DE RESISTÊNCIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Com a utilização indiscriminada dos fungicidas sistêmicos, altamente seletivos, tem-se agravado o problema de surgimento de fungos resistentes, fato que vem comprometendo o controle efetivo de algumas doenças de plantas. Os fungicidas sistêmicos benzimidazóis atuam em um ou em poucos processos do metabolismo dos fungos. Segundo Dekker (1977), mudanças genéticas que resultam na resistência de um patógeno a um fungicida ocorrem com maior frequência com moléculas que atuam em um ou poucos passos do metabolismo da célula, do que com moléculas que agem em muitos passos.

Assim, o número de fungos que têm adquirido resistência aos fungicidas sistêmicos vem aumentando, à medida que aumenta a constância das aplicações na agricultura e, segundo Delp (1988), já foram rela-

tados 64 gêneros de fungos resistentes a esses produtos. Em geral, linhagens resistentes a um benzimidazol são resistentes aos outros do mesmo grupo, fenômeno esse chamado de resistência cruzada (Miller & Fletcher, 1974; Dekker, 1977; Davidse, 1982). O mecanismo responsável pela correlação, segundo Georgopoulos (1982), está no fato dos benzimidazóis compartilharem um mesmo modo de ação.

O benomil sozinho, por exemplo, tem sido aplicado para controlar dezenas de fungos fitopatogênicos em 47 culturas de expressão econômica (Picinini, 1994). Para maiores informações sobre o uso dos fungicidas benzimidazóis na agricultura, recomenda-se a revisão de Picinini (1994).

## PERSISTÊNCIA E DEGRADAÇÃO DOS BENZIMIDAZÓIS NOS SOLOS

A velocidade de dissipação do fungicida na solução do solo depende da natureza do pesticida e das condições bióticas e abióticas que prevalecem no solo. Assim, a meia-vida (o tempo em que ocorre 50% de dissipação do composto químico) dos pesticidas não persistentes como os organofosforados, pode ser de poucos dias, enquanto que para os mais persistentes (ex. hidrocarbonetos clorados) pode ser de muitos dias. Em solos tratados com benomil, Flecker *et al.*, (1974) e Rouchaud *et al.* (1974) encontraram para a meia vida do fungicida os períodos de 3-6 e 6-12 meses em turfa e solo, respectivamente. Eles observaram que o produto encontrado em maior concentração foi carbendazim e o menor, o metabólito 2-amino-benzimidazol.

Nos últimos vinte anos, o benomil tem sido um dos fungicidas mais amplamente utilizados (Jonhson & Lavy, 1994). Nos solos, seu resíduo biologicamente ativo é o carbendazim (Austin & Briggs, 1976). A persistência de benomil e MBC, após a aplicação, tem recebido pouca atenção.

O benomil, incorporado nas concentrações 5,6, 11,2 e 22,4 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, em parcelas de algodão irrigado, em solo argiloso, foi detectado após 12 semanas. Para todas as concentrações aplicadas, a quantidade restante foi suficiente para evitar a germinação de *Phymatotrichum onnivorum*. Após dezoito semanas, os resíduos foram detectados somente nas duas concentrações mais altas (Hine *et al.*, 1969). Os mesmos autores observaram em experimentos de laboratório que o benomil, aplicado ao solo nas concentrações de 10 e 100 µg/g e incubado às temperaturas de 16°, 20°, 25°, 30° e 40°C, foi detectado mesmo após 19 semanas. As concentrações residuais foram suficientes para evitar a germinação de *Phymatotrichum onnivorum*, exceto para a concentração de 10 µg/g incubado a 40°C. Os autores observaram também que a concentração original de

100  $\mu\text{g/g}$  de benomil diminuiu para 30  $\mu\text{g/g}$ , após um período de 19 semanas, quando incubado a 40°C.

Em solo arável, Raynal & Ferrari (1973) detectaram 8  $\mu\text{g/g}$  de benomil após seis meses da aplicação de 100  $\mu\text{g/g}$  do fungicida. Um composto relacionado a benzimidazol, o tiofanato-metílico, foi menos persistente que o benomil (Netzer & Dishon, 1973). O benomil nos solos foi detectado mesmo após três meses de sua aplicação. A concentração de benomil adicionada (100  $\mu\text{g/g}$ ) diminuiu mais rapidamente em extrato de solos ricos em húmus do que em solos de jardim e diminuiu lentamente em extratos de solos minerais (Helweg, 1973). Após seis meses da aplicação do benomil, o efeito fungistático em extrato de solo foi de <10% em solos com húmus, cerca de 30% em solos de jardim e 75% em solos minerais. Nesses trabalhos, não ficou claro se o efeito fungistático foi devido ao benomil e/ou carbendazim. Possivelmente, o carbendazim, facilmente formado a partir do benomil, foi responsável pela fungistase.

Em soluções aquosas ou solventes orgânicos, o benomil perde rapidamente o grupo butilcarbamoil, formando então o metil-2-benzimidazol carbamato (carbendazim, MBC), o qual é um componente estável e igualmente tóxico (Clemons & Sisler, 1969; Kilgore & White, 1970; Chiba & Doornbos, 1974). Helweg (1973) observou que todo o benomil adicionado ao solo foi convertido para carbendazim dentro de poucas horas.

Em estudos mais recentes, tem sido dada mais ênfase à persistência de carbendazim ao invés de benomil. O carbendazim resistiu à degradação e permaneceu, após muitos meses, como o maior metabólito de benomil nos solos, junto com 2-amino-benzimidazol (2-AB), como o menor produto (Baude *et al.*, 1974). O benomil marcado com  $^{14}\text{C}$ , aplicado em solução aquosa, se decompôs rapidamente nos solos. Em solos arenosos, foram detectados resíduos de benomil após quatro semanas, enquanto após doze semanas só foram detectados carbendazim e 2-AB. A meia-vida dos resíduos  $^{14}\text{C}$  foi de um ano. Contudo, em solos argilosos, mesmo após 24 meses, cerca de 51% do  $^{14}\text{C}$  total foi detectado.

Laurisden *et al.* (1977), citado por Rajagopal *et al.* (1984b), estudaram a persistência de benomil em solos, pela análise de carbendazim e 2-AB, durante dois anos. A meia-vida dos resíduos totais foi de quatro meses em solos arenosos e de dez meses em solos argilosos. Em solos secos ao ar, a perda de carbendazim em nove meses foi somente de 25 a 35%, enquanto em solos úmidos foi de 70 a 80% (Aharonson & Kafkafi, 1975). O carbendazim aplicado em três solos desapareceu mais rapidamente durante os quatro primeiros meses, enquanto que nos últimos três meses quase não houve modificação no nível do resíduo. Foi detectado 2-AB, embora em quantidades muito pequenas, além disso, observou-se também que o aumento de 2-AB foi maior em solo seco, quando com-

parado ao solo úmido. Kajfosz (1977), citado por Rajagopal *et al.* (1984b), confirma que o carbendazim adicionado ao solo diminuiu do nível original de 6 µg/g para 3 µg/g, nos três primeiros meses após a aplicação, sem nenhum decréscimo posterior durante os próximos seis meses.

Em solos, o tiofanato-metilico transformou-se em carbendazim (Fleecker *et al.*, 1974), sendo esta transformação quatro vezes mais rápida em pH 7,4 do que em pH 5,6. Neste trabalho também foi novamente observada uma estabilidade relativa do carbendazim. O solo incubado 51 dias com carbendazim marcado liberava entre 1 a 16% do  $^{14}\text{C}$  como  $^{14}\text{CO}_2$ . Foram recuperados, após 43 dias, 53 a 78% do  $^{14}\text{C}$  como 2- $^{14}\text{C}$ -carbendazim (Fleecker *et al.*, 1974). Siegel (1975) encontrou que, em solos argilosos suplementados com 1% de glicose e 0,5% de extrato de levedura, 21 e 34% do anel  $^{14}\text{C}$  em benomil haviam sido liberados como  $^{14}\text{CO}_2$ , após incubação de 180 e 340 dias, respectivamente, contra 16 e 27% em solos não enriquecidos. A baixa liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  indicou que o anel benzimidazólico foi totalmente estável e resistente à completa biodegradação.

Já Helweg (1977) recuperou, após 270 dias, 33 e 90% de  $^{14}\text{C}$  como  $^{14}\text{CO}_2$  em solos estéreis e não enriquecidos com  $^{14}\text{C}$ -carbendazim. Após 250 dias, 5 a 13% do  $^{14}\text{C}$  adicionado foram recuperados como carbendazim e 4 e 8% como 2-AB. A degradação foi mais rápida em solos retratados. Belanger (1989), analisando resíduos de pesticidas em óleo de monarda, recuperou somente 0,07 µg/ml de benomil, como carbendazim, enquanto no ano anterior foi recuperado 0,19 µg/ml. Esse fato ocorreu devido a uma aplicação inicial de 1,12 kg de ingrediente ativo, seguida de uma segunda aplicação 14 dias antes da colheita.

Foi curta a persistência de carbendazim aplicado em dois solos, via irrigação por gotejamento (Solel *et al.*, 1979). De 60 a 80% do fungicida foram perdidos entre 1 e 4 semanas e a degradação foi quase completa dentro de 10 semanas após a aplicação. Em laboratório, o carbendazim resistiu até 9 meses nos dois solos, mostrando uma meia-vida de 4 a 6 meses. O catabolismo mais rápido de carbendazim no campo foi atribuído às altas temperaturas de verão (>30°C) e à alcalinidade do solo.

O carbendazim aplicado nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg/g não foi detectado no solo após 3, 5, 8, e 11 meses respectivamente (Sinhá *et al.*, 1980). Já Musumeci *et al.* (1980a) observaram a persistência de carbendazim em dois solos latossolos (62 a 86%), mesmo após 300 dias de incubação. O produto de degradação 2-AB foi detectado em maiores quantidades (23%) em um dos solos enriquecidos com glicose e extrato de levedura. A degradação de carbendazim foi mais rápida em solos ricos em matéria orgânica (Musumeci *et al.*, 1980b). Após 150 dias de incubação, 2-AB foi o principal produto de degradação detectado.

O destino de produtos de degradação tem sido estudado em condições de laboratório, sob influência de tratamentos prévios dos respectivos fungicidas. Tem-se verificado que a adaptação microbiana aos produtos de degradação é relativamente significativa (Yarden *et al.*, 1990), principalmente quando o efeito pesticida é causado pelos produtos de degradação. Estes podem acelerar a degradação de pesticidas aplicados repetidamente, como podem também, por outro lado, prolongar a persistência dos mesmos no ambiente. O entendimento dos mecanismos envolvidos nas interações dos produtos de degradação é fundamental para se estudar o destino e os efeitos de pesticidas no ambiente. O 2-AB foi instável no solo, decompondo-se rapidamente após um intervalo de três semanas, mas pequenas quantidades permaneceram no solo por muitas semanas, presumivelmente pela adsorção das partículas no solo (Helweg, 1977). O desprendimento máximo de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -2-AB foi a  $22^\circ\text{C}$  e permaneceu constante entre  $25$  e  $30^\circ\text{C}$ . Todavia, a  $40^\circ\text{C}$ , o desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi insignificante (Helweg, 1979). A degradação de 2-AB (desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$ ) mostrou um aumento experimental de acordo com o aumento do conteúdo de água, de 28 a 94% da capacidade de campo do solo. Mas o desprendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  foi comparativamente menor em solos com a quantidade de água acima de 94% da capacidade de campo. O 2-aminobenzimidazol se dissipa rapidamente em solos expostos à molécula-mãe, carbendazim, permanecendo somente 6% deste após 4 dias de aplicação (Aharonson *et al.*, 1990). Nestes solos, a degradação de 2-aminobenzimidazol foi mais rápida do que a da molécula parental. A taxa de degradação do benzimidazole, um metabólito estruturalmente semelhante, não é afetada por aplicações continuadas do carbendazim. Já o carbendazim apresentou uma taxa de degradação mais rápida em solo com história de aplicação de benomil do que em solo sem aplicação desse produto (Yarden *et al.*, 1985).

Não há literatura sobre a persistência de benomil em água, porém dados de Johnson & Lavy (1994) demonstraram que é persistente no solo, embora seja reduzida a probabilidade do carbendazim chegar às camadas mais profundas do solo, devido à sua característica de forte adsorção e baixa permeabilidade.

## DEGRADAÇÃO QUÍMICA X MICROBIANA DOS BENZIMIDAZÓIS

Os mecanismos exatos para a adaptação microbiana às moléculas de pesticidas no solo ainda não estão completamente elucidados. Esses processos poderiam ser observados através de aspectos ecológicos e de po-

pulação, de suas reações bioquímicas e enzimáticas ou dos aspectos genéticos, nos quais elementos extracromossômicos podem estar envolvidos como parte do processo (Aharonson *et al.*, 1990).

São limitadas as informações sobre degradação microbiana de benomil ou carbendazim, como são também limitados e ineficientes os métodos para extração destes produtos em solo e em culturas puras, em laboratório. No sentido de quantificar a biodegradação desses fungicidas, Austin & Briggs (1976) desenvolveram um método de extração que assegura eficiente quantificação dos resíduos no solo. O método foi modificado por Silva (1996) para extração em meio de cultura líquido (Fig. 2). A determinação quantitativa é feita através de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se uma coluna de troca catiônica e detecção por ultravioleta, após extração e purificação das amostras.

Os microrganismos têm sido comprometidos na degradação do benomil e do carbendazim, baseados em estudos de persistência em sistemas estéreis e não estéreis (Helweg, 1973; Siegel, 1975; Helweg, 1977).

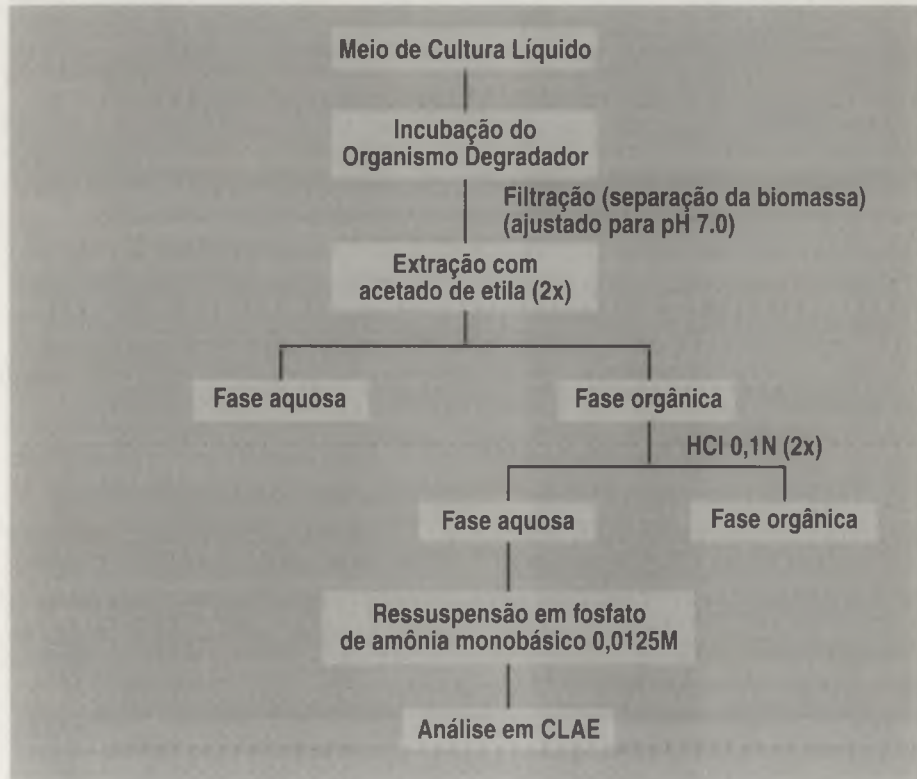


FIGURA 2. Etapas do processo para determinação quantitativa de resíduos do fungicida carbendazim.

A primeira referência de degradação microbiana foi feita a partir de estudos onde foi observada uma rápida perda de benomil no solo, o que poderia ser atribuído à lixiviação ou absorção pela planta. Em laboratório, o mesmo autor observou uma rápida perda do fungicida, quando os solos tinham sido previamente tratados com benomil ou carbenidazim. Em solos irradiados com raios gama ou que não foram tratados previamente com benomil, não houve perdas do fungicida (Woodcock 1978).

Muitas espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Flavobacterium* foram isoladas em solos enriquecidos com benomil (Smith & Worthing, 1975; Spencer *et al.*, 1972; Weekes & Hedric 1971), mas não foi observada a capacidade desses microrganismos em degradar o benomil, com a clivagem do anel benzimidazólico. Da mesma forma, o anel heterocíclico benzimidazólico, do carbendazim ou de benzimidazóis relacionados resistiu à clivagem pelos fungos durante o metabolismo (Davidse, 1976; Valenta *et al.*, 1974; Yasuda *et al.*, 1973). Há poucos exemplos da degradação pelos microrganismos, com aparente clivagem da metade heterocíclica (Fleecker *et al.*, 1974; Helweg, 1977; Siegel, 1975). De acordo com Helweg (1977), o fungicida foi raras vezes usado pelos microrganismos como fonte de energia, possivelmente pelo fato do núcleo benzimidazólico ser degradado por cometabolismo. Para outros autores, como Rouchaud *et al.* (1974, 1977a,b) e Solel *et al.* (1973), as plantas também são responsáveis pela clivagem do anel benzimidazol; porém, segundo Vonk & Kaars Sijpesteijn (1977), a decomposição fotoquímica contribui para a clivagem do anel.

Helweg (1979) verificou que os microrganismos foram os responsáveis pelo aumento da degradação de 2-AB em solos enriquecidos com 2-AB por um período de seis meses. Segundo o mesmo autor (1973), quatro linhagens bacterianas e duas linhagens fúngicas, isoladas em solos de jardim tratados com benomil, utilizaram o fungicida como fonte de carbono e nitrogênio e degradaram o composto após dois meses de incubação. Fuchs & De Vries (1978a,b), encontraram que culturas mistas de *Pseudomonas* spp., isoladas em solo tratado com benomil, efetuavam mais rapidamente a degradação de benomil do que as culturas puras. *Pseudomonas* spp. utilizaram o benomil e carbendazim como única fonte de carbono. O grupo n-butylcarbamol, da cadeia lateral de benomil, fornecia principalmente ou exclusivamente o carbono para a energia microbiana (Fuchs & De Vries, 1978b).

Em meio basal tamponado, suplementado com solo tratado com benomil, o carbendazim marcado começava a decrescer após 10 dias e quase desaparecia aos 40 dias. Concomitantemente havia formação de 2-AB radioativo, alcançando a concentração máxima aos 24 dias, dimi-



nuindo após 35 dias. A análise Budget demonstrou que o 2-AB foi convertido subsequente a  $\text{CO}_2$  (65%) e 2-AB nucleotídeo. Realmente, após 40 dias a maior parte da radioatividade encontrada no meio foi relacionada a 2-AB nucleotídeo. A análise total, conclusiva, demonstrou uma clivagem significativa do anel do núcleo benzimidazol de 2- $^{14}\text{C}$ -carbendazim para  $^{14}\text{CO}_2$ . Segundo Fuchs & De Vries (1978b), a proporção de degradação do benomil e carbendazim é baixa, e o composto parental benomil foi recuperado em quantidades substanciais mesmo após 80 dias de incubação.

A Fig. 3 ilustra a rota da degradação de benomil proposta por Rajagopal *et al.* (1984b), tanto no solo como em cultura pura.

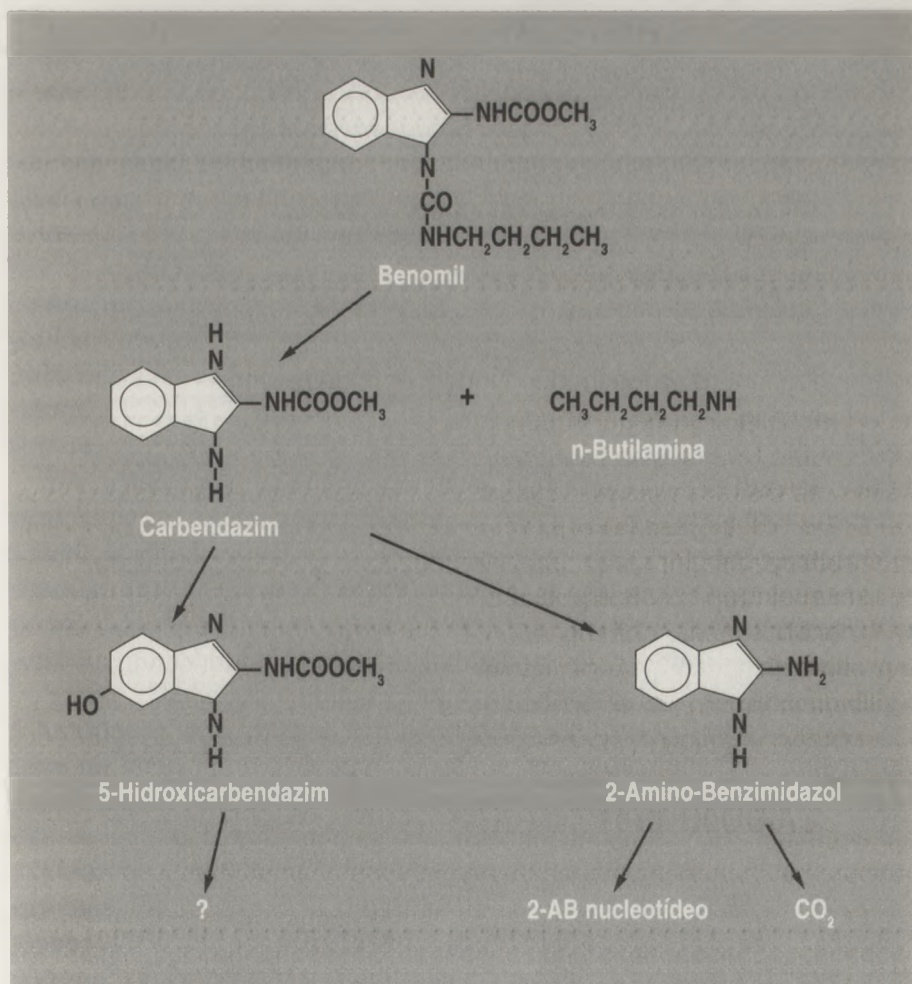


FIGURA 3. Rota da degradação de benomil no solo e em cultura pura.

de resistência a uma variedade de químicos devido à sensibilidade ou insensibilidade aos mesmos. O fenómeno da acelerada degradação de fungicidas não prevista do próprio químico, foi observado recentemente e específico da comunidade fúngica, numa atividade competitiva e subseqüente de adaptação, que pode ser resultado de interação entre o fungo e as condições ambientais (Gardner *et al.*, 1980).

Gardner *et al.* (1980) observaram que as taxas de degradação foram maiores em solos tratados previamente com o tipo de solo de cultivo, método de aplicação e fungicida. A degradação acelerada também foi evidenciada em solos tratados com fungicidas. Isso indica que os fatores biológicos são suficientes para condicionar o destino de um composto.

Em aplicações repetidas de pesticidas agrícolas como fungicidas, a degradação, outras práticas agrícolas como rotação de cultura, solarização ou esterilização em campo e persistência de carbendazim após o tratamento de solos foram observadas que também os fungicidas aceleram a degradação de carbendazim. Os resultados sugerem principalmente a população de fungos nativos validam a importância dos fungos *Alternaria* e *benomil*.

A degradação dos pesticidas não só resulta da aplicação de pesticidas, mas também da capacidade de degradação dos microrganismos nativos presentes estruturalmente no solo. Gardner *et al.* observaram, em solos que recebiam aplicação repetida de fungicidas de campo, um aumento na população de fungos até a colheita.

A degradação de carbendazim e benomil é influenciada pela proporção poderia ser imobilizada no solo. Os processos que causam uma redução dos níveis de fungos não tóxicos são considerados importantes para a degradação de fungos e não poluído.

O fungo *Alternaria* foi eficiente em degradar carbendazim e benomil. O fungo *Alternaria* também foi observado como fonte de carbendazim em dois dias e uma

meia-vida para carbendazim de aproximadamente 20 horas. Essa espécie tem sido reportada como predominante em solos tratados com benomil (Edgington *et al.*, 1971; Yarden *et al.*, 1981). *al.* (1990) atribuíram a degradação de carbendazim por *A. alternata* ao mecanismo metabólico do fungo; segundo eles, a conjugação ou oxidação poderiam ser consideradas como processos igualmente importantes na degradação. *A. alternata* e todos os Porosporae não são importantes fungicidas do grupo dos benzimidazóis e podem ser considerados como potentes agentes de descontaminação ambiental, pois esses fungos são usados extensivamente na agricultura, muitas vezes indiscriminadamente. Eles atuam numa ampla gama de gêneros de fungos fitopatogênicos, com importância agrônômica como os oídios, bolores (*Penicillium*), antracnoses, cercosporioses, sarnas e patógenos de solo.

Dentro da linha de biorremediação com a utilização de degradadores Silva *et al.* (1996) verificaram que o fungo lignícola *Phanerochaete chrysosporium* utiliza carbendazim como fonte de carbono e apresenta um potencial para degradação do produto. A capacidade de *P. chrysosporium* para degradar poluentes persistentes e tóxicos parece estar associada com a enzima peroxidase (Aust, 1990). Assim, esse fungo tem a única capacidade de degradar lignina para  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . O fungo secreta  $\text{H}_2\text{O}_2$  e peroxidases não específicas que catalizam a oxidação do radical livre e a despolimerização da lignina (Gold *et al.*, 1989).

No trabalho de Silva *et al.* (1996) não se determinou se *P. chrysosporium* degrada MBC em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , apesar de se ter verificado o principal produto de hidrólise do carbendazim, o 2-AB.

Um segmento que ganha importância no controle fitossanitário e o manejo integrado, ou seja, a utilização de um agente de biocontrole associado com doses reduzidas de um fungicida. Este tem a finalidade de enfraquecer a atividade do patógeno ao mesmo tempo em que se torna suscetível ao ataque pelo micoparasita. Silva (1991) obteve linhagens mutantes do fungo *Trichoderma harzianum*, resistentes aos fungicidas benomil, tiofanato metílico e benzimidazol. O uso desses mutantes em associação com subdosagens de benomil propiciou maior controle da podridão da alface, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, do que o fungicida ou o micoparasita aplicados isoladamente. Melo *et al.* (1995), verificaram que os mutantes 2B<sub>7</sub> e 2B<sub>6</sub> de *T. harzianum* utilizam carbendazim como fonte de carbono e degradam 50% do produto em aproximadamente 4 dias. Os resultados vêm demonstrar a importância desta prática na agricultura por ocasião da aplicação, uma vez que pode ser biologicamente degradado logo nos primeiros dias, não deixando resíduos altamente tóxicos no solo.

A degradação microbiana do benomil e de seu produto de hidrólise, o carbendazim (MBC), foi estudada por Helweg (1977) no solo, que observou ser o MBC uma fonte pobre de carbono, tendo sugerido que a biodegradação desse composto deve-se a um processo cometabólico. Cometabolismo é o fenômeno que ocorre quando um composto é transformado por um microrganismo, ainda que o organismo seja incapaz de crescer sobre o composto e não derive energia, carbono ou qualquer outro nutriente proveniente da transformação.

Vários trabalhos têm demonstrado a recalcitrância dos anéis benzimidazóis à degradação microbiana (Helweg, 1972; Fuchs & DeVries, 1978a,b). No entanto, a degradação acelerada de MBC pode ser obtida com solos sem histórico de aplicações ou em solos condicionados para degradação aumentada, através de aplicações prévias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, V.P. Thiram induced changes in soil microflora, their physiological activity and control of damping-off in chillies (*Capsicum annum*). **Indian Journal of Experimental Biology**, v.72, p.85, 1974.
- AHARONSON, N.; KAFKAFI, V. Adsorption, mobility and persistence of thiabendazole and methyl-2-benzimidazolecarbamate in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.23, p.720,1975.
- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.D. e COATS, J.R. eds **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington. American Chemical Society, 1990. p.113-127. (ACS Symposium Series, 426).
- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v.211, p.132-138, 1981.
- AUST, S.D. Degradation of environmental pollutants by *P. chrysosporium*. **Microbial Ecology**, v.20, p.197-209, 1990
- AUSTIN, D.J.; BRIGGS, G.G. A new extraction method for benomyl residues in soil and its application in movement and persistence studies. **Pesticide Science**, v.7, n.2, p.201-210, 1976.
- BAICU, T. Toxicity of some pesticides to *Trichoderma viride* Pers. **Crop Protection**, v.1, p.349-358, 1982.
- BAILEY, G.W.; SAFIR, G.R. Effect of benomyl on soybean endomycorrhizae. **Phytopathology**, v.68, n.12, p.1810-1812, 1978.
- BAUDE, F.J.; PEASE, H.L.; HOLT, R.F. Fate of benomyl on field soil and turf. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.3, p.413-418, 1974.
- BELANGER, A. Residues of azinphosmethyl, cypermethrin, benomyl and chlorotalonil in monarda and peppermint oil. **Acta Horticulture**, v.249, p.67-73, 1989.
- BOATMAN, N; PAGET, D.; HAYMAN, D.S.; MOSSE, B. Efeitos de fungicidas sistêmicos em infecção por micorriza vesicular-arbuscular e captação de fosfato pela planta. **Transaction of the British Mycological Society**, v.70, p.443, 1978.
- BOLLEN, G.J.; FUCHS, A. On the specificity of the in vitro e in vivo antifungal activity, of benomyl. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.76, p.299, 1970.
- BOLLEN, G.J.; SCHOLTEN, G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in Cyclamen. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.77, p.83, 1971.
- BRAY, D. **Cell movements**. New York: Garland Publishing, 1992.

- CARR, G.R.; HINKLEY, M.A. Germination and hyphal growth of *Glomus caledonicum* on water agar containing benomyl. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.313-316, 1985.
- CATSKA, V.; VRANY, J. Rhizosphere mycoflora of wheat after foliar application of chorocholin chloride, urea and 4-chloro-2-methyl-phenoxyacetic acid. **Folia Microbiologica**, v.21, p.268, 1976.
- CHIBA, M.; DOORBOS, F. Instability of benomyl in various conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.11, p.273-274, 1974.
- CLEMONS, G.P. & SISLER, H.D. Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.1, p.32, 1971.
- CLEMONS, G.P. & SISLER, H.D. Formation of a fungitoxic derivative from benlate. **Phytopathology**, v.59, p.705, 1969.
- DAVIDSE, L.C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G., eds. **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p.60-70.
- DAVIDSE, L.C.; FLACH, W. Differential binding of methyl-benzimidazol-2-yl-carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Cell Biology**, v.72, p.174-193, 1977.
- DAVIDSE, L.C. Metabolic conversion of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v.6, p.638, 1976.
- DE BERTOLDI, M.; PICCE, G.; GIOVANNETTI, M. Effetti genotossici ed alterazioni della flora micorrizica e rizosferica causati da alcuni fungicidi agricoli. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.27, p.131, 1978.
- DEKKER, J.; Resistance. In: MARCH, R.W. ed. **Systemic fungicides**. London: Longeman, 1977. P. 176-197.
- DELP, C.J. **Fungicide resistance in North America**. St. Paul: APS press, 1988.
- DIOS CANCELA, G.; ROMERO TABOADA, E.; SANCHEZ-RASERO. Carbendazim adsorption on montmorillonite, peat and soil. **Journal of Soil Science**, v.43, n.1, p.99-112, 1992.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v.61, n.1, p.42-44, 1971.
- FARETRA, F.; POLLASTRO, S. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. **Plant Pathology**, v.42, n.1, p.48-57, 1993.
- FERRIS, R.S.; MITCHELL, D.J. Populations dynamics of soil microorganisms associated with fungicide dusted *Caladium* seed pieces. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.57, 1981.
- FLEECKER, J.R.; SCHULTZ, I.R.; HOUKOM, E.C. Persistence and metabolism of thiophanate-methyl in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.4, p.592-592, 1974.
- FOSTER, M.G. The in vivo antifungal effects of benomyl on non-target soil fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.14, p.353, 1975.
- FOSTER, M.G.; McQUEEN, D.J. The effects of single and multiple application of benomyl on non-target soil bacteria. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.17, p.477, 1977.
- FUCHS, A.; de VRIES F.W. Bacterial breakdown II. Mixed cultures. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology**, v.44, p.293, 1978b.
- FUCHS, A.; de VRIES F.W. Bacterial breakdown of benomyl. I-Pure cultures. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology**, v.44, p.283, 1978a.
- FUCHS, A.; HOMANS, A.L.; de VRIES, F.W. Systemic activity of benomyl [1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamoyl acid methyl ester] against fusarium wilt of pea and tomato plants. **Phytopathology**, v.69, p.630, 1970.
- FUJIMURA, M.; OEDA, K.; INOUE, H.; KATO, T. A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. **Current Genetics**, v.21, p.399-404, 1992.

- GEORGOPOULOS, S.G. Cross-resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S.G. eds. **Fungicide resistance in crop protection** WAGENINGEN: Pudoc, 1982. p.53-59.
- GOLD, M.H.; WARISH, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **ACS Symposium Series 389** American Chemical Society, Washington, DC. 1989, p.127-140.
- GOLDMAN, G.H.; TEMMERMAN, W.; JACOBS, D.; CONTRERAS, R.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. A nucleotide substitution in one of the  $\beta$ -tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-cabamate. **Molecular Genetics**. v.240, p.73-80, 1993.
- GRIFFE, P.J. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*, **Transactions of the British Mycological Society**. v.60, p.433, 1973.
- GROSSBARD, E. Effects on the soil microflora. In: AUDUS, L.J. ed. **Herbicides: physiology, biochemistry, ecology** New York: Academic Press, 1976. p.99-147.
- HASTIE, A.C. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. **Nature** (London) v.226, p.771, 1970.
- HASTIE, A.C.; GEORGOPOULOS, S.G. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Genetic Microbiology**. v.67, p.371, 1971.
- HELWEG, A. Microbial breakdown of the fungicide benomyl. **Soil Biology and Biochemistry**. v.4, p.377-378, 1972.
- HELWEG, A. Persistence of benomyl in different soil types and microbial breakdown of the fungicide in soil and agar culture. **Tidskrift for Panteavl**. v.77, p.232-243, 1973.
- HELWEG, A. Degradation and adsorption of carbendazim and 2-aminobenzimidazole in soil. **Pesticide Science**. v.8, n.1, p.71-78, 1977.
- HELWEG, A. Influence of temperature, humidity and inoculation on the degradation of  $^{14}\text{C}$  labeled 2-aminobenzimidazole in soil. **Water, Air and Soil Pollution**. v.12, p.275, 1979.
- HINE, R.B.; JOHNSON, D.C.; WENGER, C.J. The persistency of two benzimidazole fungicides in soil and their fungistatic activity against *Phytophthora omnivorum*. **Phytopathology**. v.59, p.798, 1969.
- HOFER, I.; BECK, T.; WALLNOFER, P. Effect of fungicide benomyl on the microflora of soil. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**. v.78, p.399-405, 1971.
- JOHNSON, W.G.; LAVY, T.L. In-situ dissipation of benomyl, carbofuran, thiobencarb and triclopyr at three soil depths. **Journal of Environmental Quality**. v.23, p.556-562, 1994.
- JONES, A.L.; WALKER, R.J. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. **Plant Disease Reporter**. v. 60, p.40, 1976.
- JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R. Identification of an amino acids substitution in the **ben A**,  $\beta$ -Tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. **Cell Motil Cytoskeleton**. v.17, p.87-94, 1990.
- KAPPAS, A.; GEORGOPOULOS, S.G.; HASTI, A.C. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**. v.26, p.17, 1974.
- KAPUR, S.; BELFIELD, W.; GIBSON, N.H.S. The effects of fungicides on de soil fungi with special reference to nematophagous species. **Pedobiologia**. v.21, p.172, 1981.
- KILGORE, W.W.; WHITE, E.R. Decomposition of the systemic fungicide 1991 (benlate). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.5, p.67, 1970.
- KIRBY, A.H.M. Progress towards systemic fungicides. **Pesticide Articles and News Summaries** v.18, p.1, 1972.
- LIU, L.X.; HSIANG, T. Bioassays for benomyl adsorption and persistence in soil. **Soil Biology and Biochemistry**. v.26, p.317-324, 1994.
- MATSUMARA, F.; BENEZET, H.J. Microbial degradation of insecticides. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L., eds. **Pesticide microbiology** New York: Academic Press, 1978. p.623-667.

- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. In: LUZ, W.C. ED. **Reunião anual de patologia de plantas**, vol.4, 1996, p.261.
- MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; ABAKERLI, R.B.; SILVA, A.C.F. Degradação do fungicida carbendazim por *Trichoderma harzianum*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20, 1995. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Genética, Anais..., 1995. p.138.
- MILLER, M.M.; FLETCHER, J.T. Benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* isolates from glasshouse crops. **Transaction British Mycology**, v.62, p.99-103, 1974.
- MOUBASHER, A.H.; ABDEL-KADER, M.I.A.; ABDEL-MALLEK, A.Y. Effect of benomyl on soil, root surface and leaf surface fungi. **Zentralblat für Mikrobiologie**, v.139, p.281-291, 1984.
- MUGHOGHO, L.K. The fungus flora of fumigated soils. **Transactions of the British Mycological Society**, v.51, p.441, 1968.
- MUSUMECI, M.R.; CAINELLI, V.C.B.; RUEGG, E.F. Persistencia do fungicida carbendazim em amostras de solo do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.5, n.31, p.305-309, 1980a.
- MUSUMECI, M.R.; LORD, A.; FLORES-RWGG E. Adsorption, leaching and persistence of carbendazim in brazilian soils. **Reporter Biological Institute State Department of Agronomy**, São Paulo, Brazil (1980b).
- NETZER, D.; DISHON, I. Persistence of benomyl and thiophanate compounds in soil and various plants following soil application. **Phytoparasitica**, v.1, p.33, 1973.
- OAKLEY, B.R. g-tubulin: the microbule organizer? **Trends in Cell Biology**, v.2, p.1-5, 1992.
- OAKLEY, B.R.; OAKLEY, C.E.; YOON, Y.; JUNG, M.K.  $\gamma$ -tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, v.61, p.1289-1301, 1990.
- OAKLEY, C.E.; OAKLEY, B.R. Identification of  $\gamma$ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by **mip A** gene of *Aspergillus nidulans*. **Nature**, v.338, p.662-664, 1989.
- OKU, H.; OKI, K.; SHIRAIISH, T.; SATO, K.; OUCHI, S. Effects of fungicides benomyl and thiran on soil microflora and some soil inhabitant fungi. **Science Reporter Faculty of Agronomy**, Okayama University, Japan, v.54, p.1, 1979.
- ORBACH, M.J.; PORRO E.B.; YANOFKY, C. Cloning and characterization of the gene for  $\beta$ -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. **Molecular Cell Biology**, v.6, p.2452-2461, 1986.
- OSMANI, S.A.; OAKLEY, B.R. Cell cycle and tubulin mutations in filamentous fungi. In: BENNETT, J.W.; LASURE, L.L., eds. **More gene manipulations in fungi**. San Diego: Academic Press, 1991, p.107-125.
- PEEPLES, J.L. Microbial activity in benomyl-treated soils. **Phytopathology**, v.64, n.6, p.857-860, 1974.
- PICININI, E.C. Fungicidas benzimidazóis. **RAPP**, v.2, p.357-409, 1994.
- PITBALDO, R.E.; EDINGTON, L.V. Movement of benomyl in field soils as influenced by acid surfactantes. **Phytopathology**, v.62, p.513, 1972.
- PONCHET, J.; TRAMIER, R. Effects du benomyl sur la croissance de l'ceillet et la microflora des sols tretés. **Annals of Phytopathology**, v.3, p.401, 1971.
- RAJAGOPAL, B.S.; BRAHAMAPRAKASH, G.P.; SETHUNATHAN, N. Degradation of carbofuran by enrichment cultures and pure cultures of bacteria from flooded soils. **Environmental Pollution Series. A**, v.36, 1984a.
- RAJAGOPAL, B.S.; BRAHAMAPRAKASH, G.P.; REDDY, B.R.; SINGH, U.D.; SETHUNATHAN, N. Effect and persistence of selected carbamate pesticides in soil. **Residue Reviews**, v.93, p.6-19, 1984b.
- RAMAKRISHNA, C.; GOWDA, T.K.S.; SETHUNATHAN, N. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 21:328-333, 1979.
- RAYNAL, G.; FERRARI, F. Remenence et action sur la microflore fongique du benomyl utilisé en incorporation a un sol. **Phytopharmacology** v.22, p.259, 1973.
- RHODES, R.C.; LONG, J.D. Run-off and mobility studies on benomyl in soils and turf. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.12, p.385, 1974.

- ROUCHAUD, J.P.; DECALLONE, J.R.; MEYER, J.A. Metabolic fate of methyl-2-benzimidazolecarbamate in melon plants. **Phytopathology**, v.63, n.12, p.1513-1571, 1974.
- ROUCHAUD, J.P.; DECALLONE, J.R.; MEYER, J.A. Metabolism of 2-aminobenzimidazole in melon plants. **Pesticide Science**, v.8, n.1, p.31-34, 1977a.
- ROUCHAUD, J.P.; LHOEST, G.J.; MERCIER, M.J.; MEYER, J.A. Metabolism of benomyl in carrot strawberry and apple. **Pesticide Science**, v.8, p.23-30, 1977b.
- SEIBERT, D.; ZIMMERMANN, E.K.; LEMPERLE, E. Genetic effects of fungicides. **Mutation Research**, v.10, p.533, 1970.
- SIEGEL, M.R. Benomyl-soil microbial interactions. **Phytopathology**, v.65, p.219, 1975.
- SILVA, A.C.F. Obtenção e caracterização de novos biótipos de *Trichoderma barzianum*, Rifai, resistentes a benzimidazóis, através de luz ultra-violeta. Piracicaba: USP/ESALQ, 1991. 133p. (Tese de Mestrado).
- SILVA, C.M.M.S. **Biodegradação do fungicida carbendazim**. Rio Claro: UNESP, 1996, 86p. Tese de Doutorado.
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; MELO, I.S. Degradação do fungicida carbendazim por *Phanerochaete chrysosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.496-498, 1996.
- SINHA, A.P.; AGNIHOTRI, V.P.; SINGH, K. Persistence of carbendazim in soil and its effect on rhizosphere in fungi of sugar beet seedlings. **Indian Phytopathology**, v.33, p.21, 1980.
- SMILEY, R.W.; CRAVEN, M.M.; Fungicides in Kentucky bluegrass turf; effects on thatch and pH; **Agronomy Journal**, v.70, p.1013, 1978.
- SMITH, P.M.; WORTHING, C.R. Microbial degradation of soil applied fungicides. **Report. Glasshouse Crops Research Institute**, v.1974, p.106, 1975.
- SOLEL, Z.; SANDLER, D.; DINOOR A. Mobility and persistence of carbendazim e thiabendazole applied to soil via drip irrigation. **Phytopathology**, v.69, n.12, p.1273-1277, 1979.
- SOLEL, Z.; SCHOOLEY, J.M.; EDGINGTON V. Uptake e translocation of benomyl and carbendazim (methyl benzimidazol-2-yl carbamate) in the symplast. **Pesticide Science**, v.4, p.713, 1973.
- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. In: **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 128-140. (ACS Symposium Series, 426).
- SPENCER, D.M.; SMITH, P.M.; WORTHING, C.R. Breakdown of benomyl by soil microorganisms. **Report. Glasshouse Crops Research Institute**, v.1971, p.111, 1972.
- STAUTON, N.P.; KAVANAGH, T. Resistance of pests and pathogens to pesticides. In: **Proceedings 8th British Insecticide and Fungicide Conference**, Brighton Research Report, v.1, p.1, 1975.
- SULLIVAN, K.F. Structure and utilization of tubulin isotypes. **Annual Review of Cell Biology**, v.4, p.687-716, 1988.
- VALENTA, J.R.; DICUOLLO, C.J.; FARE, L.R.; MILLER, J.A.; PAGANO, J.F.: Microbial transformation of methyl 5(6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate. **Applied Microbiology**, v.28, p.995, 1974.
- VAN FAASSEN, H.G.; Effect of the fungicide benomyl on some metabolic processes and on number of bacteria and actinomycetes in the soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6, p.131-133, 1974.
- VONK, J.W.; SIJPESTEIJN, K. Metabolism. In: MARSH, R.H., ed. **Systemic fungicides**. London: Longman, 1977. p.160-175.
- WAINWRIGHT, M.; PUGH, G.J.F. The effect of fungicides on certain chemical and microbial properties of soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6, p.263, 1974.
- WEEKS, R.E.; HEDRICK, H.G. Influence of a systemic fungicide on oxygen uptake by soil microorganisms. **Soil Science**, v.119, p.280, 1971.
- WINSLEY, R.N.; HUANG, C.M. Control of *Fusarium* with of muskmelon and other effects of benomyl soil drenches. **Canadian Journal of Microbiology**, v.16, p.615, 1970.



- WOODCOCK, D. Microbial degradation of fungicides, fumigants and nematocides. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L., eds. **Pesticide microbiology**. New York: Academic Press, 1978. p.731-780.
- WOODCOCK, D. Structure-activity relationships. In: MARSH, R.W., ed. **Systemic fungicides**. London: Logman, 1977. p.32-84.
- YARDEN, O.; AHARONSON, N.; KATAN, J. Accelerated microbial degradation of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate in soil and its control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.735-739, 1987.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEN-YEPHET, Y.; Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**, v.75, p.763-767, 1985.
- YARDEN, O.; SALOMON, R.; KATAN, J.; AHARONSON, N. Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.15-23, 1990.
- YASUDA, Y.; HASHIMOTO, S.; SOEDA, Y.; NOGUCHI, T. Metabolism of thiophanate-methyl by pathogenic fungi and antifungal activity of its metabolites. **Annals of Phytopathological Society of Japan** v.39, p.49, 1973.
- ZHENG, Y.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.  $\gamma$ -tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. **Cell**, v.65, p.817-823, 1991.
- ZOZINEK, J.V. Environmental transformations of DPA, SOPP, benomyl and TBZ. **Residue Reviews**, v.92, p.114-155, 1984.

The first part of the book is devoted to a general history of the United States from its discovery by Columbus in 1492 to the present time. It covers the early years of settlement, the struggle for independence, and the formation of the Constitution.

The second part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the beginning of the American Revolution in 1775 to the end of the Civil War in 1865. It covers the military and political events of this period.

The third part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Civil War in 1865 to the present time. It covers the Reconstruction period, the Gilded Age, and the Progressive Era.

The fourth part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Progressive Era in 1914 to the present time. It covers the First World War, the Great Depression, and the Second World War.

The fifth part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Second World War in 1945 to the present time. It covers the Cold War, the Vietnam War, and the present day.

The sixth part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Vietnam War in 1975 to the present time. It covers the Watergate scandal, the Iran-Iraq War, and the present day.

The seventh part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Vietnam War in 1975 to the present time. It covers the Watergate scandal, the Iran-Iraq War, and the present day.

The eighth part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Vietnam War in 1975 to the present time. It covers the Watergate scandal, the Iran-Iraq War, and the present day.

The ninth part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Vietnam War in 1975 to the present time. It covers the Watergate scandal, the Iran-Iraq War, and the present day.

The tenth part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Vietnam War in 1975 to the present time. It covers the Watergate scandal, the Iran-Iraq War, and the present day.

The eleventh part of the book is devoted to a detailed history of the United States from the end of the Vietnam War in 1975 to the present time. It covers the Watergate scandal, the Iran-Iraq War, and the present day.

---

# 7

## COMO ISOLAR MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS

---

Itamar Soares de Melo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — EMBRAPA

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento

e Avaliação de Impacto Ambiental — CNPMA

Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

João Lúcio de Azevedo

Instituto de Biologia, Universidade Federal de Goiás, GO

Campus Samambaia, CEP 74001-970

---

### INTRODUÇÃO

O sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um microrganismo ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo. O isolamento permite estudar com mais detalhes as vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários etc.

Os estudos relativos às enzimas envolvidas no processo de biodegradação auxiliam a estabelecer correlações sobre estrutura-biodegradabilidade. Também, o isolamento pode explicar que tipo de degradação pode estar ocorrendo no ambiente, se catabólica (mineralização) ou cometabólica. Na mineralização, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores, que posteriormente serão metabolizadas por reações que geram energia. Conseqüentemente, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e a concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana. A mineralização significa que a molécula é degradada completamente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal como:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCl}$ . É, portanto, o único meio de eliminar um composto xenobiótico do ambiente. Em alguns casos, uma porção da molécula pode ser degradada e outra porção pode se acumular no solo. Por outro lado, no cometabolismo, não há nenhum dispêndio de energia. Em geral, alta persistência no ambiente ocorre com pesticidas degradados por processos cometabólitos. No

cometabolismo, o crescimento microbiano requer a presença de um outro substrato, isto é, um substrato secundário é requerido como fonte de carbono e energia. Desta forma, os microrganismos podem transformar a molécula sem dela retirar energia para o seu desenvolvimento.

Algumas características essenciais das estratégias pelas quais a microflora degrada os pesticidas são listadas por Fournier *et al.* (1993) e sumarizadas na Tabela 1.

TABELA 1. Estratégias microbianas para a degradação de pesticidas no solo.

TERMO USUAL	METABOLISMO	COMETABOLISMO
Principal suporte para o crescimento	Pesticida	Outros substratos
Número de pesticidas de interesse	Poucos	Muitos
Fontes de carbono energia	Baixas quantidades, mas específicas	Às vezes grandes quantidades mas alta competição com os demais microrganismos
Microflora envolvida	Poucas linhagens bacterianas específicas	Freqüentemente organismos omnívoros como os fungos
Principal problema agrícola	Adaptação à degradação após suplementação microbiana	Persistência acidental excessiva
Principal problema ambiental	Mobilidade	Excesso de pesticida ou persistência de metabólito e mobilidade

Outros mecanismos, utilizados pelos microrganismos na remoção de pesticidas, são as reações de conjugação, as quais consistem na combinação da molécula do xenobiótico ou um de seus metabólitos com outros compostos como carboidratos ou aminoácidos, levando à formação de moléculas mais hidrossolúveis. O acúmulo do xenobiótico pode ocorrer dentro das células, por um processo ativo ou passivo, ocasionando uma remoção temporária da molécula do ambiente (Musumeci, 1992).

## ESTRATÉGIAS DE ISOLAMENTO

As estratégias básicas de isolamento de microrganismos degradadores são relativamente fáceis e diretas.

As populações de microrganismos degradadores de pesticidas representam uma pequena fração da população total para muitos pesticidas. Partindo-se do princípio de que as populações microbianas capazes de metabolizar um determinado xenobiótico são encontradas em baixa frequência, estratégias especiais de isolamento devem ser adotadas para maximizar as chances de sucesso.

Amostras de solos, água, sedimentos ou de outras áreas contaminadas em que sabidamente existem microrganismos degradadores são coletadas. No caso de pesticidas, pode-se recorrer a áreas agrícolas com histórico de aplicações continuadas de determinado produto ou àquelas áreas onde se preparam as misturas de pesticidas para pulverização. Também pode-se coletar amostras de solo em regiões onde se faz tratamento de frutas com fungicidas, principalmente aqueles protetores contra doenças que ocorrem em pós-colheita.

Certos fungos adquirem resistência a determinados fungicidas devido à pressão natural ocasionada por aplicações sucessivas. Citam-se os fungicidas sistêmicos como benomil, carbendazim, iprodione e vinclozolim, dentre outros, como os mais utilizados na agricultura e com maior número de casos de ocorrência de resistência. É possível que estes fungos possam estar utilizando o fungicida como fonte de carbono (Melo *et al.*, 1997) ou que outros fungos e actinomicetos possam, devido às constantes aplicações, estar degradando estes compostos.

Locais de tratamento de madeira com certos protetores, como PCP e Creosoto, podem ser amostrados para isolamento seletivo desses compostos. Indústrias de papel e celulose podem também ser escolhidas para isolamento de microrganismos degradadores de celulose, hemicelulose etc. Fungos ligninolíticos podem ser isolados a partir de podridões de raízes de árvores etc. Em virtude da natureza química complexa da lignina, muitos microrganismos degradadores desse polímero, dentre eles os basidiomicetos, têm se destacado como potentes biodegradadores de pesticidas do grupo dos organoclorados (Bumpus *et al.*, 1985).

Um caminho mais rápido e direto é partir para o isolamento seletivo de um determinado grupo de microrganismos, sabidamente já testados como potentes agentes degradadores. Assim é que se isolou o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, agente causal da podridão branca de madeira. Esse fungo produz peroxidases que catalizam a despolimerização inicial oxidativa da lignina.

O solo, contudo, permanece como o mais importante reservatório para o isolamento de microrganismos. A comunidade microbiana, o número e tipos de microrganismos presentes num solo em particular, são muito influenciados pela localização geográfica, temperatura do solo, tipo de solo, pH do solo, conteúdo de matéria orgânica, cultivo, aeração e umidade. Por exemplo, os actinomicetos são encontrados em pequeno número em solos alagados com baixa tensão de oxigênio. Solos de florestas contêm uma predominância de *Streptomyces* que são tolerantes à acidez (Davis & Williams, 1970), enquanto solos ácidos e solos alcalinos podem conter menor número de *Streptomyces* e maior número de *Actinoplanes* e *Streptosporangium*.

Como a biodegradação de muitos pesticidas tem sido aumentada na presença de raízes de plantas e exudados de raízes (Hsu & Bartha, 1979; Reddy & Sethunathan, 1983; Walton & Anderson, 1992) devido à grande biomassa e atividade microbiana, em função de substratos de carbono fornecidos pela rizodeposição, é possível, sem dúvida, amostrar solos rizosféricos à procura de microrganismos degradadores. Na rizosfera, análogos estruturais de vários xenobióticos presentes em exsudados, componentes de paredes celulares e lisados, assim como produtos secundários da decomposição desses materiais podem ser seletivos para microrganismos que metabolizam ou cometabolizam estes compostos xenobióticos. Nessa linha de pesquisa é que Hsu & Bartha (1979) relataram que a presença de plantas ou irrigação de solo com exsudados de raízes aumentaram a taxa de mineralização de paration em comparação a solo não cultivado. Em outro estudo, Sandman & Loos (1984) encontraram taxas mais elevadas de microrganismos degradadores de 2,4-D em solos da rizosfera de cana-de-açúcar do que em solos não-rizosféricos. Os autores explicam que os degradadores de 2,4-D parecem ter sido seletivamente favorecidos na rizosfera de cana-de-açúcar.

Os fatores ambientais abióticos citados, que podem atuar na atividade microbiana afetam, portanto, a degradação de pesticidas no solo. É possível, assim, obter microrganismos com potencial para degradar um determinado composto xenobiótico em solos virgens. No entanto, é de se esperar que em solos contaminados os microrganismos possam se adaptar e adquirir a capacidade de utilizar o composto como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo.

Sendo os xenobióticos substâncias orgânicas sintéticas, e, portanto, estranhas ao ambiente, eles são difíceis de serem degradados pelos microrganismos que evoluíram e adquiriram mecanismos genéticos para o catabolismo e reciclagem de produtos biossintéticos. Desse modo, a procura de microrganismos degradadores pode ser dirigida àqueles locais

com problemas detectados de contaminação ou de uso intensivo de pesticidas. Porém, o insucesso no isolamento do microrganismo ideal pode estar relacionado à recalcitrância da molécula em estudo, fato este que incrementa ainda mais os problemas de poluição ambiental.

### Coleta de Amostras de Solo

Quando o objetivo da coleta é somente o isolamento de microrganismos úteis com potencial para degradação, não é necessário, em geral, proceder à coleta de amostras representativas da área em estudo. Procede-se, nesse caso, à coleta diretamente daquele local, tomando-se o cuidado de coletar pequenas sub-amostras, misturá-las e homogeneizá-las. Informações adicionais da área amostrada, tais como: tipo de solo, horizonte do solo, devem ser obtidas para referências futuras. Do mesmo modo, o transporte e armazenamento dessas amostras requerem alguns cuidados, podendo-se manter o solo à temperatura ambiente por vários meses antes do isolamento. No entanto, as condições de armazenamento podem induzir mudanças nas populações microbianas chegando, sob condições extremas, a matar microrganismos úteis. O ideal seria manter as amostras de solo no laboratório conservando as mesmas características físicas, químicas e biológicas, tais como aquelas encontradas *in situ*. Isso é quase impossível e, assim, recomenda-se proceder ao isolamento imediatamente após as coletas ou poucos dias depois. Há evidências de mudanças na população microbiana dentro de poucas horas da amostragem e, portanto, as amostras deveriam ser analisadas dentro de, aproximadamente, 6 horas após a coleta (Jensen, 1968). Para minimizar as variações na aeração e conteúdo de umidade das amostras é preferível coletar grandes blocos de solo e subdividi-los em pequenas sub-amostras imediatamente antes do uso. Já para amostras de solo que serão utilizadas para análises químicas é mais satisfatório, em geral, congelar ou secar as amostras imediatamente. No entanto, há exceções como, por exemplo, no caso de análise de nitrito, em que a secagem não é recomendada. Para análise de nitrato, o solo deveria ser seco dentro de um período de 24 horas, do contrário, o nível de nitrato é aumentado durante o processo de secagem (Paul & Clark, 1989).

É comum acondicionar as amostras no laboratório em sacos de polietileno, os quais permitem uma razoável aeração. Para manter a umidade, estes sacos podem ser selados com outro saco, contendo algumas gotas de água (Casida *et al.*, 1964).

Quando o objetivo da coleta também inclui estudos sobre dinâmica de populações, biomassa de microrganismos e enumeração de micror-

ganismos degradadores, é essencial que os procedimentos de amostragem sejam planejados a fim de que os erros de amostragem sejam minimizados. No mínimo, mais de duas amostras deveriam ser tomadas a partir de uma área e analisadas separadamente para evitar qualquer erro ocasionado pela variabilidade. Várias pequenas sub-amostras de um local são preferíveis a uma grande amostra de solo. A umidade do solo deveria ser muito homogênea. Quando a área em estudo é heterogênea, com horizontes de solos distintos, aconselha-se subdividi-la em unidades menores, mais homogêneas e analisá-las separadamente.

Via de regra, amostras deveriam ser coletadas nos primeiros 5 cm do perfil do solo, já que é nesta profundidade que tem lugar a maior atividade microbiana. Se na área amostrada não se encontrar um grande número de microrganismos, pode-se recorrer ao isolamento a partir de solo rizosférico ou de raízes. É nesta zona que ocorre a maior atividade microbiana. Ademais, há preferência de certos microrganismos pelas raízes de plantas. Bactérias, em geral, são colonizadoras de raízes e são capazes de utilizar glucose, alanina, acetato etc.

Solos secos ao ar e homogeneizados devem ser peneirados através de uma peneira de 2 mm de malha. Uma porção do solo (1-10 g) é diluída em solução salina (0,85%) ou tampão Tris e agitada por alguns minutos, a 100-150 rpm. Uma leve agitação da mistura (solo + sol. tampão), realizada em um banho-maria ultrasônico, de baixa energia, pode ser usada para liberar microrganismos de partículas de solo.

Homogeneização mecânica do solo com auxílio de um liqüidificador tem sido mais eficiente na dispersão das partículas do que a agitação em *shaker* (Kanazawa *et al.*, 1986). Segundo Strickland *et al.* (1988), este procedimento foi mais útil para um solo altamente orgânico, devido à natureza da agregação, comparado com solos minerais. Estes procedimentos têm tido muito sucesso e são ideais para o isolamento de bactérias.

Para facilitar a liberação de microrganismos durante a agitação, MacDonald (1986) usou uma resina quelante de troca iônica e um detergente aniônico para quelar cátions di e polivalentes que causam floculação e evitar as interações adesivas entre as partículas do solo.

Um procedimento proposto por Hopkins *et al.* (1991) incorpora alguns passos a fim de maximizar a dispersão de agregado do solo e liberar microrganismos (Fig. 1). Depois de cada etapa do processo, as células liberadas são coletadas no sobrenadante, seguindo a baixa centrifugação (500 xg por até 2 minutos). O material precipitado após cada etapa é reextraído na etapa seguinte. O sobrenadante de cada etapa constitui o extrato e o "pellete" final representa o resíduo.

Existem técnicas especiais para recuperação de fungos não-esporulantes do solo. Geralmente as hifas tendem a aderir às partículas



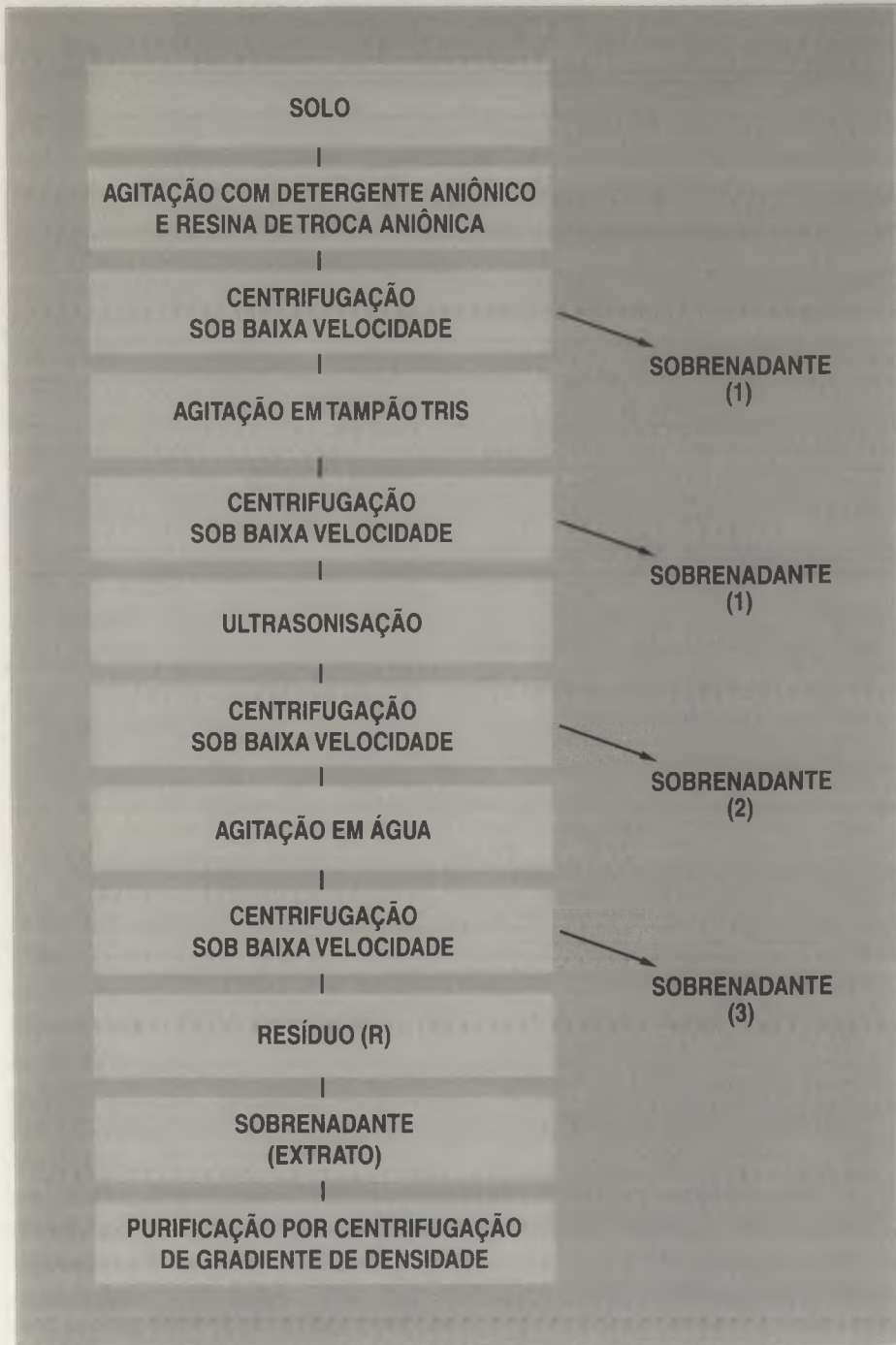


FIGURA 1. Fluxograma mostrando as etapas para máxima dispersão de agregados do solo e centrifugação diferencial proposto por Hopkins *et al.* (1991).

a semeadura de 5 a 10 mg de solo  
de cultura solidificado pode resultar

### Seleção e Enriquecimento de Colônias

seletivos e semiseletivos descritos  
individuais ou grupos de bactérias e de

colono e suplementação do meio de cul-  
sido usadas com sucesso para isolar  
técnicas têm a vantagem de estimu-  
de utilização do composto, como  
vantagem seletiva em detrimento dos  
aquele solo. Segundo Bartha (1990), o  
contra em amostras do ambiente em  
simples, o composto xenobiótico é  
carbono e energia. O autor cita que,  
outros elementos críticos tais  
ou nitrogênio (aminas, anilinas, her-  
nutrientes podem ser também utiliza-  
feito, geralmente, quando o esqueleto  
mineralização. Neste caso, contudo,  
pesticida, mas outras substâncias do  
"metabolismo".

processo de enriquecimento de solos e  
é o alto grau de toxicidade, in-  
ou instabilidade térmica das subst-  
esses fatores, segundo Bartha (1990),  
como meio de cultura de tal modo que  
de isolamento. Os solventes de  
piridina, hexano, diclorometano,  
fenólicos (fensol, cresol), aminas  
do 1,2-diclorobenzênio (para  
organometálicos (naftaleno, nítrico,  
mercuriais) exil...  
concentrações...  
destruir potenciais  
portanto, para estes com-  
de sedimento, baixas concen-  
solventes podem ser também forne-

A seleção de microrganismos em meio de cultura requer muita habilidade por parte do técnico, no sentido de distinguir colônias degradadoras daquelas oligocarbofílicas acidentais. Os meios de cultura para isolamento geralmente são compostos de uma solução de sais minerais suplementada com o composto xenobiótico em estudo, que é usado, via de regra, como fonte de carbono. Em alguns casos, a identificação de colônias degradadoras pode ser melhor visualizada através de halos ao redor das colônias. O meio para isolamento de celulolíticos é adicionado carboximetilcelulose cuja hidrólise é visualizada por meio de uma zona clara ao redor das colônias, após inundar as placas com solução aquosa de 1% de iodeto de amônio hexadeciltrimetil (Harilkin & Anagnostakis, 1977). Para isolamento de quitinolíticos, por exemplo, Hsu & Lockwood (1975), empregaram um meio mineral suplementado com quitina coloidal.

Um diagnóstico rápido para identificar biodegradadores é observada a mudança de cor do meio de cultura, ou halo de degradação ao redor das colônias, em função do uso de indicadores ácido-base. A viragem mediada por um processo metabólico específico de linhagens degradadoras. Um exemplo ilustrativo é o herbicida atrazina, usando-se o indicador vermelho de bromocresol em um meio de sais minerais com 2,4-D como única fonte de carbono e extrato de levedura como fator de crescimento (Sandman & Loos, 1984). A oxidação microbiana do 2,4-D resulta na produção de HCl, que muda a cor do meio de vermelho (pH 7.0) para amarelo (pH 5.2). Desse modo, esse e outros indicadores ácido-bases como azul de bromotimol e eosina-azul de metileno, incorporados ao meio de cultura, podem ser usados para isolamento de microrganismos degradadores de pesticidas organoclorados. Utilizando reagentes indicadores, Borella & Bartha (1969) isolaram microrganismos do solo que cometabolizam anilinas substituídas e azobenzenos. Os autores recorreram ao uso de p-anisidina ou p-anisidina- $H_2O_2$ , que foram pulverizadas sobre as colônias desenvolvidas em meio de cultura não seletivo após incubação das mesmas. A condensação oxidativa da p-anisidina é detectada através da descoloração marrom-avermelhada das colônias. O uso de indicadores em meios de cultura facilita e agiliza a seleção de um número considerável de microrganismos degradadores, ao mesmo tempo em que simplifica as determinações através do número mais provável de microrganismos degradadores e evita as quantificações futuras de centenas de prováveis microrganismos via cromatografia.

Em muitos casos, o próprio xenobiótico, usado no meio de cultura sólido, é usado para indicar e identificar colônias degradadoras. O isolamento de *Pseudomonas* sp. degradadoras do herbicida atrazina foi realizado em um meio de cultura sólido contendo sais minerais e 0,1% de atrazina.

mais pesadas no solo e, nesse caso, a semeadura de 5 a 10 mg de solo diretamente na superfície do meio de cultura solidificado pode resultar em maior número de colônias.

## Meios de Cultura e Seleção de Colônias

Existem muitos meios de culturas seletivos e semiseletivos descritos para o isolamento de espécies individuais ou grupos de bactérias e de fungos.

Técnicas de enriquecimento do solo e suplementação do meio de cultura com o pesticida em estudo têm sido usadas com sucesso para isolar microrganismos degradadores. Essas técnicas têm a vantagem de estimular os microrganismos com potencial de utilização do composto, como fonte de nutriente, dando-lhes uma vantagem seletiva em detrimento dos microrganismos mais abundantes naquele solo. Segundo Bartha (1990), o carbono orgânico utilizável se encontra em amostras do ambiente em pequenas quantidades, e no caso mais simples, o composto xenobiótico é oferecido como uma fonte seletiva de carbono e energia. O autor cita que, quando o composto xenobiótico contém outros elementos críticos tais como fósforo (inseticidas fosfatados) ou nitrogênio (aminas, anilinas, herbicidas a base de fenilamidas) estes nutrientes podem ser também utilizados como agentes seletivos o que é feito, geralmente, quando o esqueleto de carbono da molécula é resistente à mineralização. Neste caso, contudo, a fonte de carbono e energia não é o pesticida, mas outras substâncias do solo. Este é o fenômeno de "cometabolismo".

Um problema que surge no processo de enriquecimento de solos e nos respectivos meios de isolamento é o alto grau de toxicidade, insolubilidade em água, alta volatilidade ou instabilidade térmica das substâncias xenobióticas. Um ou mais desses fatores, segundo Bartha (1990), pode evitar ou inibir o crescimento no meio de cultura de tal modo que torna-se infrutífera qualquer tentativa de isolamento. Os solventes de baixo peso molecular (clorofórmio, piridina, hexano, ciclohexano, benzeno), os aldeídos (formaldeído), os fenólicos (fenol, cresol), aminas aromáticas (anilina, benzidina), ésteres do ácido hidroxibenzóico (paraben, metilparaben) e complexos organometálicos (naftaleno cúprico, fenilmercúrio e compostos alquilmercuriais) exibem alta toxicidade aos microrganismos (Bartha, 1990), e concentrações normais ao redor de 1% desses compostos chegam a esterilizar a amostra e destruir potenciais microrganismos degradadores. Recomenda-se portanto, para estes compostos, adicionar às amostras de solo ou de sedimento, baixas concentrações e aplicar repetidamente. Os solventes podem ser também fornecidos como vapor.

A seleção de microrganismos em meio de cultura requer muita habilidade por parte do técnico, no sentido de distinguir colônias degradadoras daquelas oligocarbofílicas acidentais. Os meios de cultura para isolamento geralmente são compostos de uma solução de sais minerais suplementada com o composto xenobiótico em estudo, que é usado, via de regra, como fonte de carbono. Em alguns casos, a identificação de colônias degradadoras pode ser melhor visualizada através de halos ao redor das colônias. Em meio para isolamento de celulolíticos é adicionado carboximetilcelulose, cuja hidrólise é visualizada por meio de uma zona clara ao redor das colônias, após inundar as placas com solução aquosa de 1% de brometo de amônio hexadeciltrimetil (Hankin & Anagnostakis, 1977). Para isolamento de quitinolíticos, por exemplo, Hsu & Lockwood (1975), empregaram um meio mineral suplementado com quitina coloidal.

Um diagnóstico rápido para identificar biodegradadores é observar a mudança de cor do meio de cultura, ou halo de degradação ao redor das colônias, em função do uso de indicadores ácido-base. A viragem é causada por um processo metabólico específico de linhagens degradadoras. Um exemplo ilustrativo é o herbicida atrazina, usando-se o indicador vermelho de bromocresol em um meio de sais minerais com 2,4-D como única fonte de carbono e extrato de levedura como fator de crescimento (Sandman & Loos, 1984). A oxidação microbiana do 2,4-D resulta na produção de HCl, que muda a cor do meio de vermelho (pH 7.0) para amarelo (pH 5.2). Desse modo, esse ou outros indicadores ácido-base como: azul de bromotimol e eosina-azul de metileno, incorporados ao meio de cultura, podem ser usados para isolamento de microrganismos degradadores de pesticidas organoclorados. Utilizando reagentes indicadores, Bordeleau & Bartha (1969) isolaram microrganismos do solo que cometabolizam anilinas substituídas e azobenzenos. Os autores recorreram ao uso de p-anisidina ou p-anisidina- $H_2O_2$ , que foram pulverizadas sobre as colônias desenvolvidas em meio de cultura não seletivo após incubação das mesmas. A condensação oxidativa da p-anisidina é detectada através da descoloração marrom-avermelhada das colônias. O uso de indicadores em meio de cultura facilita e agiliza a seleção de um número considerável de microrganismos degradadores, ao mesmo tempo em que simplifica as determinações através do número mais provável de microrganismos degradadores e evita as quantificações futuras de centenas de prováveis microrganismos via cromatografia.

Em muitos casos, o próprio xenobiótico, usado no meio de cultura sólido, é usado para indicar e identificar colônias degradadoras. Isolamento de *Pseudomonas* sp. degradadoras do herbicida atrazina foi feito em um meio de cultura sólido contendo sais minerais e 0,1% de citrato

de sódio como fonte de carbono e atrazina (100 ppm) como única fonte de nitrogênio (Mandelbaum *et al.*, 1995). Como o meio contendo atrazina torna-se opaco como resultado de partículas finas, é possível visualizar zonas claras ao redor de colônias degradadoras. Outros substratos xenobióticos podem ser testados a despeito do objetivo de trabalho em estudo, no sentido de facilitar a etapa laboriosa de seleção de potenciais agentes degradadores.

Um método padrão que tem sido usado para isolamento de microrganismos degradadores ou resistentes é proceder à mistura do solo com igual quantidade de água e agitar por aproximadamente duas horas. Deixa-se as partículas de solo precipitarem-se por aproximadamente dois minutos. O sobrenadante é usado com inóculo para suplementação (enriquecimento) de culturas em frascos Erlenmeyer contendo o meio basal de crescimento que, geralmente, é um meio mineral e vitaminas, suplementado com baixa concentração de glucose ( $100 \text{ mg/L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $100 \text{ mg/L}^{-1}$ ), antibióticos para impedir o crescimento de muitas bactérias e o próprio composto xenobiótico que poderá ser ainda acrescentado gradualmente aos frascos.

Verificado seu crescimento microbiano no meio de cultura, pode-se transferir 2 ml da cultura em pleno crescimento para o mesmo meio, porém sem glucose. As culturas são incubadas e, em seguida, procede-se à quantificação da utilização do substrato. Caso se observe ao microscópio células de bactérias, leveduras e actinomicetos, sugere-se fazer estrias com auxílio de uma alça de platina em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado para esses microrganismos.

Dependendo do grau de toxicidade e recalcitrância do composto, torna-se difícil a obtenção de microrganismos efetivos na utilização da molécula como fonte de carbono ou nitrogênio. O isolamento em duas etapas pode ser efetuado usando-se análogos de composto mais fáceis de serem degradados. Assim, uma estratégia interessante para isolamento efetivo de linhagens de *Pseudomonas* tolerantes a tolueno foi adotada por Nakajima *et al.* (1992), utilizando-se um método de seleção que consiste em duas etapas. Na primeira etapa, uma pequena quantidade de solo e 2,5 ml de p-xileno foram adicionados a 5 ml do primeiro meio de seleção (0,5% de bacto triptona e 0,05% de extrato de levedura), que foi incubado aerobicamente à temperatura ambiente por 5 dias.

Microrganismos capazes de crescerem na presença de p-xileno foram obtidos em 85% das 760 amostras de solo. Exposição ao xileno parece melhorar a tolerância ao solvente orgânico para as linhagens potenciais.

Na segunda etapa, 50  $\mu\text{l}$  de cada uma das 10 culturas com bom crescimento foram adicionados a 5 ml do segundo meio de seleção (1,5% de extrato de solo de jardim fervido e filtrado foi adicionado ao primeiro

meio de seleção) contendo 2 ml de tolueno. Essas subculturas foram incubadas aerobicamente à temperatura ambiente por 4 dias. 50 ml de cultura foram então vertidos no segundo meio de seleção, contendo 1,5 g de ágar. O ágar, vertido sobre as culturas, apresentava uma fina camada de 2 mm de tolueno. Com esse procedimento, os autores isolaram 26 linhagens de microrganismos tolerantes a tolueno.

## BIODEGRADAÇÃO ACELERADA

A adaptação de microrganismos a muitos compostos orgânicos exerce um importante fator nas taxas de degradação. A adaptação se refere a mudanças na comunidade microbiana que, por sua vez, incrementa a taxa de transformação de um dado composto como resultado de uma exposição prévia a esse composto. Respostas adaptativas têm sido observadas em culturas puras, ambientes aquáticos, solos e aquíferos (Moorman, 1990). Quando os microrganismos são expostos a um determinado xenobiótico, há geralmente um período inicial de adaptação e nenhuma transformação ocorre.

Essa fase é crucial com relação à persistência do composto no ambiente, principalmente se a fase de adaptação for longa. Muitos xenobióticos onde uma fase de adaptação foi verificada, são citados por Alexander (1994) e entre eles estão: herbicidas (2,4-D, Mecoprop, 4-(2,4-DB), TCA, dalapon, monuron, chlorprophan, endothal, pirazon), inseticidas (paration metílico e azinfos metílico), compostos quaternários de amônia (cloreto de dodeciltrimetilamônio), hidrocarbonetos policíclico aromáticos (naftaleno e antraceno) e outros (fenol, 4-clorofenol, 4-nitrofenol, 1,2 e 1,4-diclorobenzeno).

Alguns compostos chegam a ter um período de adaptação extremamente curto (24 horas), como o cloreto de dodeciltrimetilamônio, outros têm um período mais longo, de seis meses, como por exemplo, os halo-benzoatos (Linkfield *et al.*, 1989). A fase de adaptação finaliza quando o início do período de biodegradação é detectado.

Estratégias genéticas e bioquímicas para adaptação e biodegradação acelerada incluem indução enzimática, mudanças de população, mutação, transferência e rearranjo de material genético. Estes mecanismos isolados ou em combinação contribuem para uma mudança nas taxas de biodegradação, observadas depois que as comunidades microbianas naturais são expostas a novos substratos. Spain & Vanveld (1983) citam que, quando compostos xenobióticos são adicionados a concentrações abaixo de 100 ppb (100 ng/ml), as taxas de degradação podem ser mil vezes superiores em populações que são pré-expostas ao composto. Um

longo período de adaptação poderia acomodar mudanças genéticas como um mecanismo de adaptação microbiana.

As informações genéticas podem ser transferidas entre populações através da transdução, transformação e conjugação, assistidas por plasmídeos. A principal forma pela qual as bactérias se adaptam aos poluentes no ambiente é através da aquisição de plasmídeos, que codificam genes envolvidos na resistência ou catabolismo.

Bactérias degradadoras de herbicidas do grupo dos carbamotioatos apresentam plasmídeos que contêm genes para degradação; linhagens sem plasmídeos não degradam esses herbicidas (Tam *et al.*, 1987; Mueller *et al.*, 1988).

Plasmídeos são moléculas de fitas circulares de DNA que se replicam como entidades independentes do cromossomo do hospedeiro. Em geral, o tamanho dos plasmídeos varia de 1 Kb a 500 Kb (pares de base). Plasmídeos menores são mantidos em cópias múltiplas, de até 40 por organismo. Genes codificando para o metabolismo de pesticidas e outros compostos xenobióticos são freqüentemente, mas nem sempre, localizados em plasmídeos.

Plasmídeos catabólicos são principalmente encontrados em *Pseudomonas* fluorescentes e uma característica comum desses plasmídeos é que eles são freqüentemente muito grandes. As funções especializadas desses megaplasmídeos, tais como resistência a metais pesados, são codificadas por somente pequenas porções do conteúdo total. Por exemplo, no plasmídeo pMOL30 de 240 Kb de *Alcaligenes eutrophus*, cerca de 40 Kb parecem estar envolvidos na resistência a metais pesados e 40 Kb em funções básicas como transferência, replicação e manutenção. A função da porção restante ainda não foi identificada.

Plasmídeos que codificam para degradação podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie e de diferentes espécies. Desse modo, estudos sobre a ocorrência e impacto das interações genéticas na comunidade microbiana são considerados de grande importância, no sentido de predizer o destino da disseminação no solo de novas combinações genéticas introduzidas.

Em geral, as falhas ou ineficiência advindas das aplicações de pesticidas para o controle fitossanitário têm sido atribuídas ao desenvolvimento de resistência dos organismos-alvo. Para muitos pesticidas, essas falhas são devidas à rápida degradação microbiana que se manifesta após aplicações continuadas do mesmo pesticida, cujo fenômeno é chamado de degradação acelerada, justamente porque tem-se verificado uma taxa mais rápida de degradação em campos agrícolas previamente tratados, do que em campos não tratados. Uma degradação acelerada por popula-



ções microbianas adaptadas tem resultado num reduzido controle de pragas (Roeth, 1986; Felsot, 1989). Esse fenômeno tem sido verificado para muitos pesticidas suscetíveis à degradação acelerada (Tabela 2). Falha no controle de insetos por carbofuran foi verificada quando o composto foi previamente aplicado, por 2 a 4 anos (Felsot *et al.*, 1981). O herbicida butilato é mineralizado mais rapidamente em solos que têm sido repetidamente tratados com este produto, do que em solos sem exposição prévia (Skipper *et al.*, 1986).

TABELA 2. Alguns pesticidas onde se tem verificado a ocorrência de biodegradação acelerada.

PESTICIDAS	REFERÊNCIAS
2,4-D	Audus (1949)
carbofuran	Felsot <i>et al.</i> (1981)
iprodone, vinclozolin	Walker (1987)
Procimidone	Slade <i>et al.</i> (1992)
diazinon	Forrest <i>et al.</i> (1981)
fensulfotion	Read (1983)
isfoenfós	Racke & Coats (1990)
butilato	Skipper <i>et al.</i> (1986)
EPTC	Tal <i>et al.</i> (1982)
atrazina	Assaf & Turco (1994)
trialato	Cotterill & Owen (1989)
carbendazim, benomil	Yarden <i>et al.</i> (1985)
aldicarb	Suett & Jukes (1993)
diphenamid	Avidov <i>et al.</i> (1990)
isotociamato de metila	Smelt <i>et al.</i> (1989)
fenamifós	Davis <i>et al.</i> (1993)
napropamide	Walker <i>et al.</i> (1996)

É possível também observar populações microbianas mostrando degradação acelerada com relação a um pesticida degradarem uma outra molécula estruturalmente similar. Esse fenômeno chama-se de adaptação cruzada. Obrigawitch *et al.* (1983) observaram que vernolato e butilato foram degradados mais rapidamente em solos com uma população microbiana adaptada ao EPTC, do que em um solo não exposto a este herbicida. Há casos, no entanto, em que a adaptação cruzada tem sido

verificada com moléculas que não são estruturalmente similares. Por exemplo, populações microbianas de solos adaptadas ao herbicida trialato degradaram o herbicida EPTC em taxas aumentadas, mas também degradaram o inseticida carbofuran em taxas superiores (Cotterill & Owen, 1989).

Aplicações repetidas de certos pesticidas podem também acelerar a degradação dos seus produtos formados. O fungicida carbendazim, um produto da hidrólise do benomil, foi degradado mais rapidamente em solos com histórico de aplicações de benomil do que em um solo não exposto ao produto (Yarden *et al.*, 1985). A meia vida do carbendazim foi reduzida de 11 para 4 dias em solos tratados com benomil. Do mesmo modo, carbendazim foi rapidamente degradado em solos previamente tratados com seu metabólito 2-aminobenzimidazole (Aharonson *et al.*, 1990).

## CONCLUSÕES

Solos, sedimentos e águas contaminadas com compostos xenobióticos são substratos adequados para isolamento de microrganismos já adaptados. Geralmente esses xenobióticos são moléculas sintéticas novas, o que fornece uma oportunidade para se estudar a evolução microbiana de novas vias de degradação.

O uso de microrganismos isolados tem a sua finalidade, em muitos casos, na biorremediação cujo objetivo é estimular o crescimento de microrganismos indígenas ou introduzidos em áreas contaminadas e, assim, fornecer um contato direto entre microrganismos e contaminantes. Para alguns contaminantes orgânicos que podem ser usados como substratos primários, a biodegradação acelerada é mais fácil de ser alcançada. Esta, por sua vez, está ligada a constantes aplicações do mesmo ou de compostos estruturalmente similares no ambiente.

Não tem sido fácil isolar microrganismos que metabolizam compostos xenobióticos que não são persistentes no ambiente, mesmo sabendo-se da existência de microrganismos biologicamente ativos naquela área em estudo. É de se esperar que sinergismo ou cometabolismo estejam envolvidos na degradação. As técnicas de enriquecimento do solo e isolamento usando tal molécula, neste caso, não são tão eficazes. Um método alternativo seria o enriquecimento com uma substância análoga, sem contudo apresentar os substituintes xenóforos que poderiam bloquear a biodegradação.

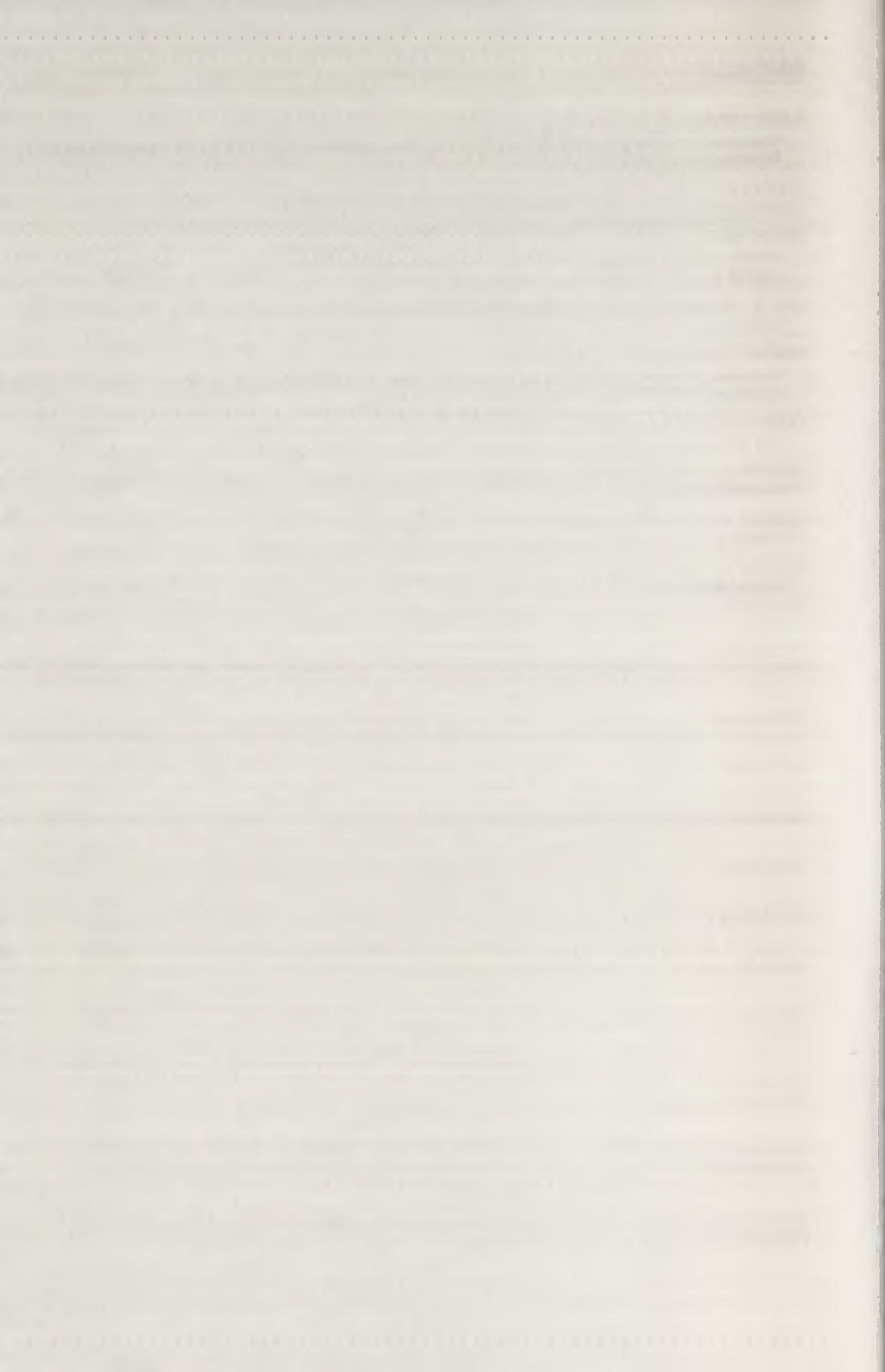
Ainda considerando-se a importância do cometabolismo e sinergismo na transformação de xenobióticos, os estudos de biodegradabilidade deveriam ser realizados com comunidades microbianas ou consórcio de microrganismos e não com linhagens individuais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOVE, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of the fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. eds. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.113-127 (ACS Symposium Series, 426).
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. New York: Academic Press, 1994. 302p.
- ASSAF, N.A.; TURCO, R.F. Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. **Biodegradation**, v.5, p.29-35, 1994.
- AUDUS, L.J. The biological detoxification of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid in soil. **Plant and Soil**, v.2, p.31-36, 1949.
- AVIDOV, E.; AHARONSON, N.; KATAN, J. Involvement of soil microorganisms in the accelerated degradation of diphenid. **Weed Science**, v.38, p.186-193, 1990.
- BARTHA, R. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: LABADA, D.P., ed. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**. McGraw Hill, 1990. p.283-307.
- BORDELEAU, M.; BARTHA, R. Rapid technique for enumeration and isolation of peroxidase - producing microorganisms. **Applied Microbiology**, v.18, p.274-275, 1969.
- BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science**, v.228, p.1434-1436, 1985.
- CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SATORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v.98, p.371, 1964.
- COTTERIL, E.G.; OWEN, P.G. Enhanced degradation in soil of etri-allate and other carbamate pesticides following application of tri-allate. **Weed Research**, v.29, p.65-68, 1989.
- DAVIS, F.L.; WILLIAMS, S.T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. In: The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. **Soil Biochemistry**, v.2, p.227-238, 1970.
- DAVIS, R.F.; JOHNSON, A.W.; WAUCHOPE, R.D. Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. **Journal of Nematology**, v.25, p. 679-685, 1993.
- FELSOT, A.E.; MADDOX, J.V.; BRUCE, W. Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of carbofuran use. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.26, p.781-788, 1981.
- FELSOT, A.S. Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.453-476, 1989.
- FORREST, M.; LORD, K.A.; WAKER, N.; WOODVILLE, H.C. The influence of soil treatments on the bacterial degradation of diazinon and other organophosphorus insecticides. **Environmental Pollut Ser. A**, v.24, p.93-104, 1981.
- FOURNIER, J.C.; CATROUX, C.; CHARNAY, M.P.; GUNALAN. Behavior of soil microflora in pesticide degradation. In: MANSOUR, M., ed. **Fate and prediction of environmental chemicals in soils, plants and aquatic systems**. s.l.:s.n., 1993. p.199-208.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect  $C_4$  cellulase activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v.98, p.109-115, 1977.
- HOPKINS, D.W.; MACNAUGHTON, S.J.; O'DONNELL, A.G. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.217-225, 1991.
- HSU, T.S.; BARTHA, R. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides diazinon, parathion in the rhizosphere of the bush bean plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.36-41, 1979.
- HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, v.29, p.422-426, 1975.

- JENSEN, V. The plate count technique. In: GREY, T.R.G.; PARKINSON, D., ed. **The ecology of soil bacteria**. Liverpool: Liverpool University Press, 1968. p.158-170.
- KANAZAWA, S.; TAKESHIMA, S.; OHTA, K. Effects of waring blender treatment on the counts of soil microorganisms. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.32, p.81-89, 1986.
- LINKFIELD, T.G.; SUFLITA, J.M.; TIFDJE, M. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of halobenzoates. **Applied and Environmental Microbiology** v.55, p.2773-2778, 1989.
- MacDONALD, R.M. Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms by elutriation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p.399-406, 1986.
- MANDELBAUM, R.T.; DEBORAH, L.A.; WACKETT, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-Triazine herbicide Atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1451-1457, 1995.
- MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S. Ocorrência de resistência a benomil em linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Orthezia praelonga*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz-do-Iguaçu. p.447.
- MOORMAN, T.B. Adaptation of microorganisms in subsurface environmental: significance to pesticide degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. ed **Enhanced biodegradation of pesticides in the environmental**. Washington: ACS, 1990. p.167-180 (ACS Symposium Series, 426).
- MUELLER, J.G.; SKIPPER, H.D.; KLINE, E.L. Loss of butylate utilizing ability by a *Flavobacterium*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.32, p.189-196, 1988.
- MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.341-356.
- NAKAJIMA, H.; KOBAYASHI, H.; AONO, R.; HORIKOSHI, K. Effective isolation and identification of toluene tolerant *Pseudomonas* strains. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v.56, n.11, p.1872-1873, 1992.
- OBRIGAWITCH, T.; MARTIN, A.R.; ROETH, F.W. The influence of temperature, moisture and prior EPTC application on the degradation of EPTC in soils. **Weed Science**, v.30, p.175-181, 1983.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry** London: Academic Press, 1989. 275p.
- RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced biodegradation of insecticides in the midwestern corn soil. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.68-81.
- READ, D.C. Enhanced microbial degradation of carbofuran and fensulphothion after repeated applications to acid mineral soil. **Agriculture Ecosystems Environmental**, v.10, p.37-46, 1983.
- REDDY, B.R.; SETHUNATHAN, N. Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.826-829, 1983.
- ROETH, F.W. Enhanced herbicide degradation in soil with repeat application. **Review of Weed Science**, v.2, p.45-65, 1986.
- SANDMANN, E.R.I.C.; LOOS, M.A. Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media; high populations associated with sugarcane. (*Saccharum officinarum*). **Chemosphere**, v.13, n.9, p.1073-1084, 1984.
- SKIPPER, H.D.; MURDOCK, E.C.; GOODEN, D.T.; ZUBLENA, J.P.; AMAKIRI, M.A. Enhanced herbicide biodegradation in south Carolina soils previously treated with butylate. **Weed Science**, v.34, p.558-563, 1986.
- SLADE, E.A.; FULLERTON, R.A.; STEWART, A.; YOUNG, G.H. Degradation of the dicarboximide fungicides iprodione, vinclozolin and procymidone in patimahoe clay loam soil New Zealand. **Pesticide Science**, v.35, p.427-438, 1992.
- SMELT, J.H.; CRUM, S.J.H.; TEUNISSEN, W. Accelerated transformation of the fumigant methyl isothiocyanate in soil after repeated application of metham-sodium. **Journal of Environmental Science and Health**, v.24, p.437-455, 1989.

- SPAIN, J.C.; VAN VELD, P.A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure. **Applied and Environmental Microology**, v.45, n.2, p.428-435, 1983.
- STRICKLAND, T.C.; SOLLINS, P.; SCHIMEL, D.S.; KEARLE, E.A. Aggregation and aggregate stability in front and range soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.52, p.829-833, 1988.
- SUETT, D.L.; JUKES, A.A. Stability of accelerated degradation of soil applied insecticides: laboratory behaviour of aldicarb and carbofuran in relation to their efficacy against cabbage root fly in previously treated field soils. **Crop protection**, v.12, p.431-442, 1993.
- TAL, A.; IRUBIN, B.; KATAN, J.; AHARONSON, N. Fate of <sup>14</sup>C-EPTC in a soil exhibiting accelerated degradation of carbamothioate herbicides and its control. **Weed Science**, v.37, p.434-439, 1989.
- TAM, A.C.; BEHKI, R.M.; KHAN, S.U. Isolation and characterization of an s-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate-degrading *Arthrobacter* strain and evidence for plasmid-associated s-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1088-1093, 1987.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEM-YEPHET, Y. Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**, v.75, p.763-767, 1985.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Plant-microbe treatment systems for toxic waste. **Current Opinon in Biotechnology**, v.3, p.267-270, 1992.
- WALKER, A.; WELCH, S.J.; ROBERTS, S.J. Induction and transfer of enhanced biodegradation of the herbicide napropamide in soils. **Pesticide Science**, v.47, p.131-135, 1996.
- WALKER, A. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. **Pesticide Science**, v.21, p.219-231, 1987.



---

# 8

## EFEITO DE PESTICIDAS SOBRE A MICROFLORA DA PARTE AÉREA DE PLANTAS

---

Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — EMBRAPA

Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho — CNPUV

Caixa Postal 130, CEP 95700-000

Bento Gonçalves, RS

---

### INTRODUÇÃO

A aplicação de pesticidas é um dos métodos mais utilizados no controle de pragas na agricultura moderna. Esses produtos, no entanto, podem interferir nos ecossistemas por ações diretas ou indiretas sobre a população residente nas plantas e pelo impacto físico, químico e/ou biológico no ambiente da área tratada (Dickinson & Wallen, 1976). Estudos do efeito desses produtos nos organismos não alvo vêm se intensificando nas últimas décadas. Maiores informações sobre este tipo de efeito já se encontram disponíveis para algumas culturas tais como maçeira, gramíneas e batatinha (Hislop & Cox, 1969).

A ênfase dada aos trabalhos de determinação do impacto do uso de pesticida no campo tem o objetivo de verificar as conseqüências das modificações na composição da microflora, na sobrevivência e desenvolvimento da população dos patógenos, na população natural dos antagonistas, na eficiência de outros pesticidas e ainda sobre o estabelecimento dos agentes de controle biológico (Warren, 1974; Bhatt & Vaughan, 1963; Cal & Melgarejo, 1992). Estas determinações, por outro lado, visam orientar sistemas de manejo integrado de pragas e doenças das culturas (Andrews & Kennerley, 1978; Jailloux & Froidefond, 1979).

Os principais componentes da flora epífita são bactérias saprofíticas ou patogênicas, que se encontram na fase residente (Leben, 1974). A população epífita bacteriana aumenta quando ocorrem longos períodos de molhamento da parte aérea e alta umidade relativa no ambiente das plantas (Leben, 1965; Leben, 1974; Leben & Daft, 1967; Fokkema, 1988). Esses

autores consideram que as bactérias são as primeiras colonizadoras dos tecidos vegetais e que os fungos filamentosos e leveduras aumentam à medida que as culturas se aproximam da maturação e senescência.

O estabelecimento dos microrganismos na parte aérea das plantas é afetado pela umidade, sensibilidade à luz ultravioleta, disponibilidade de nutrientes e presença de inibidores, tais como toxinas ou antibióticos, produzidos por alguns dos componentes da flora colonizada (Leben, 1965).

## EFEITOS INDIRETOS SOBRE A POPULAÇÃO DO PATÓGENO

Modificações na composição da microflora da parte aérea das plantas, ocorridas pelo efeito de fungicidas, podem interferir na velocidade de decomposição dos tecidos no solo. Na macieira, Andrews & Kennerley (1978 e 1979) mostraram que tratamentos feitos com fungicidas e inseticidas, no período prévio à colheita, adiaram a decomposição dos frutos. Esta situação permitiu o desenvolvimento de maior número de pseudotécios de *Venturia inaequalis* nas folhas e, portanto, previu-se que nesses pomares ocorreria aumento de inóculo inicial do patógeno para a próxima temporada de crescimento da cultura.

Por outro lado, Dickinson (1973b), observou que a maior longevidade das folhas de cevada, em consequência dos tratamentos com pesticidas, aumentaram a produtividade da cultura. Nesta situação, a manutenção da área foliar das plantas por um longo período forneceu nutrientes que propiciaram o aumento do tamanho das sementes.

Fungicidas do grupo dos inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE), herbicidas e reguladores de crescimento podem inibir a atividade metabólica de alguns microrganismos da microflora. Este efeito poderá, portanto, reduzir a produção de substâncias tóxicas, tais como antibióticos e toxinas e diminuir a capacidade de crescimento e esporulação dos epífitas afetados. A redução da capacidade de competição desses epífitas com os patógenos na superfície das plantas terá como resultado a promoção do aumento dos patógenos não afetados e conseqüentemente das doenças produzidas por eles (Fokkema, 1988).

Gross & Kenneth (1973) verificaram que em culturas nas quais foi feita aplicação ao solo de Carboxin, Benomil e Tiabendazole, constatava-se uma diminuição marcante da população das leveduras *Sporobolomyces roseus*, *Leucosporidium scottii* e *Aureobasidium pullulans* nas folhas, mesmo sem se detectar resíduo dos produtos na parte aérea das plantas tratadas. Os autores sugeriram que esses fungicidas podem ter efeito semelhante ao dos reguladores de crescimento e, por exercerem alterações metabólicas na cultura, modificam os exsudatos da parte aérea, fazendo



desta um substrato inadequado para o desenvolvimento desses organismos epífitas. Esses autores observaram, ainda, que efeito semelhante ocorria quando as plantas eram tratadas com o ácido abscísico.

A supressão de leveduras e bactérias na parte aérea das plantas deixará disponíveis nutrientes que poderão promover o aumento das doenças causadas por patógenos (Jenkyn & Prew, 1973). A relação entre a maior disponibilidade de nutrientes e a diminuição da população de leveduras, pelo impacto de alguns fungicidas, foi demonstrada quando observou-se que o efeito causado pelo Captafol sobre a flora epífita podia ser revertido pela aplicação conjunta desse produto com nutrientes. Por outro lado, a população de leveduras ou de outros organismos sensíveis pode sofrer redução inicial e, após aplicações sucessivas de produtos de ação específica, aumentar novamente. Isto ocorrerá pela seleção de estirpes resistentes desses organismos aos pesticidas utilizados nesse local. Como exemplo, podemos citar a ocorrência de leveduras resistentes ao Carbendazim (Dickinson, 1973a).

A manutenção da flora que consome os nutrientes da superfície das plantas, além de acarretar a diminuição das doenças causadas por patógenos necrotróficos, pode ter outros efeitos, tais como a inativação dos fungicidas e a diminuição da inibição da fotossíntese na planta, fato que pode ocorrer pelo acúmulo de exsudatos na superfície das plantas (Dickinson, 1973a).

## ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DA FLORA EPÍFITA

A superfície das plantas é um substrato efêmero e, no geral, disponível para colonização por microrganismos, às vezes por curto período (Hislop & Cox, 1969; Pennycook & Newhook, 1981). A população de microrganismos em folhas, frutos e ramos tem variações quantitativas e qualitativas de acordo com a fase do ciclo vegetativo. Essas variações são resultado do efeito diferencial da interação do ambiente físico, químico e biológico sobre cada organismo componente do meio. O efeito do estímulo de uma ou mais espécies em um local poderá inibir ou aumentar outros componentes desse ambiente e, quando os fatores deste ambiente favorecerem o aumento populacional dos patógenos, poderá ocorrer maior severidade ou incidência das doenças. Levantamentos periódicos, feitos em folhas de macieiras não tratadas com pesticidas, mostraram a presença de um grande número de espécies de fungos que podiam variar em frequência, dependendo da época da amostragem. No entanto, nesse grupo estudado, várias espécies mantinham-se sempre presentes e incluíam-se fungos com potencial antagônico, tais como

*Trichoderma* spp., *Acremonium strictum*, *Aureobasidium pullullans* e *Sordaria fimicola* (Falconi & Mendgen, 1994). Por outro lado, nas folhas de macieira tratadas com pesticidas também constatava-se diminuição de alguns desses fungos com potencial antagônico, entre os quais incluíam-se *Chaetomium globosum*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma* sp. (Falconi & Mendgen, 1994).

A época de amostragem e, portanto, o estágio fisiológico das estruturas vegetais estudadas pode influir na composição da flora epífita. Em morangueiros foi mostrado que tanto fungos patogênicos como saprotróficos variam sua população nas folhas dessa cultura durante o ciclo vegetativo, apresentando aumento quantitativo na época próxima à senescência. No entanto, nessa cultura algumas espécies de *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. e *Epicoccum* spp. são constatadas durante todo o ciclo vegetativo (Mc Lean & Sutton, 1992).

O monitoramento da ocorrência dos patógenos e dos componentes da flora epífita nas culturas durante todo seu período de desenvolvimento poderá auxiliar na seleção de organismos com potencial antagônico aos patógenos e com adaptação aos sítios de infecção durante os estádios mais suscetíveis da cultura (Falconi & Mendgen, 1994).

Plantas tratadas com pesticidas podem mudar a composição da sua população epífita de leveduras nos frutos. Assim, em macieiras com tratamento químico, a população de leveduras nas maçãs constituía-se principalmente de *Candida malicola*, *Torulopsis* spp., *Rhodotorula* spp. e *Cryptococcus* spp., enquanto que nas plantas sem pesticidas constatavam-se, além de *C. malicola* e espécies de *Cryptococcus* spp., outras espécies de *Candida* sp. diferentes das encontradas nas plantas tratadas e os gêneros *Torulopsis* e *Rhodotorula* estavam ausentes (Andrews & Kennerley, 1978). Nesses estudos ficou demonstrado que as condições regionais podem ter maior efeito do que a cultivar sobre a heterogeneidade da flora de leveduras e poucas espécies estão associadas a cultivares (Bowen & Beach, 1964; Andrews & Kennerley, 1978). Esses resultados mostram a conseqüência da interação do ambiente físico, químico e do manejo da cultura sobre os componentes dos exsudatos das maçãs e o impacto dessa variação sobre a seleção das espécies epífitas.

As modificações na ocorrência e freqüência de espécies epífitas nas folhas das macieiras submetidas aos tratamentos com fungicidas poderão acarretar atraso na decomposição dos tecidos das folhas em plantas caducifólias. Assim, folhas senescentes de macieiras tratadas durante o ciclo com fungicidas, inseticidas e bactericidas, que demoraram a se decompor, apresentaram redução da população de *Pseudomonas* fluorescentes bem como de *Coniothyrium* sp., *Penicillium* sp., *Artrobotrys*

sp., *Nodulisporum* sp. e aumento de *Typhula* spp., *Pseudophomella* sp., *Sporobolomyces* spp. e *Rhodotorula* spp. (Andrews & Kennerley, 1979).

Evidentemente, a frequência e o tipo de pesticida utilizado podem agir de forma diferente na flora epífita das culturas e o efeito poderá ser variável dependendo das estruturas da planta em estudo. No entanto, mesmo quando utilizados programas diferentes de tratamento químico das macieiras, pode ser detectado nas folhas o aumento de grupos de leveduras que incluem principalmente *Rhodotorula* spp. e *Sporobolomyces* spp. (Hislop & Cox, 1969; Andrews & Kennerley, 1978). Diferenças nos efeitos dos programas de proteção química sobre epífitas nas fruteiras podem ser observadas quando comparados pessegueiros e macieiras. Nesse caso, verifica-se que na primeira cultura o tratamento químico exerceu estímulo (Cal & Melgarejo, 1992) e na segunda, inibição da população de *Penicillium* spp. (Andrews & Kennerley, 1978)

No acompanhamento das variações da população epífita de bactérias residentes foi verificado que, durante o ciclo vegetativo, maiores mudanças são observadas quando ocorrem períodos de maior frequência de chuvas, fato que estimula o aumento quantitativo de colonizadores. Assim, o máximo de colonização bacteriana durante o ciclo vegetativo de uma cultura ocorrerá geralmente durante a primavera e o outono (Andrews & Kennerley, 1979; Falconi & Mendgen, 1994).

## EFEITO DIRETO DOS FUNGICIDAS SOBRE A MICROFLORA EPÍFITA BENÉFICA

Entre os principais colonizadores da parte aérea das plantas encontram-se vários grupos de organismos, sobressaindo bactérias do gênero *Pseudomonas*, leveduras do gênero *Sporobolomyces* e fungos filamentosos do gênero *Cladosporium*.

No conjunto de organismos que compõem a população epífita das plantas, além dos patógenos, podem ser encontrados seus competidores naturais, e a inibição ou supressão desses organismos terá como consequência o favorecimento dos patógenos.

Estudos de seleção de antagonistas a patógenos a partir de organismos da parte aérea incluem com maior frequência espécies de fungos filamentosos e leveduriformes, citando-se *Epicoccum purpurascens*, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., e *Aureobasidium pullulans* (Cal & Melgarejo, 1992). A população desses organismos pode ser diminuída pela utilização dos fungicidas do grupo dos benzimidazóis e ditiocarbamatos, pelos produtos captafol, clorotalonil, dichlone e dinocap e pe-

las misturas de captan e benomil, captan e dinocap e de methomil e dinocap. Os fungicidas ethirimol ou triadimefon não apresentam efeito inibidor (Tabela 1).

TABELA 1. Efeito dos pesticidas sobre fungos epífitas em culturas agrícolas.

ORGANISMO	PESTICIDA	INIBIÇÃO
Fungos filamentosos	Captan	+
	Captafol	+
	Mancozeb	+
	Dichlone	+
	Metiram	+
	Clorothalonil	+
	Zineb	+
	Benomil+Methonil+Dinocap	+
	Captan + Dinocap	
	Methonil+Captan+Benomil	+
	Benomil	+
	Triadimefon	-
	Oxicloreto Cobre	-
Thiram		
<i>Cladosporium</i>	Maneb	+
	Captafol	+
	BAS3170	+
	NF48	+
	Benomil	+
	Tiofanato metílico	+
	Tridemorph	+
	Ethirimol	

A diminuição de um componente da população de fungos, pelo efeito de fungicidas, pode ocorrer paralelamente ao aumento de populações de outro grupo de epífitas de interesse no controle biológico dos patógenos. Assim, estudos feitos em ramos de pessegueiros mostraram que o efeito inibitório em *Cladosporium* spp. pelos pesticidas utilizados

ocorreu conjuntamente com o aumento de *Penicillium* spp., organismos eficientes no biocontrole de *Monilinia laxa*.

Nas avaliações do efeito dos fungicidas sobre leveduras (Tabela 2) com exceção do propiconazole, os inibidores da síntese do ergosterol avaliados não têm mostrado efeitos marcantes sobre a população desses organismos, sendo os benzimidazóis e os ditiocarbamatos os grupos com maior efeito inibidor (Fokkema, 1993). Resíduos desses produtos, bem como a redução das populações de organismos epífitas benéficos, poderão afetar a dominância e o estabelecimento dos antagonistas aos patógenos que protegerão os frutos em pós-colheita. O uso de leveduras tem sido desenvolvido para se obter o biocontrole de patógenos que afetam frutos e a otimização desse método de controle poderá ser condicionada à ausência desse tipo de inibição.

TABELA 2. Efeito de fungicidas sobre leveduras e bactérias epífitas.

ORGANISMOS			
FUNGICIDAS	LEVEDURAS	SPOROBOLOMYCES	BACTÉRIAS
Captan	+	+	
Captafol	+	+	-
Metiram	+	-	
Maneb	+	-	±
Zineb	+	-	
Tiabendazol	+	-	
Tiofanato metílico	+	+	
Benomil	+	+	-
Propiconazol	+	+	±
Triadimenol	-	-	
Procloraz	±	-	
Fenpropimorf	-	-	±
Triadimefon	-	-	-
Imazalil	±	-	
Triforine	-	±	
Metalaxil		±	
NF48	+	+	
Tridemorf	+	±	
Clorotalonil	-	-	±

Desta forma, quando considerado o manejo integrado de doenças, será de interesse selecionar aqueles pesticidas que apresentem menor impacto na população não alvo, bem como conhecer a dinâmica populacional do patógeno e da flora associada durante o período suscetível da cultura. A preservação ou estímulo dos competidores, na época em que precisa ser limitado o aumento populacional do patógeno, será uma estratégia eficiente para diminuir perdas por doenças (Naumann & Gierz, 1992).

## MÉTODOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROFLORA DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS

Na avaliação da composição da microflora, os métodos usados incluem principalmente análise *in situ* com auxílio de microscopia ótica ou de varredura e a obtenção de epífitas que colonizam a superfície das plantas por agitação das amostras em água, ou pela homogeneização dos tecidos.

Nos levantamentos da microflora das folhas, a detecção das estruturas liberadas pelos colonizadores tem sido obtida pela coleta das estruturas depositadas por gravidade, tais como conídios livres ou pela ejeção de ascósporos diretamente sobre o meio de cultura. Para este tipo de avaliação, fixam-se as folhas na tampa da placa-de-petri, colocada sobre o meio de cultura (Hislop e Cox, 1969). Outras alternativas de métodos não destrutivos incluem a "impressão" das folhas sobre o meio de cultura, a manutenção das amostras em câmara úmida e observação direta e a indução das frutificações de colonizadores internos dos tecidos pelo uso do herbicida paraquat, após a desinfecção superficial e antes da incubação dos tecidos. Os organismos desenvolvidos podem ser observados por microscopia e/ou identificados após isolamento em meio de cultura (Peng & Sutton, 1993).

A lavagem dos tecidos das plantas por agitação e a distribuição da suspensão obtida no meio de cultura é um dos métodos mais utilizados, apesar das restrições quanto às inferências a serem feitas nos resultados. A simplicidade e rapidez são as maiores virtudes dessa técnica (Bainbridge & Dickinson, 1972).

Os meios utilizados podem ter efeito diferencial na população obtida nos levantamentos. No geral, neste método é privilegiada a constatação de fungos que possuem uma característica de produção maior de propágulos, constituído por micélio nessas condições. A lavagem exaustiva das amostras e a utilização para estudo da última suspensão obtida ou dos pró-

prios tecidos para transferência a meios de cultura permitirá o isolamento dos patógenos e seus competidores e, especialmente, dos microrganismos que possuem uma fase de colonização latente nas plantas. (Mc Lean & Sutton, 1992).

No método de lavagem, variações podem ser feitas: utilizar diferentes diluições; empregar ou não espalhante e/ou solução tampão na suspensão; incorporar a amostra no meio fundente ou distribuí-la sobre o meio de cultura; utilizar diferentes métodos de agitação; diversificar os meios de cultura; estabelecer diferentes temperaturas ou níveis de pH para o desenvolvimento das culturas. A combinação desses fatores influenciará qualitativa e quantitativamente na avaliação da população epífita (Buhagiar & Barnett, 1971).

Para observações de propágulos *in situ* é recomendado o clareamento dos tecidos e a coloração diferencial dos organismos em estudo, previamente à observação microscópica.

As condições de armazenamento das amostras podem afetar quantitativamente as estimativas da população epífita. No entanto, temperatura entre 5 e 25°C não afetam os resultados qualitativamente (Bugahiar & Barnett, 1971).

O método de homogeneização das amostras em solução tampão terá a vantagem de incluir não somente os colonizadores superficiais mas também os endófitos.

A quantificação da população epífita tem sido relacionada ao peso ou superfície dos segmentos dos órgãos vegetais, expressando-se em número de colonizadores por grama de tecido ou cm<sup>2</sup> da amostra (Bowen & Beach, 1964; Pandey, 1988).

Na avaliação do efeito dos pesticidas sobre a microflora da parte aérea das plantas, além da obtenção das amostras com ou sem tratamentos de fungicidas, outras opções podem ser utilizadas para determinar o efeito direto dos pesticidas na flora epífita. Nestas opções encontram-se a aspersão de uma população conhecida, de um microrganismo, em plantas com e sem tratamentos e a determinação da sua sobrevivência ou a determinação da sensibilidade do epífita aos pesticidas em meio de cultura no qual incorpora-se cada produto (Cal & Melgarejo, 1992).

No geral, as técnicas usadas para este objetivo somente podem determinar parcialmente as modificações causadas no ambiente pelos pesticidas, principalmente, pela impossibilidade de refletir as relações tróficas entre espécies (Elmholt *et al.*, 1993).

Neste sentido, será importante verificar a causa da diminuição de grupos epífitas de interesse. A sobrevivência de espécies poderá depender da ocorrência da transformação do pesticida em produtos não tóxicos,

da seleção de população resistente ou da maior capacidade competitiva dos grupos epífitas na planta (Elmholt *et al.*, 1993).

Bactérias epífitas do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* podem controlar patógenos biotróficos e necrotróficos, provavelmente pela produção de antibióticos e pela indução de resistência na planta. Este último mecanismo somente poderá ser constatado *in vivo*, sob condições de campo (Elmholt *et al.*, 1993).

---

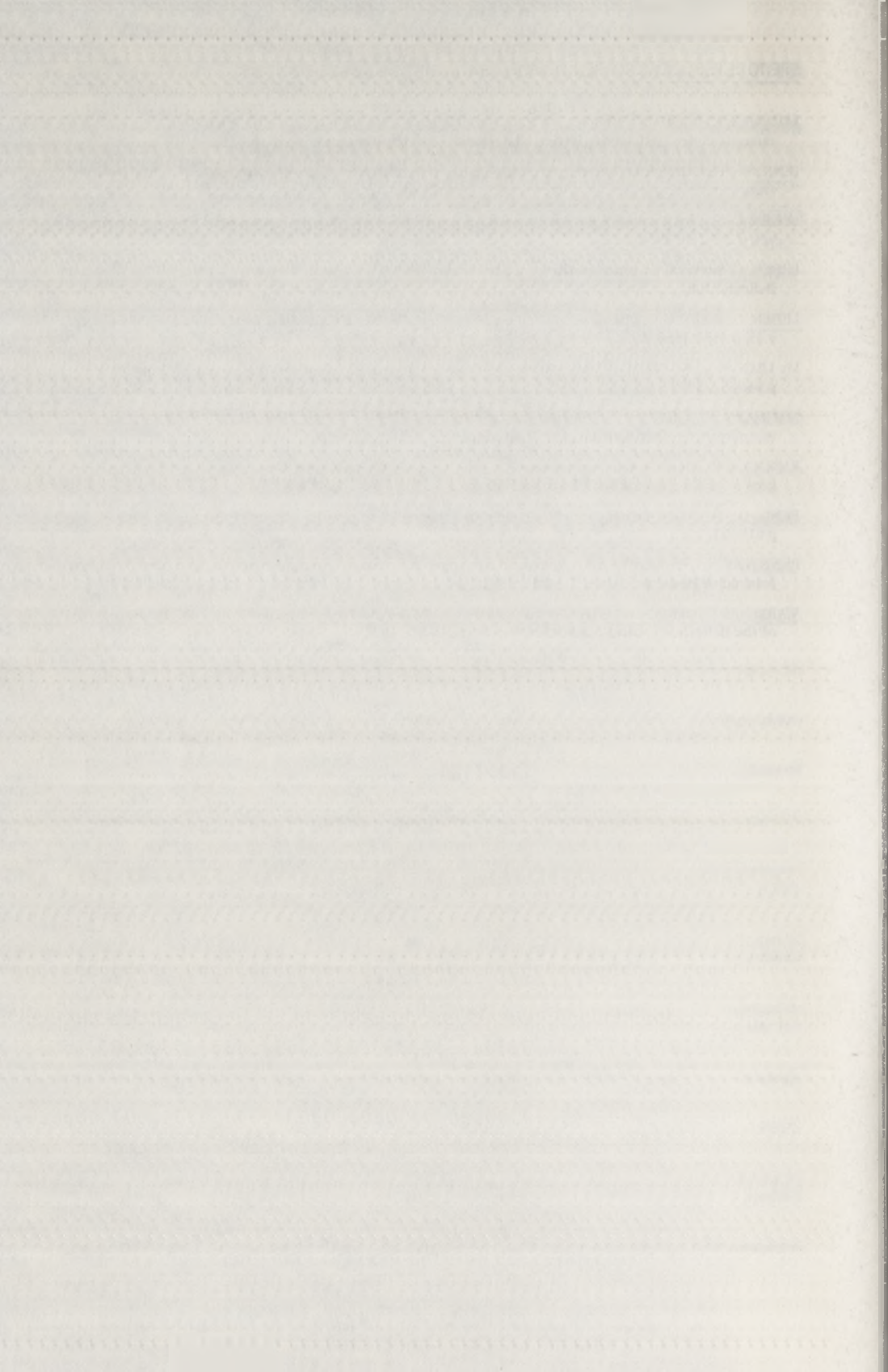
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.H.; KENNERLEY, C.M. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.1058-1072, 1978.
- ANDREWS, J.H.; KENNERLEY, C.M. The effects of a pesticide program on microbial populations from apple leaf litter. **Canadian Journal of Microbiology**, v.25, p.1331-1344, 1979.
- BHATT, D.D.; VAUGHAM, E.K. Interrelationships among fungi associated with strawberries in Oregon. **Phytopathology**, v.53, p.217-220, 1963.
- BRAINBRIDGE, A.; DICKINSON, C.H. Effect of fungicides on the microflora of potato leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.59, n.1, p.31-41, 1972.
- BOWEN, J.F.; BEACH, F.W. The distribution of yeasts on cider apples. **Journal of Applied Bacteriology**, v.27, n.2, p.332-34, 1964.
- BUHAGIAR, R.W.M.; BARNETT, J.A. The yeasts of strawberries. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, n.4, p.727-739, 1971.
- CAL, A. de; MELGAREJO, P. Interactions of pesticides and microflora of peach twigs. **Mycological Research**, v.96, n.12, p.1105-1113, 1992.
- DICKINSON, C.H. Effects of ethirimol and zineb on phylloplane microflora of barley. **Transactions of the British Mycological Society**, v.60, n.3, p.423-431, 1973a.
- DICKINSON, C.H. Interaction of fungicides and leaf saphophytes. **Pesticide Science**, v.4, p.563-574, 1973b.
- DICKINSON, C.H.; WALLAEN, B. Effects of late application of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.76, p.103-112, 1976.
- ELMHOLT, S.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. The influence of fungicides on soil microflora with special attention to tests of fungicide effects on soil - borne pathogens IN: ALTMAN, J., ed **Pesticide interations in crop production beneficial and deleterious effects**. Boca Raton: CRC, 1993. p.229.
- FALCONI, C.J.; MENDGEN, K. Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.101, n.1, p.38-47, 1994.
- FOKKEMA, N.J. Agrochemicals and the beneficial role of phyllosphere yeasts in disease control. **Ecological Bulletins**, v.39, p.91-93, 1988.
- FOKKEMA, J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, v.37, p.411-416, 1993.
- GROSS, Y.; KENNETH, R. The fate of carboxin, benomyl and thiabendazole in seed-and-soil-treated plants, as shown by "in vitro" and "in vivo" bioassays on some epiphytic yeasts. **Annals of Applied Biology**, v.73, p.307-318, 1973.
- HISLOP, E.C.; COX, T.W. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.52, n.2, p.223-235, 1969.



- JAILLOUX, F.; FROIDEFOND, G. Action differencielle de cinq fungicides sur la microflore fungique des rameaux et des feuilles de pêcher. **Phytiatrie - Phytopharmacie**, v.28, p.225-226, 1979.
- JENKYN, J.F.; PREW, R.D. The effects of fungicides on incidence of *Sporobolomyces* spp. and *Cladosporium* spp. on flag leaves of winter wheat. **Annals of Applied Biology**, v.75, p.253-256, 1973.
- LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.3, p.209-230, 1965.
- LEBEN, C. **Survival of plant pathogenic bacteria** Ohio: Ohio Agric. Res. Dev. Center, 1974. (Special Bulletin, 100).
- LEBEN, C.; DAFT, G.C. Population variation of epiphytic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, p.1151-1156, 1967.
- Mc LEAN, M.A.; SUTTON, J.C. Microflora of strawberry in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.846-852, 1992.
- NAUMANN, K.; GIERZ, R. Studies on the colonization of apple leaves, flowers and twigs by epiphytic microorganisms. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v.147, p.355-367, 1992.
- PANDEY, R.R. Effects of foliar applications of fungicides on the phylloplane microflora and fungal pathogens of guava. **Journal of Phytopathology**, v.123, p.52-62, 1988.
- PENG, G.; SUTTON, J.C. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, v.83, p.615-621, 1993.
- PENNYCOOK, S.R.; NEWHOOK, F.J. Seasonal changes in the apple phylloplane microflora. **New Zealand Journal of Botany**, v.19, p.273-283, 1981.
- WARREN, R.C. Differential effects of fungicides on phylloplane fungi isolated from oak. **Transactions of the British Mycological Society**, v.62, p.215-218, 1974.





---

# 9

## BIODEGRADAÇÃO DE PCBs

---

**Jorge Mazza Rodrigues**

Center for Microbial Ecology, Michigan State University  
545 Plant and Soil Science Building  
East Lansing Michigan 48824-1326

**Vivian H. Pellizar**

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo, Cidade Universitária,  
Caixa Postal 66208, CEP 05508-000, São Paulo, SP

---

### INTRODUÇÃO

Produtos como bifenilos policlorados (PCBs) têm ultimamente chamado a atenção de pesquisadores em diversas partes do mundo, devido à sua persistência, bioacumulação e possíveis efeitos nocivos sobre a saúde humana. Os PCBs têm sido usados em uma ampla gama de aplicações por mais de 50 anos, incluindo: transformadores a óleo, fluidos de capacitores dielétricos, fluidos de transferência de calor, retardadores de fogo e pesticidas.

Devido às suas propriedades químicas e térmicas, que vão da resistência à corrosão deve ser quimicamente inerte e estável, esses compostos possuem uma persistência generalizada na natureza, perto dos locais de produção, uso e armazenamento. A natureza hidrofóbica indica acumulação primária em solos e sedimentos aquáticos, onde são adsorvidos na matéria orgânica ou sofrem volatilização. Os PCBs têm sido considerados, por muito tempo, compostos xenobióticos (produzidos pelo homem) recalcitrantes (não biodegradáveis), estando entre os 10 produtos com maior potencial de toxicidade no mundo. Mais recentemente, vários estudos têm demonstrado que muitos microrganismos possuem capacidade de degradá-los.

O problema causado pela poluição dos PCBs é mundial. Portanto, é de grande importância elucidar o processo de sua biodegradação, assim como conhecer os microrganismos nele envolvidos, visando inclusive a obtenção de cepas e técnicas adequadas para aplicação em processos de biorremediação para eliminação de resíduos de PCBs em amostras ambientais contaminadas.

## DEFINIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES

Bifenilos policlorados são uma família de compostos produzidos a partir de cloração direta de moléculas bifenil, usando cloreto férrico e/ou iodetos como catalisador (Hutzinger *et al.*, 1974). A molécula de bifenilo é composta de dois anéis de seis carbonos ligados, podendo apresentar múltiplos átomos de cloro ligados ao núcleo fenílico (Fig. 1). Os átomos de cloro podem estar ligados em quaisquer dos 10 sítios de ligação possíveis, resultando em cerca de 209 diferentes compostos teoricamente possíveis, pela variação de número e posição dos cloros ligados.

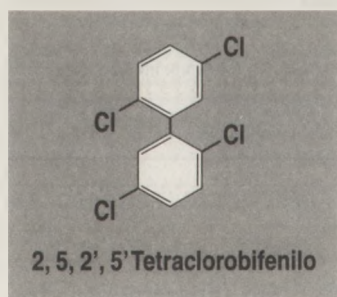


FIGURA 1. Exemplo estrutural de uma molécula de PCB.

Dentre as mais importantes propriedades físicas dos PCBs, podemos citar que são líquidos com baixa pressão de vapor e baixa solubilidade em água. Têm excelentes propriedades dielétricas. Dentre as propriedades químicas incluem-se a estabilidade à oxidação, resistência à chama e relativa inércia. Por essas propriedades, os PCBs foram aplicados em grande escala na indústria, como fluidos de transferência de calor, fluidos hidráulicos, plastificantes, retardantes de chama e diluentes orgânicos (Sawhney, 1987). Foram também utilizados como óleo de imersão na microscopia óptica comum.

Embora sintetizados em 1881, os PCBs só tiveram aplicação direta após os anos 30 e foram vendidos com uma variedade de nomes em diversos países: Pyraleneã (Prodelec, França); Phenoclorã (Caffaro, Itália); Kanechlorã (Kanegafuchi, Japão); Clophenã (Bayer, Alemanha) e Sovol (Rússia). No Brasil, assim como nos Estados Unidos, os PCBs foram comercializados com o nome de Arochlorã (Monsanto). Cada produto apresenta um sistema de numeração composto de 4 dígitos, sendo que os dois primeiros representam o esqueleto carbônico composto de 12 átomos e os dois últimos significam o conteúdo de cloro em porcentagem do peso, por exemplo: Aroclor 1242 possui 42% de cloro no peso total. De acordo com a quantidade de cloro, as propriedades físicas do composto podem variar e, portanto, podem ser utilizados para diferen-

tes propósitos: Aroclor 1242 e 1248 são mais fluidos; enquanto Aroclor 1260 apresenta maior viscosidade.

Em agricultura, sua estrutura bifenílica tem sido amplamente utilizada como base de criação para novas moléculas de inseticidas, tendo-se constituído como uma das principais fontes de contaminação de solos e rios.

## CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E RISCOS À SAÚDE

Foi estimado que, devido à intensiva aplicação desses compostos, cerca de cinquenta mil toneladas já tenham sido liberadas no ambiente (Buckley, 1982; Tanabe *et al.*, 1983). Havia pouca preocupação com o destino final de PCBs no ambiente até 1966, quando foram encontrados picos cromatográficos inexplicáveis em amostras de solo e água analisadas para acumulação de DDT.

A natureza lipofílica de PCBs contribui para sua tendência de acúmulo em depósitos de gordura, ampliando ainda mais a cadeia alimentar. A deposição inadequada desses resíduos perigosos em lagoas ou aterros resultou na contaminação do solo, água e ar em muitas regiões (Fig. 2). Voláteis, os PCBs podem ser facilmente emitidos para a atmosfera e integrarem o processo cíclico de contaminação do ambiente. O transporte atmosférico é a principal via de disseminação do ambiente aquático (Lau-

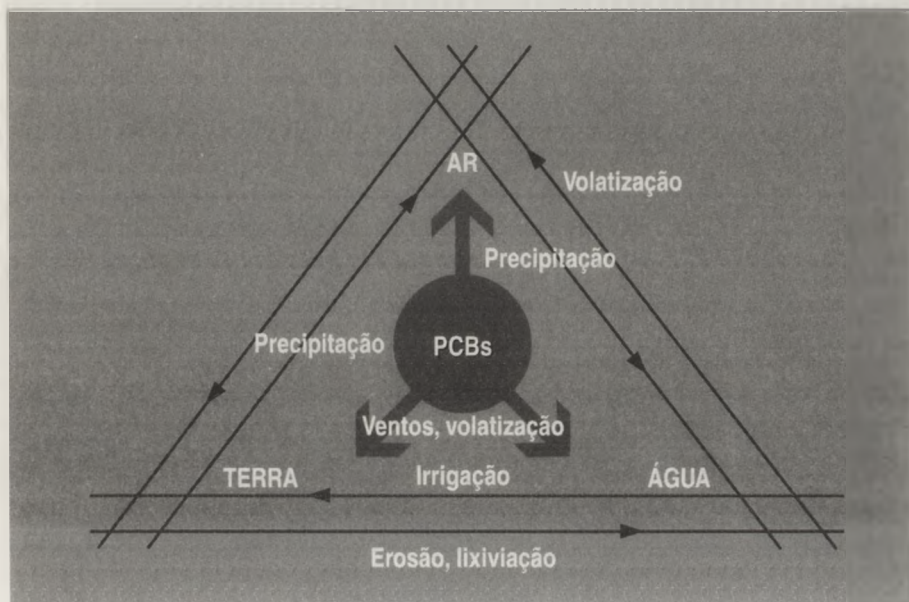


FIGURA 2. Ciclo ambiental dos PCBs (Baseado na figura de Jack D. Lauber no capítulo 5 do livro *PCBs and the Environment*, Vol. III, Ed. John Waid, 1987, CRC Press).

ber, 1987) e até regiões remotas, como a Antártida, apresentaram índices de contaminação por PCBs na atmosfera, hidrosfera e comunidade biótica, como peixes e pingüins (Lara *et al.*, 1990).

Estudos epidemiológicos clássicos de contaminação humana por PCBs são conhecidos, como os relativos ao acidente em Taiwan, em 1979, quando a ingestão de óleo de arroz contaminado afetou mais de duas mil pessoas. A exposição ocupacional tem sido a principal preocupação (Kimbrough, 1974) e, embora tenham sido observados somente efeitos agudos em humanos (dor de cabeça, tremores), recentemente foi comprovado pela EPA o poder mutagênico para animais de sangue quente (Phibbs, 1996).

No Brasil esses poluentes, provenientes em sua maioria dos sistemas mais antigos de geração de eletricidade, eram simplesmente lançados nos esgotos ou queimados. Em estudo realizado em São Paulo (Nogueira *et al.*, 1987), foi relatado que os índices de acúmulo de PCBs na gordura humana na grande São Paulo, são duas vezes maiores que em outros países industrializados.

## ELIMINAÇÃO DOS PCBs DO MEIO AMBIENTE

Os PCBs podem ser degradados pelos processos de combustão, fotólise e degradação microbiana. Embora a fotólise tenha se mostrado ser um processo importante de detoxificação de algumas de suas formas, a maior parte dos PCBs liberados se acumula nos sedimentos aquáticos e, por essa razão, está protegida da luz. A degradação por processo fotolítico requer ainda fótons com menor comprimento de onda, da ordem de 280 nm e, portanto, mais energéticos do que os que normalmente chegam à atmosfera terrestre. Além disso, o processo fotolítico permite a formação de outro composto tóxico: os dibenzofuranos policlorados (PCDFs). O potencial para a formação de dibenzofuranos e dioxinas também ocorre no processo de incineração. A combustão incompleta dos PCBs pode levar à formação dos PCDFs no incinerador. Por isso, a incineração deve ser realizada a temperaturas muito elevadas (1.200°C), o que torna o processo economicamente inviável (Hooper *et al.*, 1990).

Esses fatores nos permitem concluir que a degradação microbiana dos PCBs pode ser a forma mais promissora de desintoxicação. Sua degradação pode ser catalisada por culturas puras ou consórcios microbianos e, embora o desaparecimento de PCBs tenha sido notado em muitos casos, o processo é predominantemente cometabólico, com a acumulação de produtos resultantes desse cometabolismo, na sua maioria clorobenzoatos. A degradação de clorobenzoatos se dá por 3 principais vias, as quais convergem em algum ponto do ciclo do ácido tricloracético (Brenner *et al.*, 1994).

## BIODEGRADAÇÃO AERÓBICA DE PCBs

A degradação de PCBs por microrganismos aeróbicos é considerada uma das mais importantes vias. O monitoramento ambiental tem demonstrado que os PCBs encontrados em amostras ambientais são bifenilos contendo cinco ou mais íons de cloro por molécula de bifenilo. Esta é considerada uma evidência de que bifenilos menos clorados são rapidamente degradados no ambiente (Furukawa *et al.*, 1978).

Após o primeiro relato, em 1973, do isolamento de bactérias capazes de utilizar bifenilo e 4-clorobifenilo como fonte de carbono, muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade de degradação de PCBs a partir de culturas de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* 142, *Arthrobacter globiformis* KZT, *Comamonas* sp.; e também de alguns fungos como *Phanerochate chysosporium* (Yadav *et al.*, 1995; Bedard *et al.*, 1987b; Furukawa *et al.*, 1978; Ahmed & Focht, 1973).

Em geral, a via de degradação dos PCBs (Fig. 3) é similar à de outros substratos aromáticos, como tolueno e naftaleno, e começa com a adição inicial de O<sub>2</sub> na posição 2,3- pela enzima dioxigenase, com subsequente desidrogenação até catecol (Arensdorf & Focht, 1994), seguido por clivagem do anel (Finette *et al.*, 1984) e tendo como produto final o ácido clorobenzoico.

Fundamentalmente, existe um problema condicional na degradação de PCBs. O ataque inicial de PCBs usualmente ocorre via enzima dioxigenase, resultando em um intermediário *cis*-diol, seguido de *meta*-clivagem de um dos anéis aromáticos. Entretanto, os principais produtos do cometabolismo de PCBs, que são clorobenzoatos, geralmente são metabolizados por uma clivagem de tipo *orto*- (Brenner *et al.*, 1994).

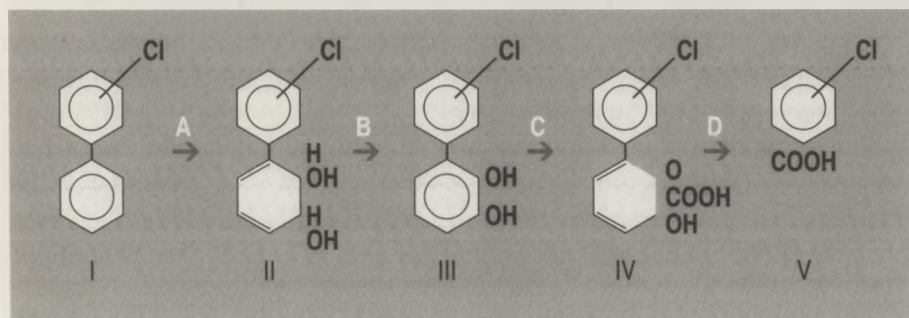


FIGURA 3. Via de degradação dos PCBs. Compostos: I, PCB; II, 2,3-di-hidroxi-4-fenilhexa-4, 6-dieno (di-hidrodiol); III, 2,3-di-hidroxi-4,4'-bifenileno; IV, ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2, 4-dienóico; V, ácido clorobenzoico. Enzimas: A, bifenilo dioxigenase; B, di-hidrodiol desidrogenase; C, 2,3-di-hidroxi-4,4'-bifenileno dioxigenase; D, composto de *meta*-clivagem hidrolase.

Produtos dessas diferentes clivagens inibem uns aos outros e, em alguns casos, podem ser extremamente tóxicos. Dessa maneira, microrganismos que cometabolizam PCBs estariam não só acumulando produtos recalcitrantes no ambiente como também venenosos ao seu próprio metabolismo ou a outros microrganismos responsáveis por passos posteriores na degradação.

Entre as bactérias já descritas, algumas se destacaram pela habilidade de degradar grande variedade de congêneros de PCBs. Uma delas foi uma espécie de *Acinetobacter* sp. que, utilizando bifenilo ou 4-clorobifenilo como fonte de carbono, foi capaz de degradar PCBs, incluindo alguns penta e hexacloro-bifenilos (Furukawa *et al.*, 1979). Uma cepa de *Corynebacterium* sp MB1 foi isolada como contaminante da cultura de *Acinetobacter* e demonstrou competência similar na degradação dos PCBs.

Outras bactérias, como *Alcaligenes eutrophus*H850 e *Pseudomonas* sp. LB400, foram isoladas de diferentes locais com habilidade de degradar PCBs via ataque de anéis clorofênicos 2-, 2,4-, 2,5-, 2,3,6- e 2,4,5-; todos constituintes comuns de misturas comerciais de Arochlor (Bedard *et al.*, 1987b; Nadin *et al.*, 1987). Essas cepas também metabolizam bifenilo e PCBs através da via metabólica 2,3-dioxigenase, mas podem utilizar-se da enzima 3,4-dioxigenase como forma de biodegradação em PCBs contendo anel 2,5-clorofenilo.

Embora as bactérias citadas utilizem a rota de degradação via 2,3-dioxigenase já descrita, é possível que os PCBs possam ser metabolizados por outras vias.

Cepas de *Pseudomonas* sp. LB400 e *Alcaligenes eutrophus* H850 atuaram preferencialmente em congêneros de PCBs contendo 2,5-anel clorofênico (Bedard *et al.*, 1987a; Bopp, 1986), resultando na produção de diferentes metabólitos, como *cis*-diidrodiol, um intermediário do 2,5,2',5'-clorobifenilo (Nadin *et al.*, 1987).

Na verdade, as bactérias capazes de degradar os PCBs necessitam ter ampla capacidade enzimática para reconhecer e degradar os diferentes congêneros presentes no ambiente.

Apesar das bactérias Gram-negativas serem isoladas com maior frequência, algumas bactérias Gram-positivas capazes de degradar PCBs têm sido descritas, como por exemplo bactérias do gênero *Rhodococcus*, que atuam na biodegradação de PCBs e outros compostos aromáticos (Masai *et al.*, 1995; Pellizari *et al.*, 1996).

No Brasil, foram isoladas bactérias com competência na degradação de mono- a pentaclorobifenilos, a partir de amostras contaminadas de solos e sedimento, coletadas no Estado de São Paulo (Pellizari *et al.*, 1996), mostrando a existência de potencial para a biorremediação nessas áreas assim como nos países de clima temperado.



Para otimização do processo de biodegradação, foi demonstrada a necessidade do crescimento de microrganismo utilizando bifenilo como única fonte de carbono. Isso seria uma possível desvantagem nos processos de detoxificação de amostras ambientais, utilizando microrganismos (biorremediação), em que outras fontes de carbono também estão disponíveis (Abramowicz, 1990; Bedard, 1990). O naftaleno também foi utilizado como substrato no isolamento de bactérias que degradam PCBs, mas os resultados sugeriram que o naftaleno não foi tão efetivo como o bifenilo na estimulação do cometabolismo dos PCBs (Pellizari *et al.*, 1995).

## BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBICA DE PCBs

Pouco se conhecia sobre a ocorrência da degradação dos PCBs em ambientes anaeróbios até 1988, quando passou a ser observada a desclorinação anaeróbia de PCB por microrganismos em amostras de sedimentos provenientes do rio Hudson (New York), originalmente contaminado com Aroclor 1242. Foi notado que as transformações possuíam um padrão específico para determinados congêneres, havendo remoção seletiva de *meta* e *para* cloros e aumento na desclorinação de vários congêneres de PCBs. Nenhum outro processo de transformação, como a evaporação ou degradação anaeróbia, poderia atuar dessa maneira. Foi, então, proposto que a presença de um microrganismo anaeróbio nos sedimentos seria o responsável pela degradação dos PCBs (Brown *et al.*, 1984). Brown *et al.* (1987) relataram também a degradação de Aro-clor 1260 nessas amostras.

Após esses relatos, a proposta de desclorinação reductiva nos sedimentos do rio Hudson foi confirmada em estudo laboratorial por Quensen *et al.* (1988). Os autores verificaram um drástico desaparecimento dos congêneres de PCBs altamente clorados. Nies & Vogel (1991) comunicaram a ocorrência de uma desclorinação reductiva de PCBs, envolvendo a substituição de cloro por hidrogênio proveniente da água, entretanto nenhuma cultura anaeróbia pura capaz de promover a desclorinação de PCBs foi isolada ainda (Assaf-Anid *et al.*, 1992) ou os mecanismos bioquímicos da redução foram elucidados (May *et al.*, 1992).

Notou-se ainda que as declorinações foram do tipo *meta*- e *para*-(Morris *et al.*, 1992), indicando características de especialização degradativa.

Recentemente, Ye *et al.* (1995) citaram as bactérias metanogênicas como um grupo capaz de atuar na desclorinação anaeróbia dos PCBs, apesar de sua habilidade de degradação ter sido menor do que a de outros consórcios bacterianos estudados.

Diversos autores (Boyle *et al.*, 1993; Assaf-Anid *et al.*, 1992; May *et al.*, 1992; Abramowicz, 1990; Bedard, 1990) acreditam que em processo na-

tural de degradação, a conversão de PCBs com alto grau de cloração em congêneres com baixa toxicidade seria responsabilidade de microrganismos anaeróbicos, enquanto um grande número de bactérias aeróbicas promoveria a quebra da conformação fenilica. Portanto, sistemas de dupla fase (anaeróbico/aeróbico) têm sido desenvolvidos com o objetivo de se aumentar os processos biodegradativos de PCBs.

Outros estudos têm indicado a possibilidade de construção de rotas metabólicas a partir de diferentes microrganismos (Brenner *et al.*, 1994; Reineke & Knackmuss, 1980). Hernandez *et al.* (1995) sugerem que genes obtidos de bactérias degradadoras de bifenilos e bactérias que metabolizam clorobenzoatos podem ser incorporados em um mesmo microrganismo, que seria responsável pela total mineralização de PCBs. Neste caso, a construção de vias catabólicas envolve outras informações que ainda não estão disponíveis na literatura atual, como a completa informação genética da degradação de PCBs, a regulação gênica, atividade e especificidade de enzimas responsáveis pelo processo de mineralização e estudos de ecologia microbiana e estabilidade de organismos alóctones.

## GENÉTICA DA BIODEGRADAÇÃO

Os genes que codificam a degradação bacteriana dos PCBs têm sido isolados e utilizados para a construção de organismos recombinantes capazes de degradar esses compostos com eficácia. Hernandez *et al.* (1995) informam que genes para o catabolismo de PCBs existem na natureza, entretanto não estão presentes em um só microrganismo. Estes genes já foram isolados de microrganismos do solo, como os do gênero *Pseudomonas*, que degradam PCBs via 2,3-dioxigenase. Furukawa & Miyazaki (1986) extraíram o DNA de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cepa KF707, um organismo conhecido como capaz de degradar mono- até tri-CB (trí-clorobifenilo), incluindo 4-CB, 2,3-CB, 3,4-CB, 2,4'-CB, 2,4,5-CB e 2,4,4'-CB. A partir desse DNA, os genes que codificam para as enzimas responsáveis pela degradação de PCB/bifenilo foram clonados. Os pesquisadores descobriram que os genes que codificam três das quatro enzimas envolvidas na degradação do PCB (*bphA* até *bphC*) estão localizados em um pequeno fragmento de DNA (7.9 Kb). O clone de um fragmento de DNA de 7.2 Kb *Xho* I (Fig. 4) continha os genes *bphA* (codificando a enzima bifenilo dioxigenase), *bphB* (codificando a enzima desidrogenase) e *bphC* (codificando para 2,3-di-hidroxibifenilo dioxigenase).

Uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1161 contendo o plasmídeo recombinante pMFB2 (pKT230 contendo o operon *bphABC*) foi capaz de

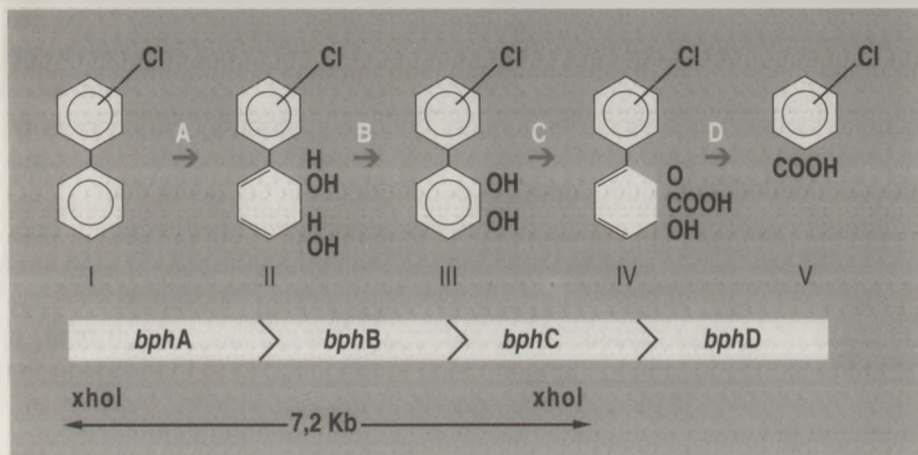


FIGURA 4. Organização do operon *bph* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 e sua relação com a via de degradação dos PCBs.

converter PCBs no produto de *meta*-clivagem. Também foi clonado o gene *bphD*, que é responsável pela codificação de uma hidrolase.

A organização do operon *bph* em *P. pseudoalcaligenes* KF707 foi também determinada. A região *bphA* inicia após o sítio de restrição para a enzima *Eco* RI e apresenta 4 kbases. O gene *bphB* está localizado logo após *bphA* e tem 1 kbases, e o gene *bphC* apresenta 1 kbases em seqüência ao *bphB*. O gene *bphD* não está localizado imediatamente após *bphC* pois existe um segmento extra de 3 kbases (*bphX*), de função ainda não elucidada entre eles.

O gene *bphC* que codifica a 2,3-dihidroxibifenilo dioxigenase foi isolado e seqüenciado a partir de dois diferentes organismos (Furukawa, 1987). O gene *bphC* (*P. pseudoalcaligenes* KF707) exibiu aproximadamente 60% de homologia com *bphC* (*P. paucimobilis* Q1).

Foi estudada também a homologia entre diferentes seqüências de aminoácidos, obtidas de enzimas dioxigenases envolvidas na degradação de diferentes compostos aromáticos, como benzeno, tolueno e naftaleno. Através da observação da alta homologia obtida entre algumas regiões, foi considerado que essas enzimas apresentam um ancestral comum (Zylstra *et al.*, 1991).

Erickson & Mondello (1993) mobilizaram os genes da dioxigenase da cepa LB400 dentro da cepa de KF707 e, através de mutagênese direta, obtiveram uma nova dioxigenase, que somou a grande especificidade aos congêneres de PCBs da cepa LB400 com a atividade contra alguns congêneres de PCBs, que são específicos da cepa KF707. Os autores sugeriram que a sub-unidade *bphA* da bifenilo dioxigenase tem um papel im-

portante na determinação da especificidade dos congêneres de PCBs em que a bactéria irá atuar. Essa informação poderá facilitar a construção de cepas engenheiradas com alta eficiência na degradação dos compostos mais clorados, favorecendo o processo de biorremediação em locais contaminados com compostos mais resistentes à oxidação por bactérias autóctones do meio.

Sondas genéticas têm sido construídas para detecção dos genes *bph*, que codificam para a enzima dioxigenase, em cepas isoladas ou amostras de DNA extraídas diretamente de amostras de solo ou sedimentos contaminados. Devido à grande diversidade dos genes *bph* na natureza, a hibridização positiva nem sempre reflete a capacidade de biodegradação bacteriana dos PCBs nessas amostras (Pellizari *et al.*, 1996; Wallia *et al.*, 1990). Portanto, para se estudar uma população com habilidade catabólica no ambiente, a sonda deve ser selecionada com cuidado para refletir uma seqüência de DNA, correspondente à via metabólica de interesse (Johnson & Olsen, 1995).

Outros estudos, comparando operons *bph* entre diferentes cepas degradadoras de bifenilo e PCBs, demonstraram que algumas bactérias que degradam PCBs possuem operons similares ou muitas vezes idênticos. Outras cepas possuem diferentes graus de homologia entre os genes *bph*, mostrando a grande diversidade desses genes na natureza (Furukawa, 1994). Foi também descrita a presença de um transposon, que carrega os genes *bph* em uma cepa de *Alcaligenes eutrophus* A4 (Springael *et al.*, 1993). Furukawa (1994) informa que a presença de transposons e a diversidade de genes homólogos sugerem que os genes *bph* acumularam mutações por um longo período histórico, mesmo antes da presença de compostos xenobióticos no ambiente. Esses genes seriam, então, necessários para o catabolismo de polímeros aromáticos presentes na natureza, como por exemplo na lignina das plantas.

Muitos trabalhos apresentam diversas espécies bacterianas capazes de promover o processo de degradação para bifenilos policlorados (Cole *et al.*, 1994; Ka *et al.*, 1994a; Ka *et al.*, 1994b) e outros mostram apenas a possibilidade de halogenação, produção de ácido clorobenzóico (Boyle *et al.*, 1993) e clorocatecol (Arensdorf & Focht, 1994). Portanto, a construção de uma estirpe recombinante por complementação de vias catabólicas com o propósito de biodegradação tem-se tornado objetivo em diversos laboratórios (Reineke & Knackmuss, 1980). Tal organismo representaria um avanço significativo em direção à biorremediação aeróbica de PCBs em solos e sedimentos contaminados. Recentemente, cepas capazes de mineralizar totalmente mono- e diclorobifenilos foram construídas (Furukawa, 1994), entretanto, até o momento não se têm informações de resultados práticos de biorremediação em solos ou ambientes aquáticos.

## VETORES DE APLICAÇÃO EM CAMPO PARA BIORREMEDIAÇÃO

É nesta linha de trabalho que o tratamento *in situ* de solos ou sedimentos contaminados com PCBs possui potencial considerável para economia de custos, quando comparado com escavação e tratamento em reatores especiais ou incineradores.

Diversos problemas têm sido encontrados, quando da introdução de uma nova estirpe em uma comunidade já estabelecida (Alexander, 1994; Alexander, 1977). O desenvolvimento de hospedeiros para aplicações práticas requer consideração sobre os princípios ecológicos, que governam o crescimento e a sobrevivência de organismos, que competem num mesmo ambiente e devem ser considerados para cada local a ser aplicado. Sem estes critérios, as inoculações quase sempre deixam a desejar.

O uso de vetores de aplicação em campo (Field Application Vectors – FAVs), resultante da combinação de um substrato seletivo, um hospedeiro bacteriano e um vetor de clonagem desenvolvidos com o propósito de expressar genes em um ambiente natural e competitivo (Lajoie *et al.*, 1994), poderia ser útil para processos de biorremediação.

Uma nova abordagem desse problema é a proposta de promover um nicho temporário para o microrganismo hospedeiro por adição de um substrato utilizado por essa estirpe, mas não disponível às espécies locais. Lajoie *et al.* (1992) consideram que um substrato adequado deveria ser atóxico para humanos e outros organismos superiores, de baixo custo e de fácil aplicação em campo.

Mas frente às duas escolhas existentes para a biorremediação, deve-se sempre pensar, em primeiro lugar, em estimular e otimizar a biodegradação pelos microrganismos autóctones do meio e, somente na sua impossibilidade, deve ser considerada a introdução de novos microrganismos.

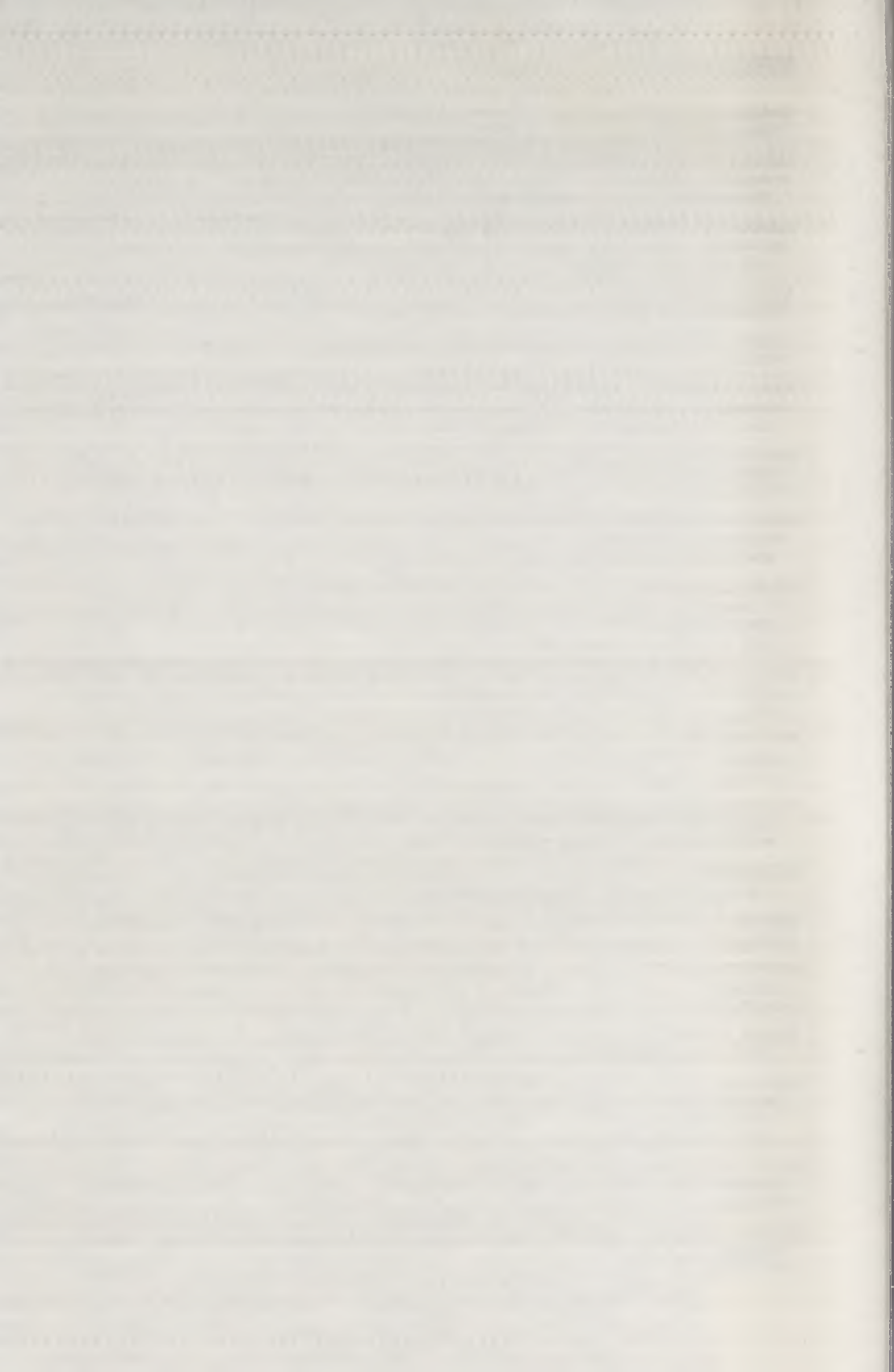
---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOWICZ, D.A. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.10, n.3, p.241-251, 1990.
- AHMED, M.; FOCHT, D.D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.19, n.1, p.47-52, 1973.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego, Academic Press, 1994.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**, 2. ed. New York: John Wiley, 1977.
- ARENSDORF, J.J.; FOCHT, D.D. Formation of chlorocatechol *meta* cleavage products by a pseudomand during metabolism of monochlorobiphenyls. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.8, p.2884-2889, 1994.

- ASSAF-ANID, N.; NIES, L.; VOGEL, T.M. Reductive dechlorination of a polychlorinated biphenyl congener and hexachlorobenzene by vitamin B<sub>12</sub>. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, n.3, p.1057-1060, 1992.
- BEDARD, D.L. **Bacterial transformation of polychlorinated biphenyls**. GE Research & Development. Technical Information Series. Report Number 90CRD271. p15., 1990.
- BEDARD, D.L.; HABERL, M.L.; MAY, R.J.; BRENNAN, M.J. Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, n.5, p.1103-1112, 1987a.
- BEDARD, D.L.; WAGNER, R.E.; BRENNAN, M.L.; HABERL, M.L.; BROWN, J.F. Extensive degradation of aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, n.5, p.1094-1102, 1987b.
- BLUMER, M.; YOUNGBLOOD, W.W. Polycyclic aromatic carbons in soils and recent sediments. **Science**. v.188, n.4183, p.53-55, 1977.
- BOPP, L.H. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. **Journal of Industrial Microbiology**. v.1, p.23-29, 1986.
- BOYLE, A.W.; BLAKE, C.K.; PRICE II, A.; MAY, H.D. Effects of polychlorinated biphenyl congener concentration and sediment supplementaion on rates of methanogenesis and 2,3,6-Trichlorobiphenil dechlorination in an anaerobic enrichment. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.9, p.3027-3031, 1993.
- BRENNER, V.; ARENSDORF, J.J.; FOCHT, D.D. Genetic construction of PCB degraders. **Biodegradation**. v.5, n.3-4, p.359-377, 1994.
- BUCKLEY, E.H. Accumulation of airborne polychlorinated biphenyls in foliage. **Science**. v.216, n.4545, p.520-522, 1982.
- COLE, J.R.; CASCARELLI, A.L.; MOHN, W.W.; TIEDJE, J.M. Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, n.10, p.3536-3542, 1994.
- ERICKSON, B.D.; MONDELLO, F.J. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.11, p.3858-3862, 1993.
- FINETTE, B.A.; SUBRAMANIAN, V.; GIBSON, D.T. Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* PpF1 mutants defective in the toluene dioxygenase enzyme system. **Journal of Bacteriology**. v.160, n.3, p.1003-1009, 1984.
- FURUKAWA, K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. **Biodegradation**. v.5, n.3-4, p.289-300, 1994.
- FURUKAWA, K.; MIYAZAKI, T. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Journal of Bacteriology**. v.166, n.6, p.392-398, 1986.
- FURUKAWA, K.; TOMIZUKA, N.; KAMIBAYASHI, A. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. **Applied and Environmental Microbiology**. v.38, n.2, p.301-310, 1979.
- FURUKAWA, K.; TONOMURA, K.; KAMIBAYASHI, A. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. **Applied and Environmental Microbiology**. v.35, n.2, p.223-227, 1978.
- HERNANDEZ, B.S.; ARENSDORF, J.J.; FOCHT, D.D. Catabolic characteristics of biphenyl-utilizing isolates which cometabolize PCBs. **Biodegradation**. v.6, n.1-2, p.75-82, 1995.
- HOOPER, S.W.; PETTIGREW, C.A.; SAYLER, G. Ecological fate, effects and prospects for the elimination of environmental polychlorinated byphenyls (PCBs). **Environmental Toxicology Chemistry**. v.9, p.655-667, 1990.
- HUTZINGER, O.; SAFE, S.; ZITKO, V. **The chemistry of PCBs**. Cleveland: CRC Press, 1974. 142p.
- KA, J.O.; HOLBEN, W.E.; TIEDJE, J.M. Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, n.4, p.1106-1115, 1994a.
- KA, J.O.; HOLBEN, W.E.; TIEDJE, J.M. Analysis of competition in soil among 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, n.4, p.1121-1128, 1994b.

- KIMBROUGH, R.D. The toxicity of polychlorinated polycyclic compounds and related chemicals. **Critical Review of Toxicology**, v.2, n.4, p.445-498, 1974.
- LAIJOIE, C.A.; CHEN, S.-Y.; OH, K.-C.; STRON, P.F. Development and use of field application vectors to express nonadaptive foreign genes in competitive environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.2, p.655-663, 1992.
- LAIJOIE, C.A.; LAYTON, A.C.; SAYLER, G.S. Development of field application vectors for bioremediation of soils contaminated with polychlorinated biphenyls. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.8, p.2826-2833, 1994.
- LARA, W.H.; BARRETO, H.H.C.; INOMATA, O.N.I.; MONTONE, R.; WEBER, R.R. Organochlorine residues in arctic penguins. **Pesquisa Antartica Brasileira**, v.2, p.1-6, 1990.
- LAUBER, J.D. Disposal and destruction of waste PCBs. In: WAID, J.S., ed. **PCBs and the environment**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p.83.
- MASAI, E.; YAMADA, A.; HEALY, J.M.; HATTA, T.; KIMBARA, K.; FUKUDA, M.; YANO, K. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.6, p.2079-2085, 1995.
- MAY, H.D.; BOYLE, A.W.; PRICE II, W.A.; BLAKE, C.K. Subculturing of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating anaerobic enrichment on solid media. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.12, p.4051-4054, 1992.
- MORRIS, P.J.; MOHN, W.W.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. Establishment of a polychlorinated biphenyl-degrading enrichment culture with predominantly *meta* dechlorination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.3088-3094, 1992.
- NADIM, L.M.; SCHOCKEN, M.J.; HIGSON, F.K.; GISON, D.T.; BEDARD, D.L.; BOPP, L.H.; MONDELLO, F.J. Bacterial oxidation of polychlorinated biphenyls. In: **Annual Research Symposium on Land Disposal, Remedial Action, Incineration, and Treatment of Hazardous Waste**. Cincinnati: EPA, 1987. p.395-13., 1987. **Proceedings**
- NIES, L.; VOGEL, T.M. Identification of the proton source for the microbial reductive dechlorination of 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.10, p.2771-2724, 1991.
- NOGUEIRA, D.P.; SOUZA, J.M.P.; COLACIOPPO, S.; GOMES, J.R.; BRANDÃO, J.B.B.; SOUZA, M.L.A. Acúmulo de policloretos de bifenila na população da grande São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.21, p.279-290, 1987.
- PELLIZARI, V.H.; BEZBORODINOV, S.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M. Evaluation of naphtalene and biphenyl isolated strains for hybridization to dioxygenases probes and PCB degrading ability. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.6, p.2053-2058, 1996.
- QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. Reductive dechlorination of polychlorinated byphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. **Science**, v.242, n.4879, p.752-754, 1988.
- REINEKE, W.; KNACKMUSS, H.-J. Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp B13 derivatives. **Journal of Bacteriology**, v.142, n.2, p.467-473, 1980.
- SPRINGAEL, D.; KREPS, S.; MERGEAY, M. Identification of catabolic transposon, Tn4371, carrying byphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.6, p.1674-1681, 1993.
- TANABE, S.; MORI, T.; TATSUKAWA, R. Global pollution of marine mammals by PCBs, DDTs and HCHs (BHCs). **Chemosphere**, v.12, n.9, p.1269-1275, 1983.
- YADAV, J.S.; QUENSEN III, J.S.; TIEDJE, J.M.; REDDY, C.A. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254 and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.7, p.2560-2565, 1995.
- YE, D.; QUENSEN III, J.S.; TIEDJE, J.M.; BOYD, S.A. Evidence for para dechlorination of polychlorobiphenyls by methanogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.6, p.2166-2171, 1995.
- ZYLSTRA, G.J.; GIBSON, W.R. Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. **Genetic Engineering**, v.13, p.183-199, 1991.





# 10

## BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS

Sioni Maluf Barbieri

Departamento de Genética e Evolução

Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR

Rodovia Washington Luis km 235

Caixa Postal 676, CEP 13 565-905, São Carlos, SP

### INTRODUÇÃO

A vida na terra é mantida através da reciclagem de vários elementos químicos juntamente com um fluxo contínuo de energia proveniente do sol. Através da conversão da energia solar pela fotossíntese, o  $\text{CO}_2$  e outros compostos inorgânicos são assimilados do meio ambiente e acumulados como constituintes orgânicos nos seres vivos. Essa matéria orgânica acumulada serve, então, como fonte de energia para várias formas de vida. Toda esta matéria orgânica é reciclada através de ciclos, que se mantêm em equilíbrio (Stanier *et al.*, 1986).

Com o aumento da população humana e o desenvolvimento industrial, principalmente após a segunda guerra mundial, novos compostos orgânicos têm sido sintetizados e continuamente introduzidos em grande quantidade no meio ambiente, interrompendo, assim, o equilíbrio natural. Entre os compostos sintéticos mais poluentes pode-se citar aqueles presentes em detergentes, preservantes de madeira, pesticidas e resíduos industriais (Crapez *et al.*, 1989). Grande parte destes compostos é considerada recalcitrante, não desaparecendo da biosfera por mecanismos naturais (foto e biodegradação), podendo causar sérios transtornos ecológicos (Godsy *et al.*, 1983).

Os hidrocarbonetos aromáticos constituem uma classe de compostos orgânicos contendo um ou mais anéis benzênicos, arranjados de forma linear, angular ou em grupos (Fig. 1). Essa classe de compostos orgânicos pode apresentar substituições de um dos carbonos do anel aromáti-

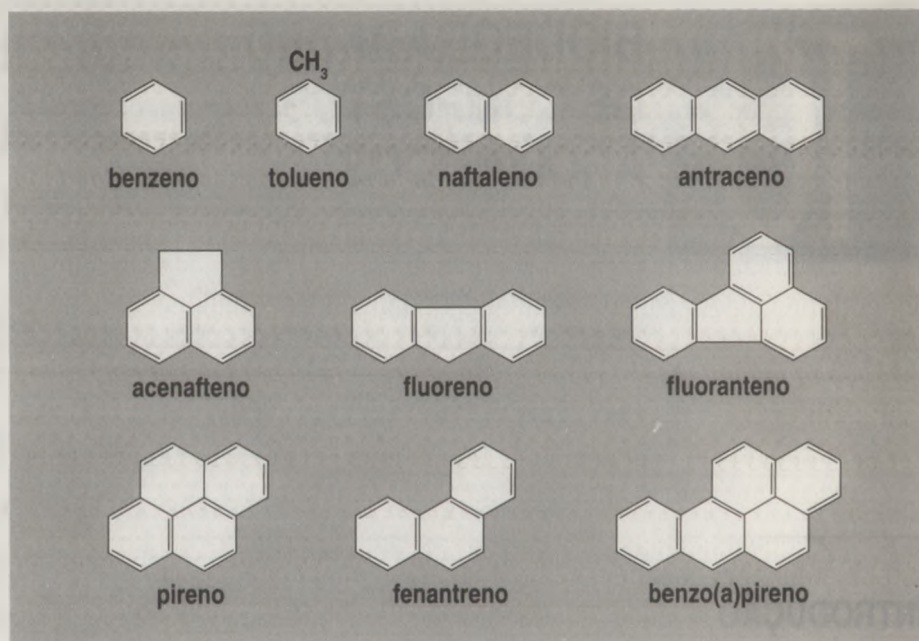


FIGURA 1. Estrutura de alguns hidrocarbonetos aromáticos causadores de poluição ambiental.

co pelo enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Esses compostos surgem no meio ambiente, devido tanto aos processos naturais quanto aos de natureza antropogênica. Resultam principalmente da queima de combustíveis fósseis (gasolina, querosene, óleo diesel) e do alcatrão, como subprodutos de processamento industrial (efluentes petroquímicos, resíduos de refinarias, indústria de embarcações), da queimada de florestas, da incineração de resíduos industriais, da exaustão de motores automobilísticos, da fumaça de cigarro e do tabaco, entre outros (LaFlamme & Hites, 1984; Lijinsky, 1991). Benzeno, estireno, etilbenzeno, tolueno e xileno estão entre os produtos químicos produzidos em maior volume, com uma produção mundial da ordem de milhões de toneladas por ano (Smith, 1990). No entanto, uma das principais fontes de contaminação do meio ambiente por compostos aromáticos é o creosoto (Cerniglia, 1992), já que é constituído de 85 a 90% desses compostos (Mueller *et al.*, 1989a). A contaminação do meio ambiente por creosoto pode resultar de locais destinados à destilação do alcatrão bem como para o tratamento de madeira, poluindo a superfície do solo, águas de lagoas de tratamento e águas subterrâneas. Esta contaminação é proveniente do vazamento de tanques contendo o creosoto, de derramamento e gotejamento da madeira tratada e de lixiviação do produto (Mueller *et al.*, 1989b).

A concentração dos hidrocarbonetos aromáticos no meio ambiente depende do nível de desenvolvimento industrial e da contaminação por produtos petrolíferos (Jones *et al.*, 1989), podendo variar desde 5 ng/g de solo em áreas não desenvolvidas até  $1,79 \times 10^6$  ng/g em locais próximos a refinarias de óleo (Cerniglia, 1992).

Os compostos aromáticos são moléculas hidrofóbicas que apresentam baixa solubilidade em água, o que contribui para sua persistência no meio ambiente. Muitos deles foram considerados pelo Ato Americano "1976 Resource Conservation and Recovery" como resíduos perigosos à saúde humana e ao meio ambiente (Ehrlich *et al.*, 1982). A Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA) dos Estados Unidos da América lista vários desses compostos como poluentes de prioridade nacional, que devem ser freqüentemente monitorados em efluentes industriais (Keith & Telliard, 1979), devido ao fato de serem considerados como carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, além de possuírem efeitos tóxicos aos seres vivos (Lijinsky *et al.*, 1963) e terem a capacidade de se bioacumularem nas diferentes cadeias alimentares (Godsy *et al.*, 1983). Por isso, existe um interesse crescente de se entender o destino e as formas de desaparecimento de tais compostos para que haja o desenvolvimento de métodos mais eficientes de remoção dos mesmos do meio ambiente. Métodos como, por exemplo, de biorremediação, têm sido substituídos por métodos tradicionais, tais como incineração, como formas alternativas e mais eficientes na descontaminação de solos e águas contaminados por tais tipos de compostos (Ellis *et al.*, 1991).

## CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DA BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS

Embora vários hidrocarbonetos aromáticos sejam considerados como recalcitrantes no meio ambiente, seu desaparecimento pode ocorrer através de uma variedade de processos abióticos, como a volatilização, a lixiviação e a fotodegradação (Morgan & Watkinson, 1989). No entanto, a biodegradação representa a principal rota pela qual esses compostos são removidos do meio ambiente (Sims *et al.*, 1990).

Existem vários artigos de revisão sobre a degradação de hidrocarbonetos aromáticos por microrganismos (Dagley, 1975; Cerniglia, 1984; Gibson, 1984; Cerniglia, 1992), abordando diferentes aspectos da biodegradação a nível bioquímico, fisiológico e molecular e dando ênfase ao processo em condições de aerobiose. Devido à falta de conhecimen-

to na área, pouquíssimos trabalhos têm sido publicados sobre a biodegradação desses compostos em condições de anaerobiose (Bisailon *et al.*, 1991; Ramanand & Suflita, 1991). O metabolismo de certos aromáticos, por bactérias redutoras de nitrato e de sulfato, por fermentação e metanogênese, inclusive contendo os possíveis mecanismos e enzimas envolvidos no processo, foi descrito por Evans & Fuchs (1988).

Mesmo contendo numerosas informações a respeito da biodegradação na literatura, nenhum dos autores considera, em uma mesma publicação, todos os aspectos envolvidos na biodegradação de compostos aromáticos conjuntamente. Portanto, este capítulo tem por finalidade abordar os aspectos bioquímicos e genéticos da degradação microbiana, em condições de aerobiose, dos compostos aromáticos mais descritos na literatura até o presente momento.

A biodegradação desses compostos é inversamente proporcional ao número de anéis na molécula benzênica. Assim, a transformação de compostos, como o bifenil, naftaleno e metilnaftalenos, que contêm dois anéis benzênicos (Dean-Raymond & Bartha, 1975; Heitkamp *et al.*, 1987; Barnsley, 1988; Grund *et al.*, 1992; Gibson *et al.*, 1993), e acenafteno (Schocken & Gibson, 1984; Mihelcic & Luthy, 1988), carbazol (Omori, 1995), fenantreno (Narro *et al.*, 1992; Grimberg & Aitken, 1995) e fluoreno (Grifoll *et al.*, 1992), contendo 3 anéis aromáticos, é relativamente rápida e amplamente descrita na literatura. Microrganismos capazes de utilizarem compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como benzo(a)antraceno (Mahaffey *et al.*, 1988), fluoranteno (Boldrin *et al.*, 1993; Lantz *et al.*, 1995) e pireno (Heitkamp *et al.*, 1988), já foram isolados e caracterizados. No entanto, a maioria dos compostos, contendo mais que 3 anéis benzênicos, como benzo(a)pireno e o criseno são resistentes ao ataque microbiano e, por isso, persistem no meio ambiente.

Vários estudos descrevem a biodegradação dos compostos aromáticos por uma ampla variedade de microrganismos, tais como algas (Cerniglia *et al.*, 1980; Narro *et al.*, 1992), bactérias (Gibson & Subramanian, 1984; Cerniglia, 1992; Barbieri, 1994) e fungos (Cerniglia *et al.*, 1978) presentes em culturas tanto puras quanto mistas. Embora a Tabela 1 mostre exemplos de compostos aromáticos, que são oxidados por diferentes cianobactérias e algas verdes, a maioria destes organismos não é capaz de utilizar tais compostos como única fonte de carbono e energia. Relatos sobre a oxidação de naftaleno por *Oscillatoria* sp., com conversão a 1-naftol, têm sido descritos, enquanto outra cianobactéria, a *Agmenellum quadruplicatum*, é capaz de oxidar fenantreno, formando *trans*-9,10-dihidroxi-9,10-dihidrofenantreno e 1-metoxifenantreno como metabólitos principais (Cerniglia *et al.*, 1980; Cerniglia, 1992).

Entre os fungos mais citados (Tabela 2), tem sido reportado que *Cunninghamella elegans* e *Phanerochaete chrysosporium* apresentam capacidade de oxidar e degradar vários compostos aromáticos, tais como antraceno, fenantreno e fenol (Hammel *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1992). Esses microrganismos têm sido até mesmo usados em processos de biorremediação, na despoluição de solos e sedimentos contaminados por tais compostos (Bumpus, 1989; Aust, 1990; Dietrich *et al.*, 1995).

O metabolismo de compostos aromáticos por bactérias tem sido bem documentado. Entre os gêneros mais comumente observados (Tabela 3) como degradadores desses compostos, pode-se citar o *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Xanthobacter* (Cerniglia, 1984; Mahaffey *et al.*, 1988; Narro *et al.*, 1992; Barbieri, 1994).

TABELA 1. Oxidação de hidrocarbonetos aromáticos por diferentes espécies de algas e cianobactérias.

COMPOSTO	ORGANISMO	REFERÊNCIA
Benzo(a)pireno	<i>Selenastrum capricornatum</i>	Warshawsky <i>et al.</i> 1990
Fenantreno	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Agmenellum quadriplicatum</i>	Narro <i>et al.</i> 1992
Naftaleno	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Microcoleus chthonoplastes</i> , <i>Nostoc</i> sp., <i>Anabaena</i> sp., <i>Agmenellum quadriplicatum</i> , <i>Coccochloris elabens</i> , <i>Aphanocapsa</i> sp., <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>C. autotrophica</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Chlamydomonas angulosa</i> , <i>Ulva fasciata</i> , <i>Cylindrotheca</i> sp., <i>Amphora</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., <i>Synedra</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Porphyridium</i> sp.	Cerniglia <i>et al.</i> 1980, Narro <i>et al.</i> 1992

TABELA 2. Oxidação de compostos aromáticos por diferentes espécies de fungos.

COMPOSTO	ORGANISMOS	REFERÊNCIAS
Antraceno	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>Trametes</i> sp.	Cerniglia 1982, Hammel et al. 1991, Field et al. 1992
Acenafteno	<i>C. elegans</i>	Pothuluri et al. 1992a
Benzo(a)- antraceno	<i>C. elegans</i>	Cerniglia et al. 1980
Benzo(a)pireno	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> , <i>C. elegans</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>S. cerevisiae</i> , <i>Trametes</i> sp.	Cerniglia & Crow 1981, Ghosh et al. 1983, Bumpus et al. 1985, Field et al. 1992
Fenantreno	<i>C. elegans</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Trametes vesicolor</i>	Morgan et al. 1991, Hammel et al. 1992
Fluoranteno	<i>C. elegans</i>	Pothuluri et al. 1992b
Naftaleno	<i>Absidia glauca</i> , <i>Aspergillus</i> <i>niger</i> , <i>Basidiolobus ranarum</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Choanephora</i> <i>campincta</i> , <i>Circinella</i> sp., <i>Claviceps paspali</i> , <i>Conidiolobus</i> <i>gonimodes</i> , <i>C. bainieri</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. japonica</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Gliocadium</i> sp., <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Panaeolus</i> <i>subbalteatus</i> , <i>Phycomyces</i> <i>blakesleeanus</i> , <i>Psilocybe stuntzii</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Saprolegnia parasitica</i> , <i>Smittium</i> <i>culicis</i> , <i>S. culisetae</i> , <i>S. simulii</i> , <i>Sordaria</i> <i>fimicola</i> , <i>Syncephalastrum</i> <i>racemosum</i> , <i>Thamnidium anomalum</i> , <i>Zygorhynchus moelleri</i>	Cerniglia & Gibson 1977, Cerniglia et al. 1978, Cerniglia et al. 1981

TABELA 3. Exemplos de hidrocarbonetos aromáticos que são oxidados por diferentes espécies de bactérias

COMPOSTO	ORGANISMOS	REFERÊNCIA
Acenafteno	<i>Beijerinckia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. cepacia</i>	Chapman 1979, Schocken & Gibson 1984, Ellis <i>et al.</i> 1991.
Antraceno	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.	Evans <i>et al.</i> 1965, Foght & Westlake 1988
Benzo(a)- antraceno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Beijerinckia</i> sp., <i>P. putida</i>	Mahaffey <i>et al.</i> 1988
Benzo(a)pireno	<i>Beijerinckia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.	Heitkamp & Cerniglia 1988, Grosser <i>et al.</i> 1991
Criseno	<i>Rhodococcus</i> sp.	Walter <i>et al.</i> 1991
Dibenzofurano	<i>Pseudomonas</i> sp.	Fortnagel <i>et al.</i> 1990
Fenantreno	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>A. denitrificans</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>et al.</i> 1993, <i>Nocardia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp.	West <i>et al.</i> 1984, Guerrin & Jones 1988, Keuth & Rehm 1991, Narro <i>et al.</i> 1992, Boldrin Stringfellow & Aitken 1995
Fluoranteno e Fluoreno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.	Foght & Westake 1988, Heitkamp <i>et al.</i> 1988, Mueller <i>et al.</i> 1990, Grifoll <i>et al.</i> 1992, Weissenfels <i>et</i> <i>al.</i> 1991, Boldrin <i>et al.</i> 1993
Naftaleno	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Corynebacterium</i> <i>renale</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. fluorescens</i> ,	Dun & Gunsalus 1973, Jeffrey <i>et al.</i> 1975, Dua & Meera 1981, Ryu <i>et al.</i> 1981, Barnsley 1983, Grund <i>et al.</i> 1992,



	<i>P. putida</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. testosteroni</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	
Pireno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.	Heitkamp <i>et al.</i> 1988, Walter <i>et al.</i> 1991, Boldrin <i>et al.</i> 1993
Tolueno	<i>Acinetobacter lwoffii</i> , <i>Alcaligenes</i> <i>euthrophus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i>	Simpson <i>et al.</i> 1987, Vecht <i>et al.</i> 1988, Inoue <i>et al.</i> 1991

O destino dos diferentes compostos aromáticos, tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres, pode ser influenciado por inúmeros fatores abióticos (temperatura, pH, tipo de solo e sedimento, aeração, concentração de nutrientes, umidade, propriedades físico-químicas e concentração dos compostos, intensidade luminosa, presença de co-substratos etc.) e bióticos (tipo e distribuição dos microrganismos presentes, adaptação microbiana ao composto aromático, presença de predadores e biodisponibilidade do composto), como observado por diferentes pesquisadores (Cerniglia & Heitkamp, 1989; Leahy & Colwell, 1990; Atlas, 1991; Volkering *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). Esses fatores determinarão a taxa de degradação e mineralização desses compostos.

## METABOLISMO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS — ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Os compostos orgânicos que contêm estrutura benzênica podem ser metabolizados no fígado, placenta, pulmão, rim, trato intestinal e na pele de mamíferos. No entanto, a atividade mais alta das enzimas responsáveis pela hidroxilação desses compostos foi encontrada no retículo endoplasmático de células hepáticas, o qual converte compostos lipofílicos em metabólitos hidrossolúveis, excretando-os do organismo. Inclusive, muitos compostos aromáticos considerados inertes podem transformar-se em potentes carcinogênicos e mutagênicos pela ação de enzimas presentes nesses tecidos. Nesse caso, enzimas do tipo citocromo P-450 monoxigenase, num processo de monoxigenação inicial do anel benzênico, formarão um óxido de areno como metabólito, o qual poderá ligar-se covalentemente aos ácidos nucleicos (Cerniglia, 1984).

Sabe-se que, entre os microrganismos, as algas, bactérias e fungos, como já foi descrito, desempenham papel extremamente importante no metabolismo dos compostos aromáticos mono e policíclicos. Apesar das



algas e cianobactérias serem capazes de oxidar compostos aromáticos tendo sido, inclusive, utilizadas na despoluição de locais contaminados por hexaclorobenzeno (Kuritz & Wolk, 1995), o mecanismo é pouco conhecido e, portanto, elas não serão aqui consideradas.

Embora pouco tenha sido descrito na literatura sobre a capacidade de utilizar compostos aromáticos como única fonte de carbono, reações semelhantes aos mamíferos são realizadas pelos fungos no metabolismo desses compostos (Fig. 2). Estes organismos também se utilizam do sis-

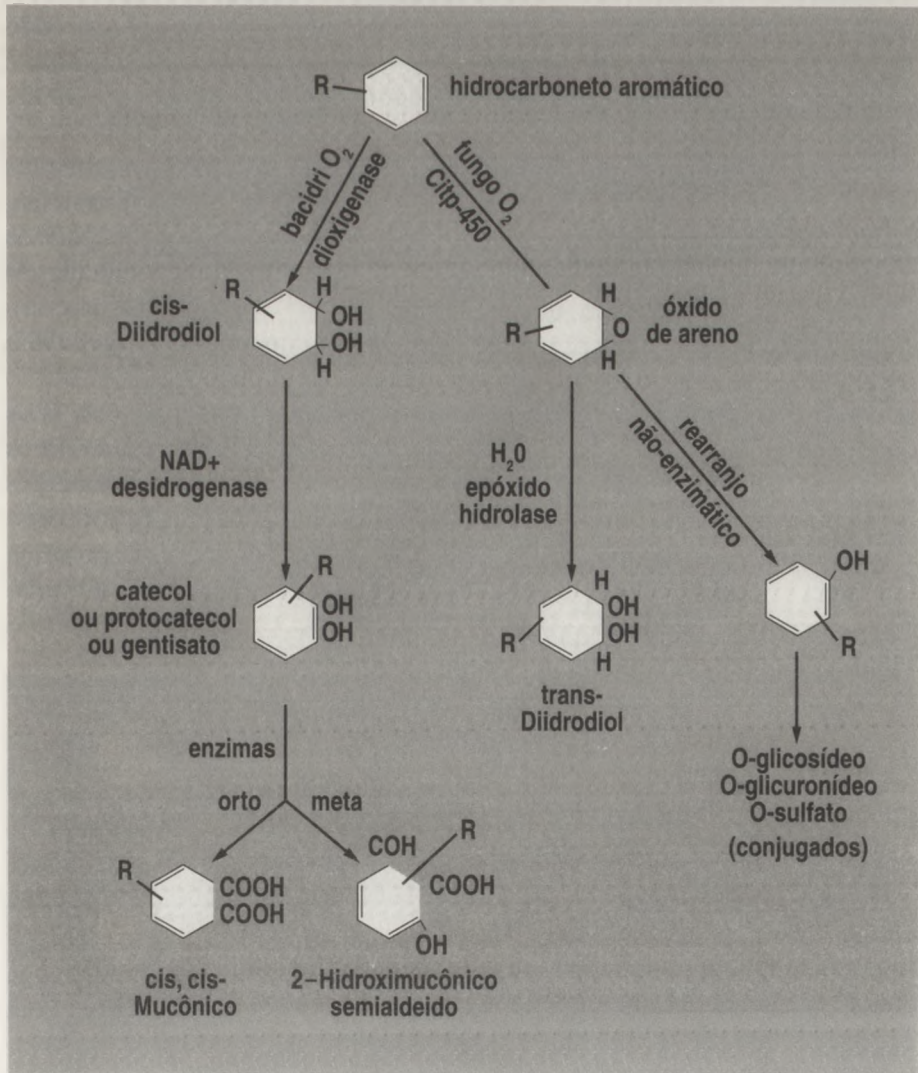


FIGURA 2. Vias catabólicas para a utilização de hidrocarbonetos aromáticos por microrganismos.

tema citocromo P-450 monoxigenase para incorporar um átomo de oxigênio no núcleo aromático e reduzir o átomo restante em água. O óxido de areno formado, como produto da reação, é hidrolisado por uma epóxido hidrolase produzindo *trans*-diidrodióis (Cerniglia, 1981) ou fenol, através de rearranjos não enzimáticos, o qual pode ser conjugado com o sulfato, o ácido glicurônico ou a glicose.

No metabolismo dos compostos aromáticos por bactérias tem-se uma oxidação inicial que permite a incorporação da molécula de oxigênio ao anel benzênico para formar os *cis*-diidrodióis. Tal reação é catalisada por enzimas chamadas oxigenases que são constituídas por um sistema enzimático, formado de vários componentes, em que a oxigenase terminal é uma proteína ferro-enxofre (Ensley & Gibson, 1983; Hegeman, 1985). Essas enzimas são formadas de várias subunidades protéicas, arranjadas numa cadeia de transferência de elétrons, em que suas estruturas, mecanismos de ação e requerimentos de coenzimas são variáveis (Mason & Cammack, 1992). Tais enzimas podem ser classificadas em dois grupos principais: as monoxigenases, que incorporam um dos átomos de  $O_2$  na molécula do substrato, e as dioxigenases, que adicionam os dois átomos de  $O_2$  no composto aromático. As monoxigenases funcionam parte como oxigenase e parte como oxidase, denominadas de oxidase de função mista, já que o átomo que resta do  $O_2$  é reduzido para formar água (Mason, 1988). Já as dioxigenases, envolvidas na hidroxilação do anel aromático, requerem os cofatores NADH ou NADPH, os quais recebem os elétrons provenientes de uma flavoproteína ferro-enxofre e os transferem para uma ferredoxina 2Fe.2S (Haigler & Gibson, 1990). Esta, por sua vez, reduz uma proteína ferro-enxofre terminal (Ensley & Gibson, 1983), que vai catalisar a oxidação do composto aromático (Fig. 3).

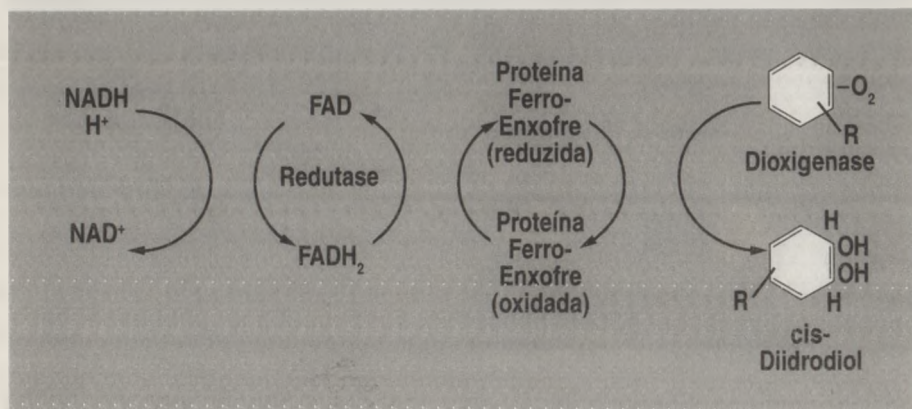


FIGURA 3. Mecanismo de oxidação dos compostos aromáticos pelos componentes enzimáticos da dioxigenase.

As dioxigenases podem ser subdivididas em dois grupos. Em primeiro lugar, consideramos o subgrupo contendo dois componentes enzimáticos, composto de uma oxigenase e uma redutase, cujo sistema está envolvido com a oxidação de ácidos aromáticos, tais como benzoato e clorofenilbenzoato (Markus *et al.*, 1986). O componente redutase é de flavoproteínas, contendo flavina-adenina-dinucleotídeo ou flavina-mononucleotídeo e um centro [2Fe-2S], coordenado por 4 cisteínas conservadas, que vão transferir elétrons de NADH para o componente oxigenase, cuja composição é variável. Algumas oxigenases apresentam-se somente como uma a proteína na forma de dímero, trímero ou tetrâmero (Batie *et al.*, 1987), enquanto outras contêm uma segunda subunidade protéica, adotando uma configuração  $a_3b_3$  (Fetzner *et al.*, 1992). O segundo subgrupo, também chamado de sistema de três componentes enzimáticos, consiste de uma flavina-redutase, uma ferredoxina e uma proteína ferro-enxofre. Tal sistema está envolvido na oxidação de compostos, tais como bifênil (Haddock & Gibson, 1995), naftaleno (Neidle *et al.*, 1991) e tolueno (Yeh *et al.*, 1977).

No segundo estágio do metabolismo de compostos aromáticos por bactérias, tem-se a rearomatização do *cis*-dihidrodiol por uma desidrogenase, para formar um derivado dihidroxilado (Patel & Gibson, 1974). Embora os passos iniciais da conversão sejam semelhantes para muitos compostos aromáticos, o número de intermediários formados após a rearomatização do anel benzênico é limitado (Reineke & Knackmuss, 1988; Chaudhry & Chapalamadugu, 1991). Esses intermediários hidroxilados (catecol, protocatecol ou ácido gentísico) servem de substratos para outros tipos de dioxigenases, que promoverão a abertura do anel benzênico. Tais dioxigenases não requerem cofatores e podem clivar o composto, através de duas vias metabólicas principais, *meta* ou *orto*. Na via *meta*, a quebra da ligação ocorre entre o átomo do carbono adjacente ao grupo hidroxila do catecol, formando o 2-hidroximucônico semialdeído como intermediário da via metabólica e, posteriormente, piruvato e acetaldeído. A dioxigenase responsável por essa catálise, também chamada de extradiol, é a catecol 2,3-dioxigenase. Quando o protocatecol é formado como intermediário, a enzima responsável pela abertura do anel é a protocatecol 4,5-dioxigenase (Dagley, 1975).

A via *orto* envolve a quebra de ligação entre os átomos de carbono ligados aos dois grupos hidroxila do catecol para dar lugar à formação do ácido *cis-cis* mucônico e daí succinato e acetil-coenzima A (Chapman, 1972). A abertura do anel aromático, acrescido dos passos metabólicos seguintes da clivagem intradiol é denominada via metabólica *orto* ou do  $\beta$ -ceto adipato. A catecol 1,2-dioxigenase (dioxigenase intradiol) é a enzima

que quebra a ligação entre os átomos de carbono. Se o dihidrodiol formado é o protocatecol, a enzima atuante sobre esse metabólito será a protocatecol 3,4-dioxigenase (Dagley, 1975).

Num terceiro tipo de via metabólica descrita, denominada via *orto*-modificada ou via do gentisato, a ruptura da ligação entre os dois átomos de carbono resulta na produção do gentisato e, posteriormente, no maleilpiruvato, fumarato e piruvato. A enzima envolvida nesse passo catabólico é a gentisato 1,2-dioxigenase. O homogentisato pode também ser produzido como produto de algumas desidrogenases, cuja ruptura pela homogentisato dioxigenase leva à formação do maleilacetoacético (Gibson, 1984).

As vias *meta* e a do gentisato são mais comumente utilizadas no catabolismo de um maior número de compostos aromáticos do que a via *orto*, o que pode ser atribuído à baixa especificidade da indução e função das enzimas desta última via. Todas essas vias levam a intermediários da rota metabólica central da célula, o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ATC).

Na maioria dos casos relatados, as dioxigenases que iniciam a via *meta* e gentisato contêm um grupo ferro não hemínico que, quando na forma ativa, se transforma no estado ferroso, ao contrário do estado férrico requerido para a atividade da intradiol dioxigenase. Embora a maioria das dioxigenases utilizadas na abertura do anel aromático contenha ferro como o metal em seus sítios catalíticos, existem algumas, como, por exemplo, as presentes em *Bacillus brevis* (Que *et al.*, 1981) e em *Arthrobacter* (Boldt *et al.*, 1995), que contêm manganês.

Enzimas como a clorocatecol dioxigenase (Bolderick & O'halloran, 1991) e a naftaleno dioxigenase (Sansseverino *et al.*, 1994) são capazes de oxidar diferentes substratos, mostrando que a maioria destas enzimas não apresenta uma especificidade restrita ao substrato. Elas podem oxidar compostos que apresentem estruturas moleculares semelhantes.

## ASPECTOS GENÉTICOS DA BIODEGRADAÇÃO

O material genético que codifica as informações essenciais para o desenvolvimento de um indivíduo está contido em seu cromossomo, enquanto os plasmídeos, moléculas de DNA circulares em fita dupla covalentemente ligadas e capazes de se replicarem independentemente do genoma bacteriano, geralmente codificam funções não essenciais à célula (Grinsted & Bennett, 1988). No entanto, os plasmídeos podem contribuir significativamente para a sobrevivência e o sucesso de uma bactéria no meio ambiente, carregando genes que codificam desde a resistência a metais e antibióticos e a produção de cápsulas (Irvin *et al.*,

1986), a infecção e nodulação em leguminosas (Grinsted & Bennett, 1988), até o catabolismo de compostos orgânicos (Frantz & Chakrabarty, 1986). Os genes que codificam a informação gênica para a síntese de enzimas catabólicas estão, geralmente, presentes nos chamados plasmídeos degradadores (Whellis, 1975; Chakrabarty 1976; Barbieri, 1990).

Os plasmídeos degradadores ocorrem naturalmente e variam em tamanho (15 a 500 kpb), podendo ser ou não transmissíveis. Essa mobilidade, via conjugação ou transformação, pode levar a uma ampliação da capacidade metabólica do organismo, devido ao potencial de recombinação gênica. Isso cria diferentes caminhos de reação em uma mesma célula bacteriana, conferindo, assim, uma vantagem seletiva desta no meio ambiente (Leahy & Cowell, 1990). A maioria desses plasmídeos pode ser mantida em uma mesma célula bacteriana, pertencendo, então, a grupos de incompatibilidade diferentes (Friello *et al.*, 1976).

Os plasmídeos degradadores contêm genes envolvidos na biodegradação de compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos alifáticos (Chakrabarty *et al.*, 1973) e aromáticos, como o bifenil, naftaleno, xileno e tolueno (Williams & Murray, 1974; Kiyohara *et al.*, 1983; Shields *et al.*, 1995) e produtos de seus metabolismos, como o benzoato e o salicilato (Nakazawa & Yabata 1977), hidrocarbonetos clorados, como o ácido 2,4-diclorofenóxidoacético e bifenilas policloradas (Kamp & Chakrabarty, 1979; Don & Pemberton, 1980), entre outros. Esses plasmídeos podem conter genes que codificam a via catabólica parcialmente, como por exemplo do naftaleno a salicilato (Connors & Barnsley, 1982), ou completamente, como a do tolueno (Kunz & Chapman, 1981). Quando o plasmídeo contém genes que codificam parcialmente a degradação de determinado composto, as outras enzimas necessárias para completar a via catabólica podem estar presentes em outro plasmídeo ou no cromossomo bacteriano. Por exemplo, o plasmídeo CAM contém genes que codificam o metabolismo da cânfora a isobutirato (Rheinwald *et al.*, 1973) enquanto a degradação de isobutirato aos intermediários dos ATCs estão presentes no cromossomo (Frantz & Chakrabarty, 1986). A via metabólica do naftaleno pode estar localizada inteiramente num plasmídeo ou pode conter partes codificadas no cromossomo. Geralmente, os genes que codificam as enzimas envolvidas na clivagem *meta* e *orto*-modificada estão presentes em plasmídeos (Frantz & Chakrabarty, 1987) enquanto os genes para a clivagem *orto*- estão localizados no cromossomo bacteriano (Zylstra *et al.*, 1989).

As enzimas codificadas pelos genes contidos nos plasmídeos degradadores são geralmente do tipo indutível. Na maioria dos casos relatados, as proteínas reguladoras são induzidas pelo substrato primário e

não pelo intermediário da via metabólica. O substrato se liga com o regulador para iniciar a transcrição do operon, que contém os genes que codificam as enzimas para a degradação daquele substrato (Burlage *et al.*, 1989). No entanto, esse modelo de indução é contrastante com aquele observado nas vias de degradação codificadas no cromossomo. Neste último caso, os genes que codificam a via *orto* são induzidos pelo intermediário da clivagem do anel aromático, o  $\beta$ -cetoacido (Ornston *et al.*, 1990). Quando a codificação da via metabólica está presente tanto no plasmídeo quanto no cromossomo e as vias *meta* e *orto* são induzidas simultaneamente, a expressão dos genes reguladores, no entanto, ocorre preferencialmente para a via *meta*, ou seja, daquela localizada no plasmídeo (Pettigrew *et al.*, 1991).

A regulação das vias catabólicas dos compostos aromáticos tem sido estudada mais intensamente para os plasmídeos CAM (contêm genes que codificam a degradação da cânfora), NAH e SAL (naftaleno e salicilato), TOL e XYL (tolueno e xileno) (Rheinwald *et al.*, 1973; Shapiro *et al.*, 1984; Schell, 1985; Yen & Serdar, 1988; Burlage *et al.*, 1989; Romero-Arroyo *et al.*, 1995) bem como para o catabolismo das bifênicas policloradas, cujos genes estão presentes tanto no cromossomo bacteriano (Furukawa *et al.*, 1989) quanto em plasmídeos (Carrington *et al.*, 1994). No entanto, na seqüência serão abordadas somente as regulações das vias metabólicas do tolueno (hidrocarboneto substituído com um anel aromático) e naftaleno (contém dois anéis aromáticos).

## METABOLISMO E REGULAÇÃO GÊNICA DA VIA CATABÓLICA DO TOLUENO

O tolueno, hidrocarboneto aromático contendo um grupo metílico como radical, pode ser utilizado por diferentes bactérias, através de duas rotas bioquímicas diferentes, isto é, por ataque enzimático direto no anel benzênico ou por ataque da cadeia lateral (Fig. 4). A clivagem direta do anel aromático, sem ataque prévio do grupo alquil, leva à formação de 3-metilcatecol como intermediário central, enquanto a oxidação da cadeia lateral, em primeiro lugar, gera o catecol como intermediário metabólico (Smith, 1990).

Existem numerosos artigos científicos que relatam a existência de enzimas, relacionadas com o catabolismo do tolueno, que são codificadas por genes presentes em plasmídeos, sendo TOL ou pWWO o mais conhecido e estudado. A maioria desses plasmídeos apresenta vias bioquímicas semelhantes e regiões do DNA homólogas ao pTOL (Williams & Worsey, 1976; Keil *et al.*, 1985; Williams & Sayers, 1994). Esse plasmídeo

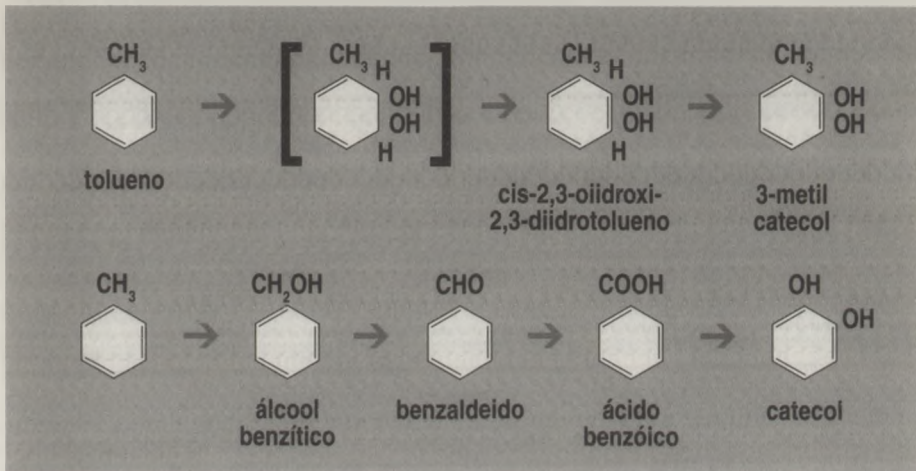


FIGURA 4. Principais rotas da biodegradação do tolueno por bactérias.

foi originalmente descrito em *P. putida* (*arvilla*) mt-2 por Williams & Murray (1974) e tem sido geralmente encontrado em diferentes espécies de *Pseudomonas* e em *Alcaligenes eutrophus* (Hughes *et al.*, 1984). Além da degradação do tolueno, esse plasmídeo contém genes que codificam a utilização de benzoato, *m*- e *p*-xileno e compostos relacionados (Kunz & Chapman, 1981) a acetaldeído e piruvato. O pTOL apresenta em torno de 117 kpb em tamanho, dos quais 40 kpb estão relacionados com a via catabólica e o processo de regulação da mesma. Além disso, o plasmídeo contém em seus genes um elemento de transposição (em torno de 56 kpb) contendo toda a via de degradação, cuja perda espontânea leva à inutilização da capacidade de degradação dos compostos referidos.

O tolueno é metabolizado pela *P. putida* mt-2, via clivagem *meta*, por genes presentes no plasmídeo TOL, e via *orto*, por genes do cromossomo bacteriano, ambas as vias induzidas por substratos diferentes.

Os genes catabólicos localizados em pWWO estão organizados em dois operons (Fig. 5) separados por 10 kpb. O operon *xylCAB* (OP1) é responsável pela via catabólica denominada superior, que codifica a degradação do tolueno e xileno a benzoato e *m*-toluato. A via metabólica inferior, codificada pelo operon *xyl* DLEGFJKIH (OP2), é requerida para a oxidação dos ácidos carboxílicos aromáticos para formar acetaldeído e piruvato (Harayma *et al.*, 1987). Somente algumas enzimas têm sido caracterizadas, sendo a catecol 2,3-dioxigenase (metapirocatase), produto do gene *xylE*, a mais conhecida. Essa enzima com peso molecular de 35 kDa contém quatro subunidades e requer ferro para sua atividade (Burlage *et al.*, 1989).

Dois genes reguladores *xylR* e *xylS*, transcritos de regiões promotoras diferentes, controlam positivamente a expressão gênica desses operons.

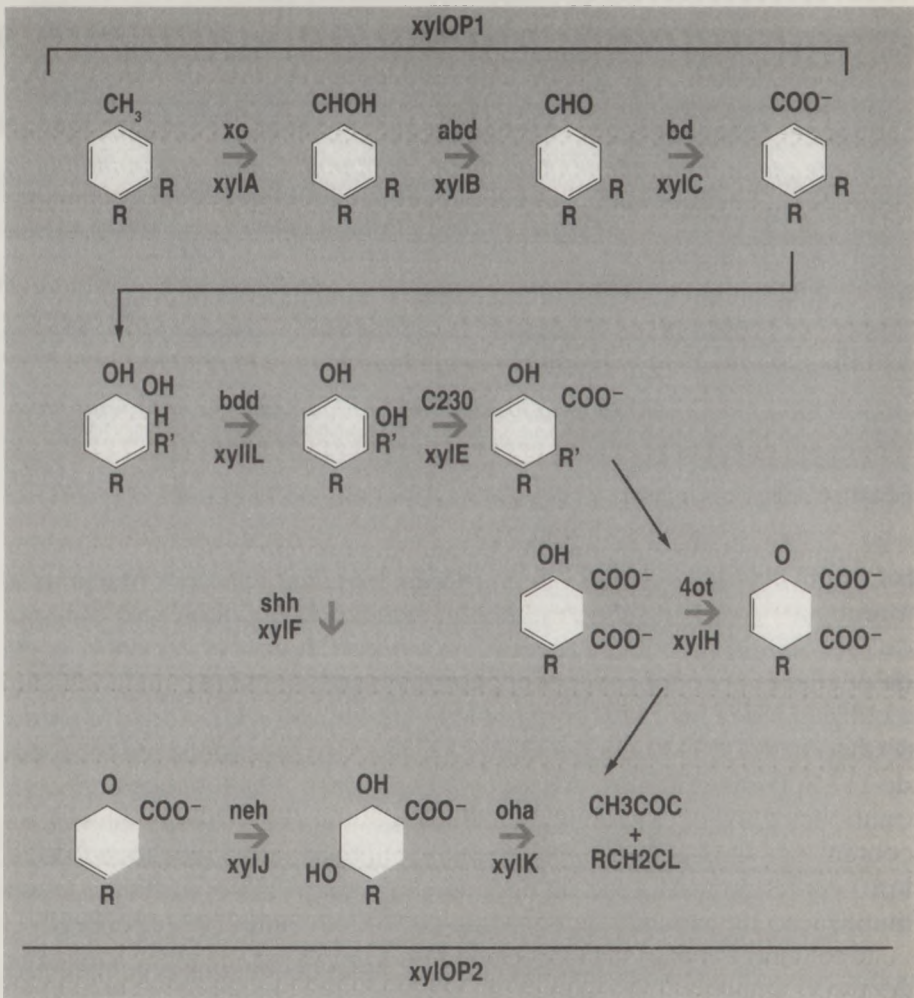


FIGURA 5. Via catabólica do tolueno codificada por genes presentes no plasmídeo TOL. Abreviações: **xo**: xileno dioxigenase; **abd**: álcool benzílico desidrogenase; **bd**: benzaldeído desidrogenase; **bdd**: benzoato diol desidrogenase; **C230**: tolueno dioxigenase; **shh**: semialdeído hidroximucônicohidrolase; **4 ot**: 4-oxalocrotonato tautomerase; **4 od**: 4-oxalocrotonato descarboxilase; **shh**: semialdeído hidroximucônico hidrolase; **neh**: 2-oxopenta-4-enoato hidrolase; **oha**: 2-oxo-4-hidroxipentanoato aldolase.

A proteína XylR apresenta em torno de 68 kDa, enquanto a XylS, 36,5 kDa. Na presença de tolueno, *m*-xileno e do álcool *m*-metil benzílico, XylR, que é constitutivamente expressa pela célula bacteriana e inibida pelo seu próprio produto, induz a expressão de ambos *xylCAB* e *xylS*. A ativação desses genes ocorre a nível transcricional e depende de um fator sigma, o qual permitirá que a RNA polimerase reconheça eficiente-



mente a região promotora desses genes. A via catabólica inferior será ativada na presença de *m*-toluato, o qual serve tanto de substrato quanto de indutor desta via. Ambos os produtos de *xylR* e *xylS* são requeridos para a expressão do operon OP2 (Nakazawa *et al.*, 1990). Tem sido observado, no entanto, que o benzoato pode ativar a expressão da via catabólica inferior sem a presença de nenhuma proteína regulatória, o que sugere o envolvimento de um regulador codificado por genes cromossômicos (Cushey & Sprenkle, 1988).

De acordo com várias informações obtidas (Inouye *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1987), há evidências de que o substrato (tolueno, *m*-xileno) penetra na célula bacteriana e combina com a proteína XylR, que é constitutivamente produzida (Fig. 6). Essa combinação causa uma mudança na conformação estrutural da proteína e ligação com o operon *xylCAB* (OP1). Isso proporciona o reconhecimento da região promotora do gene (Pu) pela RNA polimerase, que contém um fator sigma do tipo  $\sigma^{70}$  (Reznikoff *et al.*, 1985) com conseqüente expressão dos genes deste operon. A proteína XylR também se liga na região promotora do *xylS* (Ps), aumentando a produção de XylS. A indução da expressão do operon OP1, na presença de *m*-xileno, requer somente a presença de XylR, enquanto ambas, XylR e XylS, são requeridas para a expressão de OP2. A ativação do OP2 também tem sido observada somente por XylS, quando esta proteína é produzida em grande quantidade. A ligação de XylR na região promotora Pr leva à repressão de sua própria expressão. A transcrição dos operons OP1 e OP2 é geralmente ativada simultaneamente, eliminando intermediários tóxicos e evitando, assim, o acúmulo destes na célula.

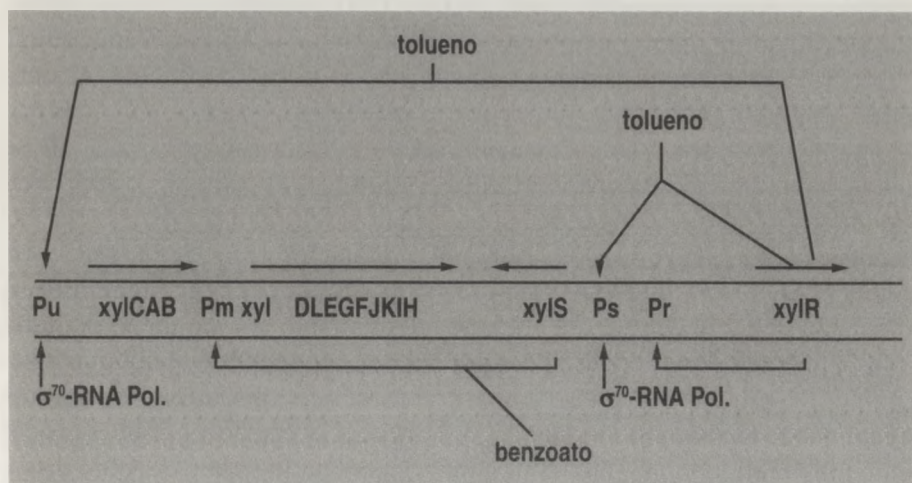


FIGURA 6. Modelo da regulação gênica do tolueno no plasmídeo pWWO.

Os genes para o catabolismo do tolueno em *P. putida* F1 estão localizados no cromossomo bacteriano em um único operon e são induzidos de maneira coordenada (Gibson *et al.*, 1990). A primeira enzima da via, a tolueno dioxigenase, que converte tolueno ao tolueno *cis*-diidrodiol, é codificada pelos genes *todC1C2BA*, enquanto as transformações posteriores da via são codificadas pelos genes *todFDEJ*. A tolueno dioxigenase, além de possuir uma ampla especificidade por diferentes substratos, podendo oxidar desde hidrocarbonetos benzênicos contendo diferentes substituições em seus radicais até hidrocarbonetos alifáticos, funciona também como uma monoxigenase (Wackett *et al.*, 1988). Apesar dos genes envolvidos no metabolismo deste composto já terem sido clonados e seqüenciados, seguindo a ordem *todFC1C2BADEJ* (Zylstra & Gibson, 1989), a localização dos genes envolvidos na conversão do catecol, nessa linhagem, via clivagem *meta*, ainda não foi descrita (Williams & Sayers, 1994).

A transformação do catecol (intermediário central do metabolismo do tolueno) até intermediários centrais do metabolismo celular, através da via do  $\beta$ -cetoadipato, tem sido amplamente descrita para *Acinetobacter calcoaceticus* e outras linhagens de *P. putida* (Orston *et al.*, 1990; Hough-ton *et al.*, 1995; Romero-Arroyo *et al.*, 1995). Entre os genes *cat*, presentes no cromossomo bacteriano de *Acinetobacter calcoaceticus*, que codificam a degradação de catecol através da via do  $\beta$ -cetoadipato, estão o *catA* (catecol 1,2-dioxigenase), que converte esse composto ao ácido *cis,cis*-mucônico (CCM), e o *catBCIJJD*, que codifica as enzimas envolvidas na transformação desse ácido aos intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Esses genes estão agrupados no cromossomo, em um único operon, com *catM* (ativador da expressão gênica dos genes *cat* em *trans*) e duas "Open Reading Frame" separando *catA* de *catBCIJFD* (Ornston & Neidle, 1991). A indução dos genes ocorre através da produção do ácido *cis,cis*-mucônico, resultante do metabolismo do benzeno ou compostos correlatos. A regulação dessa via provavelmente ocorre como descrito para os genes envolvidos no catabolismo do xileno, em que o indutor (neste caso CCM) se liga à proteína regulatória (CatM), alterando sua conformação e proporcionando a interação do complexo na região promotora do gene a ser expresso (*catB* e *catA*). No caso de CatM, há indícios de que sua ligação na região promotora promove uma envergadura do DNA, facilitando a interação da RNA polimerase e, conseqüentemente, a transcrição do gene *catB* (muconato lactoenzima). Como XylR, CatM se autorregula negativamente. Recentes evidências sugerem a existência de outros reguladores dessa via catabólica, além de CatM, já que a alteração na conformação dessa proteína afeta só parcialmente a expressão de *catA* e B. Além disso, linhagens que não apresentam *catM* não alteram a indutibilidade de *catA*

na presença de benzoato e CCM e nem metabolizam esses indutores (Romero-Arroyo *et al.*, 1995).

Em *P. putida*, as reações centrais da via catabólica do  $\beta$ -cetoadipato são também induzidas pela presença do ácido *cis*, *cis*-mucônico e estão codificadas por genes (*cat*BCA) distribuídos em agrupamentos. A proteína CatR é requerida para ativar a expressão dos genes *cat*BCA, a nível transcricional (Houghton *et al.*, 1995). O gene *catA*, cujo controle transcricional é independente dos demais genes, está localizado à direita do gene *catC*. A transcrição dos genes *cat*, que codificam as proteínas regulatórias CatM e CatR, ocorre em direção oposta aos demais genes. Ambas as proteínas, além de serem isofuncionais, apresentam intensa homologia com 45% da seqüência do DNA idêntica, sugerindo um ancestral comum para os genes que as codificam (Romero-Arroyo *et al.*, 1995).

Existem várias bactérias do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes, que utilizam o protocatecol por um sistema metabólico semelhante à via do  $\beta$ -cetoadipato de *P. putida*, para o catecol. Nesse sistema, os genes, denominados de *pca*, que codificam a degradação do protocatecol aos intermediários do ciclo ATC, estão distribuídos no cromossomo em quatro grupos distintos (Nichols & Harwood, 1995). Os genes *pca*HG (codificam a protocatecol 3,4-dioxigenase) são induzidos pelo protocatecol e os genes restantes (*pca*BDCEHGIJK), pelo  $\beta$ -cetoadipato. Uma proteína reguladora, codificada pelo gene *pcaR*, controla a expressão dos genes *pca*BDC, genes estes que codificam as enzimas b-carboximuconato lactonase,  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona hidrolase e g-carboximuconolactona descarboxilase, respectivamente (Hughes *et al.*, 1988). A proteína PcaR também controla a expressão dos genes *pca*IJ que codificam duas subunidades da  $\beta$ -cetoadipato: succinil coenzima A transferase (Parales & Harwood, 1993).

## BIODEGRADAÇÃO DO NAFTALENO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS

A rota da biodegradação do naftaleno, realizada por inúmeras espécies de bactérias, bem como os genes envolvidos nos diferentes passos desta via catabólica são mostrados na Fig. 7. Como na degradação de muitos outros compostos aromáticos policíclicos, o ataque inicial ao anel benzênico ocorre pela ação de dioxigenases, convertendo esse composto em naftaleno *cis*-diidrodíol. O composto resultante será convertido por uma desidrogenase em 1,2-dihidroxinaftaleno, seguindo-se a ação de uma dioxigenase para formar o ácido carboxílico 2-hidroxicromeno. Após vários passos enzimáticos envolvendo uma isomerase, uma aldolase

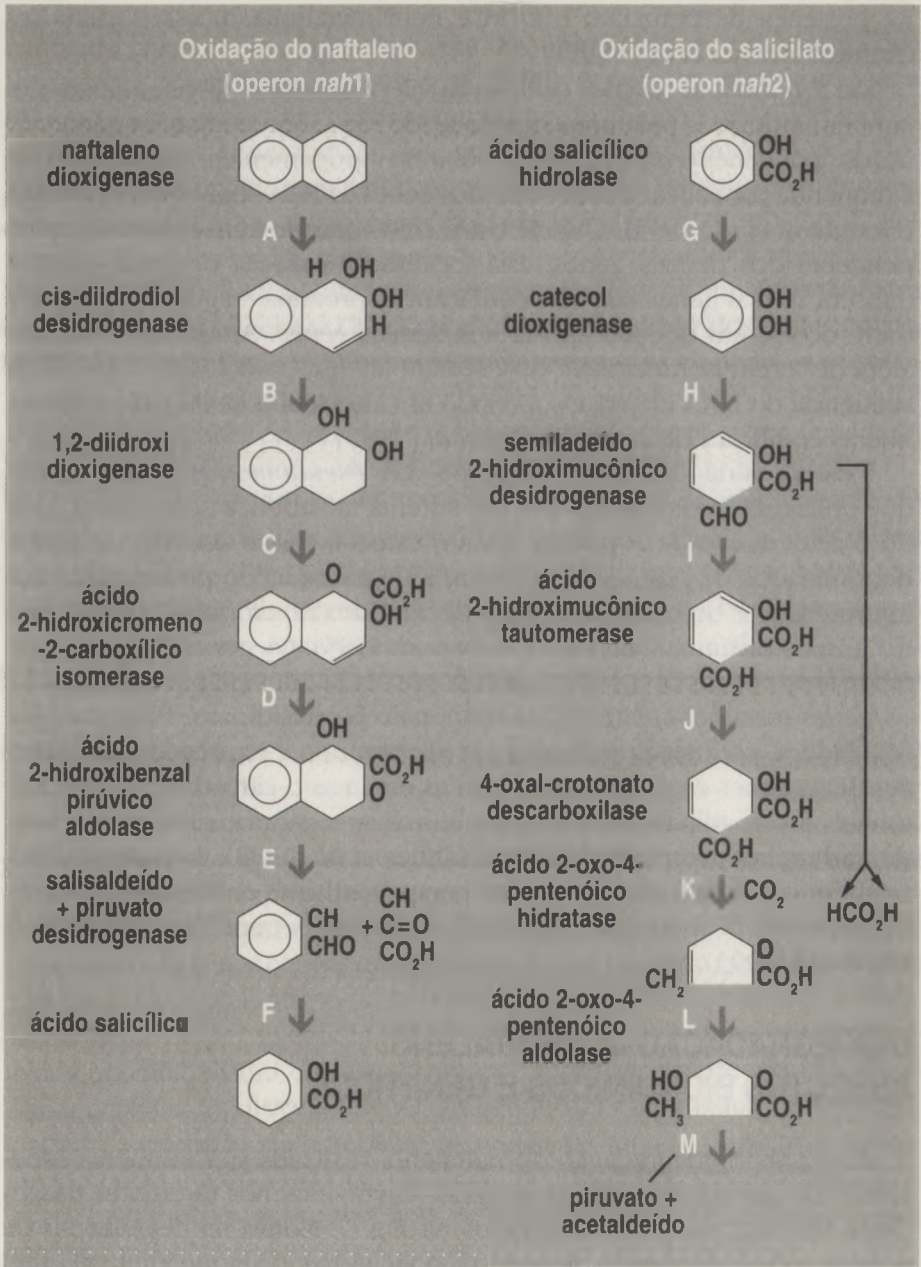


FIGURA 7. Descrição da via de degradação do naftaleno-salicilato contendo as enzimas e os genes que as codificam, para cada passo da reação.

e uma deshydrogenase, ocorrerá a formação do salicilato, o qual será des-carboxilado em catecol (Gibson & Subramanian, 1984). Posteriormente,

o catecol será convertido nos intermediários acetaldeído e piruvato. A formação de gentisato, durante o metabolismo do ácido salicílico e do naftaleno, no entanto, tem sido observada em *P. alcaligenes* e *P. fluorescens* (Monticello *et al.*, 1985; Yen & Sedar, 1988).

O catabolismo do naftaleno pelas *Pseudomonas* é codificado por genes presentes geralmente em plasmídeos, embora existam evidências indiretas da localização parcial da degradação em genes cromossômicos (Zuniga *et al.*, 1981). Inclusive, a conversão do naftaleno até catecol é codificada por genes plasmídeos, mas a transformação posterior do catecol, via clivagem *orto*, pode estar localizada no cromossomo bacteriano (Schell, 1990). Muitos plasmídeos degradadores de naftaleno já foram documentados (pWWO60-1, pNAH484, pNAH2 e 3 pDTG1, entre outros) sendo pNAH7 o mais caracterizado a nível molecular. Embora existam um polimorfismo significativo e diferenças metabólicas entre eles, resultados de experimentos de hibridização por Southern têm mostrado homologia entre os genes que codificam a degradação desse composto, entre os diferentes plasmídeos e o pNAH7. Além disto, os genes envolvidos no metabolismo do naftaleno a catecol são conservados no pNAH7, pSAL1, pWWO60-1 e pNAH484 (Barnsley, 1976; Schell, 1990).

A via metabólica codificada pelo plasmídeo pNAH7, originalmente isolado de *P. putida* PpG7 (Dunn & Gunsalus, 1973), na conversão do naftaleno via salicilato, envolve 14 passos enzimáticos (Davies & Evans, 1964). Essa via é codificada pelos genes *nab*, que estão organizados em 2 operons (*nab-1* e *nab-2* ou *sal*), controlados de maneira coordenada (Yen & Gunsalus, 1982). O primeiro operon inclui os genes *nab*ABCFDE, envolvidos na codificação da degradação de naftaleno a salicilato, enquanto o segundo operon inclui os genes *nab*GHINLK, que codificam a conversão de salicilato, via clivagem *meta* do catecol, a acetaldeído e piruvato. A inativação do operon *nab-1* gera um fenótipo Nah<sup>-</sup> Sal<sup>+</sup>, enquanto alterações no operon *sal* conferem um fenótipo Nah<sup>+</sup> Sal<sup>-</sup> à célula bacteriana. O operon 1 é transcrito a partir do gene *nabA* ao *nabF* e o operon 2, a partir de *nabG* a *nabK* (Yen & Sedar, 1988). A ativação dos operons *nab* e *sal* requer tanto a presença do indutor quanto do produto do gene regulador *nab* (NahR) e é regulada a nível de transcrição (Schell, 1985). Embora os dois operons sejam induzidos durante o crescimento da bactéria na presença de naftaleno, esse composto não é o indutor da via catabólica. Os dois indutores, nesse caso, são o salicilato e o ácido 2-aminobenzóico (Barnsley, 1975).

O envolvimento de um gene regulador no controle da expressão dos operons *nab* foi comprovado, através do isolamento de mutantes, obtidos por inserção do elemento de transposição Tn5 que apresentavam fenótipo Nah<sup>-</sup>Sal<sup>-</sup>. Essas mutações foram mapeadas numa região acima

do gene *nabG* e caracterizadas como de natureza pleiotrópica, recessiva e negativa, indicando que elas definiam um gene regulador, *nabR*, cujo produto é requerido para ativar estes operons, a nível transcricional. A transcrição de *nabR* (Fig. 8) ocorre em direção oposta à do *nabG*, e essa proteína reguladora é constitutivamente expressa na célula bacteriana, como foi descrito em outras vias catabólicas. A regulação da expressão gênica ocorre pela ligação de NahR (forma inativa) na região promotora dos genes *nab* ( $P_{nah}$  e  $P_{sal}$ ), via interação direta com alguns nucleotídeos. A ligação do indutor com a proteína ligada ao DNA leva provavelmente a uma alteração da estrutura protéica com o promotor ou com a RNA polimerase, resultando num aumento da transcrição desses operons. NahR é um membro de ativadores de transcrição da família LysR, encontrada tanto em plasmídeos quanto no cromossomo de diversas bactérias Gram-positivas e negativas (Schell & Sukordhaman, 1989).

Como o plasmídeo TOL, pNAH7 apresenta um elemento de transposição que contém um fragmento de 37,5 kbp, onde todos os genes *nab* estão inseridos (Tsuda, 1993). Transposons catabólicos têm sido também descritos na degradação de triclofenoxiacetato (Haughland *et al.*, 1990), clorobenzoato (Nakatsu *et al.*, 1991) e triclobenzenos (van der Meer *et al.*, 1991).

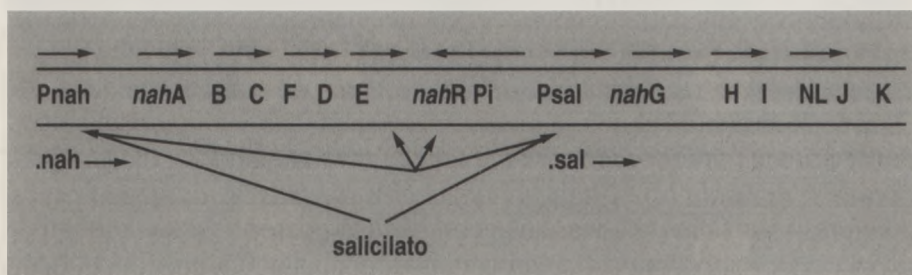


FIGURA 8. Representação esquemática dos genes envolvidos na degradação do naftaleno presentes no plasmídeo NAH7 (83 kb). As setas indicam a direção da transcrição dos genes *nab* e o início do operon nah (*nabA* a *nabE*) e do operon sal (*nabG* a *nabK*).

## CONCLUSÃO

Embora existam numerosos trabalhos publicados relatando a biodegradação de vários compostos aromáticos por microrganismos, a maioria dos dados obtidos é para bactérias. Somente nos últimos anos a oxidação desses compostos por algas e fungos tem merecido alguma atenção. Como foi observado, esses microrganismos são capazes de oxidar e até mesmo utilizar uma ampla variedade de compostos aromáticos como

fonte de carbono e energia. Portanto, a pesquisa, utilizando algas e fungos como biodegradadores de compostos aromáticos, é uma parte que merece continuidade.

A biodegradação de compostos aromáticos contendo até 3 anéis benzênicos tem sido observada e amplamente discutida na literatura. No entanto, é limitado o número de microrganismos que mineralizam os compostos orgânicos desta classe, contendo alto peso molecular, tais como benzo(a)pireno e criseno, que são extremamente recalcitrantes. Ademais, microrganismos capazes de utilizar compostos aromáticos mais persistentes e carcinogênicos, em potencial, precisam ser isolados e caracterizados.

Deve-se enfatizar que a maioria dos estudos até agora realizados utiliza um único substrato como fonte de carbono, dando pouca ênfase aos mecanismos envolvidos na biodegradação de misturas de poluentes orgânicos. Sabe-se ser improvável que no meio ambiente os microrganismos estejam em contato com um único hidrocarboneto aromático. Conseqüentemente, é mais provável que misturas desses compostos sejam encontradas. Estudos nessa direção têm sido levados adiante no Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (Barbieri, 1994; Molfetta & Barbieri, 1996).

Tem sido observado que alguns hidrocarbonetos aromáticos, quando presentes em misturas, são mais facilmente degradados (McCarty *et al.*, 1984; Barbieri, 1994) do que quando fornecidos individualmente como única fonte de carbono. No entanto, pouco se sabe do efeito da interação desses substratos sobre sua biodegradação quando presentes em misturas. Bauer & Capone (1988), investigando a biodegradação de misturas de aromáticos policíclicos, observaram que o naftaleno estimulava a degradação de fenantreno mas não de antraceno. Arvin *et al.* (1989), utilizando uma mistura de benzeno, tolueno e xileno, observaram que a presença de tolueno ou xileno estimulava a degradação de benzeno. Smith *et al.* (1991) detectaram uma inibição completa do crescimento de *Pseudomonas sp.*, quando inoculada na presença de uma mistura de bifenil e etilbenzeno, compostos totalmente utilizados quando fornecidos como único substrato. No entanto, resultado oposto foi obtido por Barbieri (1994), que observou várias linhagens bacterianas capazes de utilizar vários compostos aromáticos quando fornecidos na forma de mistura, sendo somente naftaleno e 2-metilnaftaleno individualmente degradados. Como foi verificado, nenhum destes grupos explica os mecanismos envolvidos no processo. Estudos nessa área são imprescindíveis, já que diversas indústrias e a agricultura anualmente liberam toneladas de compostos aromáticos, os quais persistem no meio ambiente, causando sérios danos ao mesmo e aos seres humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARVIN, E.; JENSEN, B.K.; GUNDERSEN, A.T. Substrate interactions during the aerobic degradation of benzene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.3221-3225, 1989.
- ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation - Bioremediation of Oil Spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.52, p.149-156, 1991.
- AUST, S.D. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbial Ecology**, v.20, p.197-209, 1990.
- BARBIERI, S.M. Regulation and expression of degradative plasmids in *Pseudomonas*. **Ciência e Cultura**, v.42, n.5/6, p.317-324, 1990.
- BARBIERI, S.M. Estudos da biodegradação de compostos aromáticos por linhagens bacterianas. São Carlos: UFSCar, 1994. 213p. Tese, Doutorado.
- BARNESLEY, E.A. Bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, p.1004-1008, 1975.
- BARNESLEY, E.A. Role and regulation of the *orto* and *meta* pathways of catechol metabolism in pseudomonads Metabolizing Naphthalene and Salicylate. **Journal of Bacteriology**, v.125, p.404-408, 1976.
- BARNESLEY, E.A. Bacterial Oxidation of Naphthalene and Phenanthrene. **Journal of Bacteriology**, v.153, p.1069-1071, 1983.
- BARNESLEY, E.A. Metabolism of 2,6-Dimethylnaphthalene by *Flavobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.428-433, 1988.
- BATIE, C.J.; LAHAIE, E.; BALLOU, D.P. Purification and Characterization of Phthalate Oxygenase and Phthalate Oxygenase Reductase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.1510-1518, 1987.
- BAUER, J.E.; CAPONE, D.G. Effects of Co-Occurring Aromatic Hydrocarbons on the Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediment Slurries. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1649-1655, 1988.
- BISAILLON, J.G.; LEPINE, F.; BEAUDET, R.; SYLVESTRE, M. Carboxylation of *o*-Cresol by an Anaerobic Consortium under Methanogenic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8, p.2131-2134, 1991.
- BOLDRIN, B.; TIEHM, A.; FRITZSCHE, C. Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a *Mycobacterium* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.6, p.1927-1930, 1993.
- BOLDT, Y.R.; SADOWSKY, M.J.; ELLIS, L.B.M.; QUE, JR., L.; WACKETT, L.P. A Manganese-Dependent Dioxxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 Belongs to the Major Extradiol Dioxxygenase Family. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.5, p.1225-1232, 1995.
- BRODERICK, J.B.; O'HALLORAN, T.V. Overproduction, Purification, and Characterization of Chlorocatechol Dioxxygenase. a Non-Heme Iron Dioxxygenase with Broad Substrate Tolerance. **Biochemistry**, v.30, p.7349-7358, 1991.
- BUMPUS, J.A. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.154-158, 1989.
- BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S.D. Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus. **Science**, v.228, p.1434-1436, 1985.
- BURLAGE, R.S.; HOOPER, S.W.; SAYLER, G.S. The TOL (pWWO) Catabolic Plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1323-1328, 1989.
- CARRINGTON, B.; LOWE, A.; WILLIAMS, P.A. The Lower Pathway Operon for Benzoate Catabolism in Biphenyl-Utilising *Pseudomonas* sp. Strain IC. **Microbiology**, v.140, p.499-508, 1994.



- CERNIGLIA, C.E. Aromatic Hydrocarbons: Metabolism by Bacteria, Fungi, and Algae. In HODGSON, E.; BEND, J.R.; PHILPOT, R.M., eds. **Reviews in Biochemical Toxicology**. New York: Elsevier/North Holland, 1981.
- CERNIGLIA, C.E. Initial Reactions in the Oxidation of Anthracene by *Cunninghamella elegans*. **Journal of General Microbiology**, v.128, p.2055-2061, 1982.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v.30, p.31-69, 1984.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Biodegradation**, v.3, p.351-368, 1992.
- CERNIGLIA, C.E.; CROW, S.A. Metabolism of Aromatic Hydrocarbons by Yeast. **Archives of Microbiology**, v.129, p.9-13, 1981.
- CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T. Metabolism of Naphthalene by Cell Extract of *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.363-370, 1977.
- CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T.; VAN BAALLEN, C. Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. **Journal of General Microbiology**, v.116, p.495-500, 1980.
- CERNIGLIA, C.E.; HEBERT, R.L.; DODGE, R.H.; SZANISZLO, P.J.; GIBSON, D.T. Fungal Transformation of Naphthalene. **Archives of Microbiology**, v.117, p.135-143, 1978.
- CERNIGLIA, C.E.; HEITKAMP, M.A. Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the Aquatic Environment. In: VARANASI, U., ed **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment** Boca Raton: CRC Press, 1989 p.41-68.
- CHAKRABARTY, A.M. Plasmids in *Pseudomonas*. **Annual Review of Genetics**, v.10, p.7-30, 1976.
- CHAKRABARTY, A.M.; CHOW, G.; GUNSALES, I.C. Genetic Regulation of Octane Dissimilation Plasmid in *Pseudomonas*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.70, p.1137-1140, 1973.
- CHAPMAN, P.J. **Degradation of Synthetic Organic Molecules in the Biosphere**. Washington, D.C.: National Academy of Science, 1972. p.17-55.
- CHAPMAN, P.J. Degradation Mechanisms. In: BOURQUIN, A.W.; PRITCHARD, P.H., ed **Proceedings of the Workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments**. Gulf Breeze: US Environmental Protection Agency, 1979. p.28-66.
- CHAUDHRY, G.R.; CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. **Microbiological Review**. v.55, p.59-79, 1991.
- CONNORS, M.A.; BARNESLEY, E.A. Naphthalene Plasmids in Pseudomonads. **Journal of Bacteriology**, v.149, p.1096-1101, 1982.
- CRAPEZ, M.A.C.; TOSTA, Z.T.; BISPO, M.G.S. Filtros Biológicos. **Ciência Hoje** v.1, n.58, p.1-11, 1989.
- CUSHEY, S.M.; SPRENKLE, A.M. Benzoate-Dependent Induction from the OP2 Operator-Promoter Region of the TOL Plasmid pWWO in the Absence of Known Plasmid Regulatory Genes. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.3742-3746, 1988.
- DAGLEY, S.A. Biochemical Approach to Some Problems of Environmental Pollution. **Essays Biochemistry**, v.11, p.81-138, 1975.
- DAVIES, J.L.; EVANS, W.C. Oxidative Metabolism of Naphthalene by Soil Pseudomonads. **Biochemistry Journal**. v.91, p.251-261, 1964.
- DEAN-RAYMOND, D.; BARTHA, R. Biodegradation of Some Polynuclear Aromatic Petroleum Compounds of Marine Bacteria. **Developments in Industrial Microbiology**, v.16, p.97-109, 1975.
- DIETRICH, D.; HICKEY, W.J.; LAMAR, R. Degradation of 4',4'-Dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.3904-3909, 1995.
- DON, R.H.; PEMBERTON, J.M. Properties of Six Pesticide Degradation Plasmids Isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v.145, p.681-686, 1980.
- DUA, R.D.; MEERA, S. Purification and Characterization of Naphthalene Oxygenase from *Corynebacterium renale*. **European Journal of Biochemistry**, v.120, p.461-465, 1981.

- DUNN, N.W.; GUNSALUS, I.C. Transmissible Plasmid Coding Early Enzymes of Naphthalene Oxidation in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v.114, p.974-979, 1973.
- EHRlich, G.G.; GOERLITZ, D.F.; GODSY, E. M.; HULT, M. F. Degradation of Phenolic Contaminants in Ground Water by Anaerobic Bacteria: St. Louis Park, Minnesota. **Ground Water** v.20, n.6, p.703-710, 1982.
- ELLIS, B.; HAROLD, P.; KRONBERG, H. Bioremediation of Creosote Contaminated Site. **Environmental Technology**, v.12, p.447-459, 1991.
- ENSLEY, B.D.; GIBSON, D.T. Naphthalene Dioxygenase: Purification and Properties of a Terminal Oxygenase Compounds. **Journal of Bacteriology**, v.155, p.505-511, 1983.
- EVANS, W.C.; FERNLEY, H.N.; GRIFFITS, E. Oxidative Metabolism of Phenanthrene and Anthracene by Soil Pseudomonads. **Biochemical Journal**, v.95, p.819-831, 1965.
- EVANS, W.C.; FUCHS, G. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds. **Annual Reviews of Microbiology**, v.42, p.289-317, 1988.
- FETZNER, S.; MÜLLER, R.; LINGENS, F. Purification and Some Properties of 2-Halobenzoate 1,2-Dioxygenase, a Two Component Enzyme System from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.279-290, 1992.
- FIELD, J.A.; DEJONG, E.; COSTA, G.F.; DEBONT, J.A.M. Biodegradation of Polycyclic Hydrocarbons by New Isolates of White Rot Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2219-2226, 1992.
- FOGHT, J.M.; WESTLAKE, D.W.S. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aromatic Heterocycles by a *Pseudomonas* Species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.34, p.1135-1141, 1988.
- FORTNAGEL, P.; HARMS, H.; WITTICH, R.M.; KROHN, S.; MEYER, H.; SINNWELL, V.; WILKES, H.; FRANCKE, W. Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1148-1156, 1990.
- FRANTZ, B.; CHAKRABARTY, A.M. Degradative Plasmids in *Pseudomonas*. In: SOKATCH, J.R.; ORNSTON, L.N., ed. **The Bacteria: a Treatise on Structure and Function**. Orlando: Academic Press, 1986. p.257-555.
- FRANTZ, B.; CHAKRABARTY, A.M. Organization and Nucleotide Sequence Determination of a Gene Cluster Involved in 3-Chlorocatechol Degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, p.4460-4460. 1987.
- FRIELLO, D.A.; MYLROE, J.R.; GIBSON, D.T.; ROGERS, J.E.; CHAKRABARTY, A.M. Xyl, a Nonconjugative Xylene Degradative Plasmid in *Pseudomonas pxy*. **Journal of Bacteriology**, v.127, p.1217-1224, 1976.
- FURUKAWA, K.; HAYASE, N.; TAIRA, K.; TOMIKUSA, N. Molecular Relationship of Chromosomal Genes Encoding Biphenyl/Polychlorinated Biphenyl Catabolism: Some Bacteria Possess a Highly Conserved *bph* Operon. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.5467-5472, 1989.
- GIBSON, D.T. **Microbial Degradation of Organic Compounds**. New York: Marcel Dekker, 1984, p.181-294.
- GIBSON, D.T.; SUBRAMANIAN, V. Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In: GIBSON, D.T., ed. **Microbial Degradation of Organic Compounds**. New York: Marcel Dekker, 1984. p 181-252.
- GIBSON, D.T.; ZYLSTRA, G.J.; CHAUHAN, S. Biotransformations Catalyzed by Toluene Dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. In: SILVER, S.; CHAKRABARTY, m.; IGLEWSKI, B.; KAPLAN, S. ed., *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1990. p121-133.
- GIBSON, D.T.; CRUDE, D.L.; HADDOCK, J.D.; ZYLSTRA, G.J.; BRAND, G.M. Oxidation of Polychlorinated Biphenyls by *Pseudomonas* sp. Strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.14, p.4561-4564, 1993.
- GHOSH, D.K.; DUTTA, D.; SAMANTA, T.B.; MISHRA, A.K. Microsomal Benzofalpyrene Hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Assay and Characterization of the Enzyme System. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.113, p.497-505, 1983.

- GOODSY, E.M.; GOERLITZ, D.F.; EHRLICH, G.G. Methanogenesis of Phenolic Compounds by a Bacterial Consortium from a Contaminated Aquifer in St. Louis Park, Minnesota. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.30, p.261-268, 1983.
- GRIFOLL, M.; CASELLAS, M.; BAYONA, J.M.; SOLANAS, A. Isolation and Characterization of a Fluorene-Degrading Bacterium: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, n.9, p.2910-2917, 1992.
- GRIMBERG, S.J.; AITKEN, M.D. Biodegradation Kinetics of Phenanthrene Solubilized in Surfactant Micelles. In: HINCHEE, R.E.; BROCKMAN, F.J.; VOGEL, C.M. ed. **Microbial Process for Bioremediation**. Columbus: Battelle Press, 1995. p.59-66.
- GRINSTED, J.; BENNETT, M. **Plasmid Technology** 2 ed. London: Academic Press, 1988, 333p.
- GROSSER, R.J.; WARSHAWSKY, D.; VESTAL, J.R. Indigenous and Enhanced Mineralization of Pyrene, Benzol[*a*]pyrene, and Carbazole in Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, n.12, p.3462-3469, 1991.
- GRUND, E.; DENEKE, B.; EICHENLAUB, R. Naphthalene Degradation Via Salicylate and Gentisate by *Rhodococcus* sp. Strain B4. **Applied Environmental Microbiology**. v.58, n.6, p.1874-1877, 1992.
- GUERIN, W.F.; JONES, G.E. Mineralization of Phenanthrene by a *Mycrobacterium* sp. **Applied Environmental Microbiology**. v.54, p.937-944, 1988.
- HADDOCK, J.D.; GIBSON, D.T. Purification and Characterization of the Oxygenase Component of Biphenyl 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400. **Journal of Bacteriology**. v.177, n.20, p.5834-5839, 1995.
- HAIGLER, B.E.; GIBSON, D.T. Purification and Properties of Ferredoxin NAP, a Component of Naphthalene Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816. **Journal of Bacteriology**. v.172, p.465-468, 1990.
- HAMMEL, K.E.; GREEN, B.; GAI, W.Z. Ring Fission of Anthracene by a Eukaryote. **Proceedings of National Academy of Sciences**. USA, v.88, p.10605-10608, 1991.
- HAMMEL, K.E.; GAI, W.Z.; GREEN, B.; MOEN, M.A. Oxidative Degradation of Phenanthrene by the Lignolytic Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**. v.58, p.1831-1838, 1992.
- HARAYAMA, S.; REKIK, M.; WASSERFALLEN, A.; BAIROCH, A. Evolutionary Relationship Between Catabolic Plasmid for Aromatics: Conservation of the Gene Order and Nucleotide Sequences of Catechol Oxidation Genes of pWVO and NAH7. **Molecular and General Genetics**. v.210, p.241-247, 1987.
- HAUGHIAND, R.A.; SANGODKAR, U.M.; CHAKRABARTY, A.M. Repeated Sequences Including RS1100 from *Pseudomonas cepacia* AC1100 Function as IS Elements. **Molecular and General Genetics**, v.220 p.222-228, 1990.
- HEGEMAN, G. The Mineralization of Organic Materials Under Aerobic Conditions. In: LEADBETTER, E.R.; POINDEXTER, J.S. ed **Bacteria in Nature**. New York: Plenum Press, 1985. p.97-112
- HEITKAMP, M.A.; FREEMAN, J.P.; CERNIGLIA, C.E. Naphtalene Biodegradation in Environmental Microsoms: Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, p.129-136, 1987.
- HEITKAMP, M.A.; CERNIGLIA, C.E. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Bacterium Isolated from Sediment Below an Oil Field. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.1612-1614, 1988.
- HEITKAMP, M.A.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C.E. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.10, p.2549-2555, 1988.
- HOUGHTON, J.E.; BROWN, T.M.; APPEL, A.J.; HUGHES, E.J.; ORNSTON, N. Discontinuities in the Evolution of *Pseudomonas putida* cat Genes. **Journal of Bacteriology**. v.177, n.2, p.401-412, 1995.
- HUGHES, E.J.L.; BAYLY, R.C.; SKURRAY, R.A. Characterization of a TOL-Like Plasmid from *Alcaligenes eutrophus* that Controls Expression of a Chromosomally Encoded *p*-Cresol Pathway. **Journal of Bacteriology**. v.158, p.73-78, 1984.

- HUGHES, E.J.; SHAPIRO, M.K.; HOUGHTON, J.E.; ORSTON, L.N. Cloning and Expression of *pca* Genes from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.2877-2887.
- INOUE, A.; HORIKOSHI, K.A. *Pseudomonas* Thrives in High Concentrations of Toluene. **Nature**, London, v.338, p.264-266, 1989.
- INOUE, S.; NAKAZAWA, A.; NAKAZAWA, T. Overproduction of the *xyIS* Gene and Activation of the *xyiD*LEGF Operon of the TOL Plasmid. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.3587-3592, 1987.
- IRVINS, B.E.; EZZEL, J.W.; JEMSKI, J.; HEDLUND, K.W.; RISTROPH, J.D.; LEPLA, S.H. **Infection Immunology**, v.52, p.454-458, 1986.
- JEFFREY, A.M.; YEH, H.J.C.; JERINA, D.M.; PATEL, T.R.; DAVEY, J.F. GIBSON, D.T. Initial Reactions in the Oxidation of Naphthalene by *Pseudomonas putida*. **Biochemistry**, v.14, p.575-584, 1975.
- JONES, K.C.; STRATFORD, A.; WATERHOUSE, K.S.; VOGT, N.B. Organic Contaminants in Welsh Soils: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. **Environmental Science Technology**, v.13, p.540-550, 1989.
- KAMP, P.F.; CHAKRABARTY, A.M. Plasmids Specifying *p*-Chlorobiphenyl Degradation in Enteric Bacteria. In: TIMMIS, R.; PUHLES, A. **Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance**. New York: Elsevier, 1979. p.271
- KEIL, H.; LEBENS, M.R.; WILLIAMS, P.A. TOL Plasmid pWW15 Contains Two Nonhomologous, Independently Regulated Catechol 2,3-Dioxygenase Genes. **Journal of Bacteriology**, v.163, p.248-255, 1985.
- KEITH, L.H.; TELLIARD, W.A. Priority Pollutants I: A Perspective View. **Environmental Science and Technology**, v.13, p.416-423, 1979.
- KEUTH, S.; REHM, H.J. Biodegradation of Phenanthrene by *Arthro bacter polychromogenes* Isolated from a Contaminated Soil. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.34, p.804-808, 1991.
- KIYOHARA, H.; SUGIYAMA, M.; MONDELLO, F.J.; GIBSON, D.T.; YANO, K. Plasmid Involvement in the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a *Beijerinckia* Species. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.111, p.939-945, 1983.
- KUNZ, D.A.; CHAPMAN, P.J. Isolation and Characterization of Spontaneously Occurring TOL Plasmid Mutants of *Pseudomonas putida* HS1. **Journal of Bacteriology**, v.146, p.952-964, 1981.
- KURITZ, T.; WOLK, C.P. Use of Filamentous Cyanobacteria for Biodegradation of Organic Pollutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.234-238, 1995.
- LA FLAMME, R.E.; HITES, R.A. The Global Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Geochemical Cosmochemical Acta**, v.42, p.289-303, 1984.
- LANTZ, S.; LIN, J.E.; MUELLER, J.G.; PRITCHARD, P.H. Effects of Surfactantes on Fluoranthene Mineralization by *Sphingomonas paucimobilis* Strain EPA 505. In: HINCHEE, R.E.; BROGMAN, F.J.; VOGEL, C.M., ed., **Microbial Process for Bioremediation**. Columbus: Battelle Press, 1995. p.7-14.
- LEAHY, J.G.; COWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, v.54, p.305-315, 1990.
- LJINSKY, W. The Formation and Occurrence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Associated with Food. **Mutational Research**, v.259, p.251-261, 1991.
- LJINSKY, W.; DOMSKY, I.; MASON, G.; RAMAHI, H.Y.; SAFAVI, T. The Chromatografic Determination of Trace Amounts of Polynuclear Hydrocarbons in Petrolatum, Mineral Oil, and Coal Tar. **Analytical Chemistry**, v.35, p.952-956, 1963.
- LIU, Z.; JACOBSON, A.M.; LUTHY, R.G. Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.145-151, 1995.
- McCARTY, P.L.; RITTMAN, B.E.; BOUWER, E.J. Microbial Process Affecting Chemical Transformation in Groundwater. In: BITTON, G.; GERBA, C.P., ed. **Groundwater Pollution Microbiology**. New York: John Wiley, 1984. p.89-115.
- MAHAFFEY, W.R.; GIBSON, D.T.; CERNIGLIA, C.E. Bacterial oxidation of Chemical Carcinogens: Formation of Polycyclic Aromatic Acids from Benz[*a*]anthracene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.10, p.2415-2423, 1988.

- MARKUS, A.; KREKEL, D. LINGENS, F. Purification and Some Properties of Component A of the 4-Chlorophenylacetate 3,4-Dioxygenase from *Pseudomonas* Species Strain CBS. **Journal of Biological Chemistry**, v.261, p.12883-12888, 1986.
- MASON, J.R. Oxygenase Catalyzed Hydroxylation of Aromatic Compounds: Simple Chemistry by Complex Enzymes. **International Industrial Biotechnology**, v.8, p.19-24, 1988.
- MASON, J.R.; CAMMACK, R. The Electron-Transport Proteins of Hydroxylating Bacterial Dioxygenases. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.277-305, 1992.
- MIHELICIC, J.R.; LUTHY, R.G. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds Under Various Redox Conditions in Soil-Water Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.5, p. 1182-1187, 1988.
- MOLFETTA, J.B.; BARBIERI, S.M. Caracterização Genética e Bioquímica de uma Linhagem de *Pseudomonas putida* Degradadora de Compostos Aromáticos. São Carlos: UFSCar, 1996. Dissertação, Mestrado.
- MONTICELLO, D.J.; BAKKER, D.; SCHELL, M.; FINNERTY, W.R. Plasmid-Borne Tn5 Insertion Mutation Resulting in Accumulation of Gentisate from Salicylate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.761, 1985.
- MORGAN, P.; LEWIS, S.T.; WATKINSON, R.J. Comparison of Abilities of White-Rot Fungi to Mineralize Selected Xenobiotic Compounds. **Applied Microbiological Technology**, v.34, p.693-696, 1991.
- MORGAN, P.; WATKINSON, R.J. Hydrocarbon Degradations in Soils and Methods for Soil Biotreatment. **Critical Reviews Biotechnology**, v.8, p.305-333, 1989.
- MUELER, J.G.; CHAPMAN, P.J.; PRITCHARD, P.H. Creosote-Contaminated Sites - Their Potential for Bioremediation. **Environmental Science Technology**, v.23, p.1197-1201, 1989a.
- MUELER, J.G.; CHAPMAN, P.J.; PRITCHARD, P.H. Action of Fluoranthene-Utilizing Bacterial Community on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Components of Creosote. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.3085-3090, 1989b.
- MUELLER, J.G.; CHAPMAN, P.J.; BLATTMANN, B.O.; PRITCHARD, P.H. Isolation and Characterization of a Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1079-1086, 1990.
- NAKATSU, C.; NG, J.; SINGH, R.; STRAUS, N.; WYNDHAM, C. Chlorobenzoate Catabolic Transposon Tn5271 is a Composite Class I Element with Flanking Class II Insertion Sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.88, p.8312-8316, 1991.
- NAKAZAWA, T.; INOUE, S.; NAKAZAWA, A. Regulatory System for Expression of *xyl* Genes on the TOL Plasmid. In: SILVER, S., CHAKRABARTY, B., IGLEWSKI, B., KAPLAN, S., ed. *Pseudomonas: Bioransformation, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1990. p.133-141.
- NAKAZAWA, T.; YABATA, T. Isolation of a Mutant TOL Plasmid with Increased Activity and Transmissibility From *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.39-46, 1977.
- NARRC, M.L.; CERNIGLIA, C.E.; BAALLEN, C.V.; GIBSON. Metabolism of Phenanthrene by the Marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1351-1359, 1992.
- NEIDLI, E.L.; HARTNETT, C.; ORNSTON, L.N.; BAIROCH, A.; REKIK, M.; HARAYAMA, S. Nucleotide Sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC Genes for Benzoate 1,2-Dioxygenase Reveal Evolutionary Relationship among Multicomponent Oxygenases. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.5:85-5395, 1991.
- NICHOLS, N.N.; HARWOOD, C. S. Repression of 4-Hydroxybenzoate Transport and Degradation by Benzoate: A New Layer of Regulatory Control in the *Pseudomonas putida* b-Ketoadipate Pathway. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.24, p.7033-7040, 1995.
- OMOR, T. Biodegradation of Carbazole and Related Compounds. In: HINCHEE, R.E.; ANDERSON, D.B.; Hoepfel, R.E., ed. **Bioremediation of Recalcitrant Organics**. Columbus: Battelle Press, 1995. p.209-216.

- ORNSTON, L.N.; HOUGHTON, J.; NEIDLE, E.L.; GREGG, L. A. Subtle Selection and Novel Mutation During Evolutionary Divergence of the  $\beta$ -Ketoacid Pathway. In: SILVER, S.; CHAKRABARTY, A.M.; IGLEWSKI, B.; KAPLAN, S., ed. **Pseudomonas: Biotransformation, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology**. Washington: ASM, 1990. p.207-225.
- ORNSTON, L.N.; NEIDLE, E.L. Evolution of the Genes for the  $\beta$ -Ketoacid Pathway in *Acinetobacter calcoaceticus*. In: TOWNER, K.J.; BERGOGNE-BEREZIN, E.; FEWSON, C.A., ed. **The Biology of Acinetobacter**. New York: Plenum Press, 1991. p.201-237.
- PARALES, R.E.; HARWOOD, C.S. Construction and Use of a New Broad-Host-Range *lacZ* Transcriptional Fusion Vector, pHR309, for Gram- Bacteria. **Gene**, v.133, p.23-30, 1993.
- PATEL, T.J.; GIBSON, D.T. Purification and Properties of (+) cis-Naphthalene Dihydrodiol Dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v.119, p.879, 1974.
- PETTIGREW, C.A.; HAIGLER, B.E.; SPAIN, J.C. Simultaneous Biodegradation of Chlorobenzene and Toluene by a *Pseudomonas* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.157-162, 1991.
- POTHULURI, J.V.; FREEMAN, J.P.; EVANS, F.E.; CERNIGLIA, C.E. Fungal Metabolism of Acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3654-3659, 1992a.
- POTHULURI, J.V.; HEFLICH, R.H.; FU, P.P.; CERNIGLIA, C.E. Fungal Metabolism and Detoxification of Fluoranthene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.937-941, 1992b.
- QUE, L.; WIDOM, J.; CRAWFORD, R.L. 3,4-Dihydroxyphenylacetate 2,3-Dioxygenase: a Manganese(II)Dioxygenase from *Bacillus brevis*. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, p.10941-10944, 1981.
- RAMANAND, K.; SUFLITA, J.M. Anaerobic Degradation of *m*-Cresol in Anoxic Aquifer Slurries: Carboxylation Reactions in a Sulfate-Reducing Bacterial Enrichment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.6, p.1689-1695, 1991.
- RAMOS, J-L.; MERMOD, N.; TIMMIS K. N. Regulatory Circuit Controlling Transcription of TOL Plasmid Operon Encoding *meta*-Cleavage Pathway for Degradation of Alkylbenzenes by *Pseudomonas*. **Molecular Microbiology**, v.1, p.293-300, 1987.
- REINEKE, W.; KNACKMUSS, H.J. Microbial Degradation of Haloaromatics. **Annual Review of Microbiology**, v.42, p.263-287, 1988.
- REZNIKOFF, W.S.; SIEGELE, D.A.; COWING, D.W.; GROSS, C.A. The Regulation of Transcription Initiation in Bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.19, p.355-387, 1985.
- RHEINWALD, G.; CHAKRABARTY, A.M.; GUNSALUS, I.C.A. Transmissible Plasmid Controlling Camphor Oxidation in *Pseudomonas putida*. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.70, p.885-889, 1973.
- ROMERO-ARROYO, C.E.; SCHELL, M.A.; GAINES III, G.L.; NEIDLE, E. L. *catM* Encodes a LysR-Type Transcriptional Activator Regulating Catechol Degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.20, p.5891-5898, 1995.
- RYU, B.H.; OH, Y.K.; BIN, J.H. Biodegradation of Naphthalene by *Acinetobacter calcoaceticus* R-88. **Journal of the Koryan Agriculture Chemical Society**, v.32, p.315-320, 1989.
- SCHELL, M.A. Transcription Control of the *nab* and *sal* Hydrocarbon Degradation Operons by the *nabR* Gene Product. **Gene**, v.36, p.301-309, 1985.
- SCHELL, M.A. Regulation of the Naphthalene Degradation Genes of Plasmid NAH7: Example of a Generalized Positive Control System in *Pseudomonas* and Related Bacteria. In: SILVER, S.; CHAKRABARTY, A.M.; IGLEWSKI, B.; KAPLAN, S., ed. **Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1990. p.165-176.
- SCHELL, M.A.; SUKORDHAMAN, M. Evidence that the Transcription Activator Encoded by *Pseudomonas putida nabR* Gene is Evolutionary Related to the Transcription Activators Encoded by the *Rhizobium nodD* Genes. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.1952-1959, 1989.
- SCHOCKEN, M.J.; GIBSON, D.T. Bacterial Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Acenaphthene and Acenaphthylene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.191-206, 1984.

- SHAPIRO, J.A.; OWEN, D.J.; KOK, M.; EGGINK, G. Degradative Plasmid in *Pseudomonas*. In: OMENN, G.S., HOLLAENDER, A., ed. **Genetic Control of Environmental Pollutants**. New York: Plenum Press, 1984. p.229.
- SHIELDS, M.S.; REAGIN, M.J.; GREGER, R.R.; CAMPBELL, R.; SOMERVILLE, C. TOM, a New Aromatic Plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1352-1356, 1995.
- SIMPSON, H.D.; GREEN, J.; DALTON, H. Purification and Some Properties of a Novel Heat-Stable *cis*-Toluene Dihydrodiol Dehydrogenase. **Biochemistry Journal**, v.244, p.585-590, 1987.
- SIMS, J.L.; SIMS, R.C.; MATTHEWS, J.E. Approach to Bioremediation of Contaminated Soil. **Hazardous Waste Hazardous Material**, v.7, p.117-149, 1990.
- SMITH, M.R. The Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Biodegradation**, v.1, p.191-206, 1990.
- SMITH, M.R.; EWING, M.; RATLEDGE, C. The Interactions of Various Aromatic Substrates Degraded by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643: Synergistic Inhibition of Growth by Two Compounds which Serves as Growth Substrate. In: RATLEDGE, C. ed. **Physiology of Biodegradative Microorganisms**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.203.
- STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L. **The Microbial World** 5 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1986. 689p.
- STRINGFELLOW, W.T.; Chen, S.H., AITKEN, M.D. Induction of PAH Degradation in a Phenanthrene Degrading *Pseudomonas*. In: HINCHEE, R.E.; BROCKMAN, F.J.; VOGEL, C.M. ed. **Microbial Process for Bioremediation**. Columbus: Battelle Press, 1995. p. 83-89.
- SUTHERLAND, J.B.; SELBY, A.L.; FREEMAN, J.P.; FU, P.P.; MILLER, D.W.; CERNIGLIA, C.E. Identification of Xylosides Conjugates Formed from Anthracene by *Rhizoctonia solani*. **Mycology Research**, v.96, p.509-517, 1992.
- TSUDA, M. Catabolic Transposons in *Pseudomonas*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETIC ENGINEERING & BIOTECHNOLOGY, 2., 1993. Proceedings.
- VAN DER MEER, J.R; EGGEN, R. I. L.; ZEHNDER, A.J.B.; de VOS, W.M. Sequence Analysis of the *Pseudomonas* sp. Strain P51 *tcb* Gene Cluster, which Encodes Metabolism of Chlorinated Catechols: Evidence for Specialization of Catechol 1,2-Dioxygenases for Chlorinated Substrates. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.2425-2434, 1991.
- VECHT, S.E.; PLATT, M.W.; ER-EL, Z.; GOLDBERG, I. The Growth of *Pseudomonas putida* on *m*-Toluic Acid and on Toluene in Batch and Chemostat Cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.587-592, 1988.
- VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; van ANDEL, J.G. Effect of Microorganisms on the Bioavailability and Biodegradation of Crystalline Naphthalene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.535-540, 1993.
- WACKETT, L.P.; KWART, L.D.; GIBSON, D.T. Benzylic Monooxygenation Catalyzed by Toluene Dioxygenase from *Pseudomonas putida*. **Biochemistry**, v.27, p.1360-1367, 1988.
- WALTER, U.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM, H.J. Degradation of Pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.671-676, 1991.
- WARSHAWSKY, D.; KEENAN, T.M.; REILMAN, R.; CODY, T.; RADIKE, M. J. Conjugation of Benzofalpyrene Metabolites by the Freshwater Green Algae *Selenastrum capricornutum*. **Chemical Biological Interaction**, v.73, p.93-105, 1990.
- WEISSENFELS, W.D.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM, H.J. Microbial Metabolism of Fluoranthene: Isolation and Identification of Ring Fission Products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.528-535, 1991.
- WEST, P.A.; OKPOKWASILI, G.C.; BRAYTON, P.R.; GRIMES, D.J.; COWELL, R.R. Numerical Taxonomy of Phenanthrene-Degrading Bacteria Isolated from the Chesapeake Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.988-993, 1984.
- WHELLIS, M.L. The Genetics of Dissimilatory Pathways in *Pseudomonas*. **Annual Review of Microbiology**, v.29, p.505-524, 1975.

- WILLIAMS, P.A.; MURRAY, K. Metabolism of Benzoate and the Methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the Existence of a TOL Plasmid. **Journal of Bacteriology**, v.120, p.416-423, 1974.
- WILLIAMS, P.A.; SAYERS, J.R. The Evolution of Pathways for Aromatic Hydrocarbon Oxidation in *Pseudomonas*. **Biodegradation**, v.5, p.195-217, 1994.
- WILLIAMS, P.A.; WORSEY, M.J. Ubiquity of Plasmids in Coding for the Toluene and Xylene Metabolism in Soil Bacteria: Evidence for the Existence of a TOL Plasmid. **Journal of Bacteriology**, v.125, p.818-828, 1976.
- YEA, W.K.; GIBSON, D.T.; T.N.; LIU. Toluene Dioxygenase: a Multicomponent Enzyme System. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.78, p.401-410, 1977.
- YEN, K.M.U.; GUNSALUS, I.C. Plasmid Gene Organisation: Naphthalene/Salicylate Oxidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.79, p.874-878, 1982.
- YEN, K.M.U, SERDAR, C.M. Genetics of Naphtalene Catabolism in *Pseudomonas*. **CRC Critical Reviews of Microbiology**, v.15, p.247-269, 1988.
- ZUNIGA, M.C.; DURHAM, D.R.; WELCH, R.A. Plasmid- and Chromosome-Mediated Dissimilation of Naphthalene and Salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1. **Journal of Bacteriology**, v.147, p.836, 1981.
- ZYLSTRA, G.J.; GIBSON, D.T. Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1-Nucleotide Sequence of the *todC1C2BADE* Genes and their Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.14940-14946, 1989.



# 11

## BIODEGRADAÇÃO DE ORGANOCORADOS NO SOLO POR BASIDIOMICETOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Vera Lúcia Ramos Bononi

Instituto de Botânica

Caixa Postal 4005, CEP 01061-070

São Paulo, SP

### OS BASIDIOMICETOS LIGNOCELULOLÍTICOS NA NATUREZA

Na natureza, os basidiomicetos lignocelulolíticos crescem principalmente sobre madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal. Geralmente sapróbios, ocasionalmente podem ser fitopatógenos, ocorrem praticamente em todos os ecossistemas naturais e modificados, sendo mais abundantes em áreas com maior concentração de árvores mortas ou disponibilidade de resíduos agrícolas. Algumas espécies apresentam certo grau de especificidade e dependem da ocorrência de um substrato definido. Outras, menos exigentes, ocorrem sobre diversos substratos e possuem ampla distribuição geográfica.

Nos países europeus, os fungos em geral são mais conhecidos e algumas espécies recebem nomes populares. No Brasil, a falta de conhecimento é uma realidade e muitas espécies diferentes são popularmente conhecidas como "orelhas de pau". Os índios e seus descendentes chamavam os cogumelos, em geral, de urupês.

Hoje acredita-se que existam mais de 200.000 espécies de basidiomicetos lignocelulolíticos, a maioria dos quais estariam nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, até o momento, não existe um registro completo, embora numerosos trabalhos citando espécies da Amazônia ao Rio Grande do Sul tenham sido publicados neste século (Theissen, 1911; Torrend, 1938; Teixeira, 1945, 1948; Viegas, 1959; Rick, 1963; Fidalgo, O. 1963; Fidalgo, K. 1968; Fidalgo & Fidalgo, 1957, 1962; Fidalgo *et al.*, 1965; Furtado, 1967, 1969; Bononi, 1976, 1979a,b,c, 1984;

Bononi *et al.*, 1981; Guerrero & Honrich, 1983; Hjorststam & Bononi, 1986; Cavalcanti, 1976; Souza, 1977, 1980; Silva, 1987; Susin, 1987; Capelari & Maziero, 1988; Capelari, 1989; Leite, 1990; Silveira, 1990; Fonseca, 1994; Gugliota, 1994). Algumas espécies são muito comuns como o *Schizophyllum commune*, o *Gloeophyllum striatum*, muitas espécies de *Pbellinus*, *Ganoderma*, *Coriolus*, *Trametes* etc.

Os basidiomicetos lignocelulolíticos estão classificados em duas grandes ordens dos Basidiomicetos: *Agaricales* e *Aphylophorales* e em suas muitas famílias. Possuem tamanhos, formas, cores e consistências diversificadas. Podem ser microscópicos ou ter até 2,0 m de diâmetro, presos ao substrato através de estirpe, sésseis ou na forma de manchas regulares ou irregulares na superfície da madeira. Ocorrem também na forma de típicos guarda-chuvas ou efuso-reflexas como pequenas orelhas de madeira, sendo comuns nas florestas brasileiras. São versáteis e, num mesmo tronco, uma espécie pode apresentar mais de uma forma ou cor.

A coloração desses cogumelos pode variar durante as diferentes fases do desenvolvimento, sendo bastante comuns as espécies com uma ou muitas tonalidades de castanho, amarelo, branco, violeta etc. O *Pycnoporus sanguineus* é uma espécie cosmopolita e comum no Brasil, geralmente aparecendo em clareiras. Quando jovem, é vermelho-alaranjado-vivo e, à medida em que o espécime envelhece, desbota, ficando praticamente branco e difícil de identificar sem a observação de suas microestruturas.

Muitos basidiomicetos não possuem odor e nem sabor, mas algumas espécies possuem cheiro muito característico e o sabor pode ser agradável ou amargo. Não são conhecidas espécies venenosas, embora exceções possam ocorrer. Muitas espécies são comestíveis, mas para serem comercialmente interessantes precisam ter textura e paladar adequados, como é o caso de muitas espécies de *Pleurotus*. Na natureza, esses fungos são utilizados por insetos e outros animais como alimento e local para criação. A reprodução dos basidiomicetos lignocelulolíticos, em geral, é sexuada com a formação dos basidiosporos. Estágios assexuados são raros e denominados anamorfos. Ocasionalmente esporos assexuais, como conídios e clamidiosporos, podem ocorrer concomitantemente com basidiosporos numa mesma frutificação. Geralmente as espécies são heterotálicas com compatibilidade bi ou tetrapolar dos esporos.

Os basidiomicetos lignocelulolíticos crescem inicialmente dentro da madeira, colonizando-a, e suas hifas formam uma rede, nem sempre visível a olho nu, mais ou menos extensa, preenchendo o lúmen das células, passando de uma célula a outra através de poros da parede celular e em alguns casos destruindo a lamela média. Após certo período de

tempo, que pode durar uns poucos dias até muitos anos, variável de espécie para espécie e com as condições ambientais, os basidiocarpos (corpos de frutificação) emergem. Os basidiomicetos lignocelulolíticos são extremamente importantes como decompositores e principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam os componentes da madeira: celulose, hemicelulose e lignina, a partir dos quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução. Causam a podridão branca da madeira.

Os fungos apodrecedores da madeira são os contribuintes primários para a degradação da madeira na natureza, secretando enzimas extracelulares. A degradação da lignina é um processo oxidativo extracelular e relativamente não específico. Para que a degradação da lignina ocorra é necessária outra fonte alternativa de carbono, que em condições naturais é suprida pela celulose, hemicelulose, carboidratos simples e glicerol (Boominathan & Reddy, 1992).

A lignina é uma molécula extremamente complexa, um biopolímero de alto peso molecular de estrutura irregular, amorfo, tridimensional, heterogêneo. Os polímeros são fortemente interligados entre si por radicais livres e sem pontes rapidamente hidrolizáveis. É sintetizado a partir de três precursores fenilpropanóides, monoméricos: álcoois sinapil, conifenil e cumaril unidos por ligações covalentes éter ou éster com os polissacarídeos da parede celular (Hartley & Ford, 1989).

A degradação da madeira ocorre simultaneamente com a degradação dos polissacarídeos e da lignina pela ação integrada e sucessiva de bactérias, actinomicetos e fungos. Os açúcares são facilmente metabolizados pelos fungos, que também os utilizam para a produção do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que participa das reações enzimáticas da degradação da lignina. Sabe-se hoje que a degradação da lignina é catalisada por enzimas tipo peroxidases e lacases, que oxidam unidades não fenólicas da lignina. Outras enzimas, como a glioxal oxidase, a veratril álcool oxidase e a quinona oxidoreductase, participam do processo.

Alguns autores ressaltam a importância dos basidiomicetos lignocelulolíticos na natureza, afirmando que, sem sua atuação na degradação da lignina, não seria possível a vida no planeta, o qual não passaria de um imenso depósito de troncos e resíduos, que permaneceriam por séculos.

As reações de degradação da lignina puderam ser explicadas por um mecanismo que começa com a subtração catalisada de um elétron do núcleo aromático da lignina para formar radicais cátions instáveis. Subseqüentemente, vários produtos são formados por reações não enzimáticas de radicais cátions com água e outros nucleófilos.

## BASIDIOMICETOS LIGNOCELULOLÍTICOS EM BIOTECNOLOGIA

Tradicionalmente, algumas espécies têm sido cultivadas para alimentação humana, como *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Auricularia* spp. etc. Também existem espécies cultivadas, utilizadas no enriquecimento e melhoria da digestibilidade de rações animais.

A elucidação do processo de degradação da lignina conduziu a inúmeras pesquisas para a utilização do fungo da podridão branca em processos biotecnológicos. Uma das aplicações relaciona-se com a indústria do papel, onde o objetivo principal é obter a polpa removendo lignina com a menor destruição possível de celulose e hemicelulose. Os processos em uso requerem muita energia e grande volume de produtos químicos, gerando efluentes tóxicos, ricos em ligninas cloradas, com sérios danos ambientais. A utilização dos fungos é uma solução para a produção de polpa, embora o processo desenvolvido ainda seja muito lento. Fungos também estão sendo utilizados para o branqueamento da polpa, em substituição a processos químicos, e no tratamento de efluentes.

Mais recentemente, a partir dos anos 80, maior enfoque tem sido dado à utilização desses fungos na área medicinal e ambiental. Pesquisas com algumas espécies têm demonstrado bons resultados na preservação e cura do excesso de colesterol e no tratamento de algumas espécies de câncer por aumento da resistência do organismo (Jong & Dono-vicki, 1989; Jong & Birmingham, 1992 e 1993).

*Phanerochaete chrysosporium* Burds. é uma espécie extensivamente estudada por sua capacidade de atuar na degradação de compostos organoclorados recalcitrantes, levando à completa mineralização. Isso ocorre devido à inespecificidade de seu sistema enzimático extracelular. Mais recentemente têm sido estudadas outras espécies, como *Pleurotus* spp., *Trametes versicolor* (Fr.) Pilát, *Lentinula edodes*, *Phlebia radiata* Fr. e outras.

A degradação é estimulada em meio de cultura deficiente em nitrogênio, imitando o que ocorre na natureza, porque a madeira também contém baixos teores de nitrogênio. *P. chrysosporium*, que degrada três gramas de lignina/grama de proteína fungo/dia, é capaz de degradar diversos organoclorados, cujas moléculas se assemelham às de lignina.

## BIODEGRADAÇÃO DE PRODUTOS TÓXICOS RECALCITRANTES

Processos biológicos e geoquímicos produzem enormes quantidades de compostos orgânicos com uma grande diversidade de estruturas. Quase

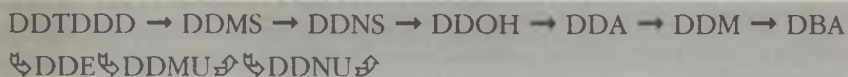
que 100% desses compostos podem ser utilizados por algum microrganismo como fonte de energia ou na constituição de seu corpo. Na natureza, algumas plantas e organismos marinhos produzem organoclorados e existem fungos que produzem haloperoxidasas a partir de compostos derivados da degradação da lignina. Portanto, a mineralização de compostos clorados pode ocorrer naturalmente. Entretanto, para milhares de compostos orgânicos produzidos artificialmente por síntese química na indústria, não se conhecem decompositores naturais. Esses compostos sintéticos são chamados xenobióticos e muitos são estáveis, sob condições aeróbicas e anaeróbicas, estando presentes em fertilizantes, pesticidas e herbicidas, combustão, efluentes naturais etc.

O fungo mais estudado é o *Phanerochaete chrysosporium*. A degradação mais eficiente ocorre em meio deficiente de nitrogênio e temperaturas entre 35 e 37°C pela ação das peroxidases (manganês peroxidase-MnP e ligninase-LiP).

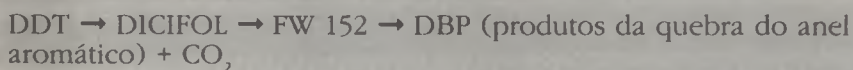
Uma série de trabalhos reportam a degradação de DDT (Diclorodifeniltricloroetano), PCB (Bifenilpoliclorados), dioxina, lindane, pentaclorofenol (Bumpus & Aust, 1987a; Aust, 1990) e antraceno (Field *et al.*, 1992; Vyas *et al.*, 1994) pela aplicação do próprio microrganismo como inóculo, ao natural ou a partir de enzimas isoladas.

O DDT é o pesticida mais freqüentemente encontrado no meio ambiente, pois foi utilizado em larga escala como inseticida em campanhas de saúde pública. Apresenta uma estrutura química estável, tem meia-vida de três anos e após dez anos cerca de 5% a 10% do aplicado ainda permanece no solo. Um estudo do comportamento do DDT marcado com  $^{14}\text{C}$ , sob condições de laboratório e campo, foi feito no Instituto Biológico de São Paulo (De Andrea & Flores-Ruegg, 1988), em solo argiloso rico em matéria orgânica. A meia-vida foi de aproximadamente um ano e verificou-se baixa mobilidade.

Em revisão bibliográfica, Bumpus & Aust (1987) relatam trabalhos, destacando o papel dos microrganismos na degradação do DDT e outros compostos organoclorados. Embora o DDT seja um poluente ambiental persistente, intensa biodegradação pode ocorrer, principalmente por bactérias, conforme esquema:



No caso de degradação por basidiomicetos lignocelulolíticos, a degradação em trinta dias (Aust, 1990) segue o seguinte esquema:



As abreviaturas dos compostos citados são:

DDT = 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

DDD = 1,1-dicloro-2,2bis(4-clorofenol)etano

DDMS = 1-cloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

DDNS = 2,2-bis(4-clorofenil)etano

DDOH = 2,2-bis(4clorofenil)etanol

DDA = 2,2-bis(4-clorofenil)ácido acético

DDE = 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

DDMU = 1-cloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

DDNU = 1,1-bis(4-clorofenil)etano

DBH = (4,4'-diclorobenzidrol)

DBP = (4,4'-diclorobenzofenona)

onde DICOFOL = 2,2,2, Tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etano

FW 152 = 2,2-dicloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol

O estudo da biodegradação de DDT e outros compostos por fungos tem recebido pouca atenção, diferentemente da biodegradação por bactérias, que tem sido bastante estudada. No entanto, alguns estudos mais recentes têm evidenciado que o sistema enzimático de fungos basidiomicetos é capaz de mineralizar  $^{14}\text{C}$ -DDT e um grande número de outros poluentes ambientais persistentes.

## Biorremediação

O dano ambiental causado por xenobióticos depende de sua composição e do solo. O xenobiótico pode ficar muito ligado a partículas do solo ou mais solto, podendo migrar para camadas mais profundas, contaminando águas subterrâneas. Pode ser fotooxidizado ou decomposto por processos abióticos, absorvidos por plantas ou transformados por microrganismos. Os resultados obtidos com basidiomicetos lignocelulolíticos em laboratório não se repetem no campo. Estudos precisam ser feitos para tratamento *in situ* e em larga escala.

Lamar & Dietrich (1990) verificaram em campo a capacidade de duas espécies de *Phanerochaete* degradarem PCP de um solo contaminado, previamente esterilizado com brometo de metila, e obtiveram de 88 a 91% de decréscimo em 6 semanas e meia. O solo era pobre em matéria orgânica e foi adicionada turfa como fonte de carbono orgânico para auxiliar o fungo em seu crescimento. De 8 a 13% de decréscimo foram devidos à sua metilação para pentacloroanisole (PCA). Os resultados obtidos são promissores para o uso de basidiomicetos lignocelulolíticos em biorremediação.

## BASIDIOMICETOS LIGNOCELULOLÍTICOS BRASILEIROS NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ORGANOCORADOS NO SOLO

### O Problema

Enquanto o conhecimento se acumula em outras partes do mundo sobre a utilização de microrganismos para a decomposição de organoclorados, o Brasil também dá os primeiros passos no estudo da degradação por basidiomicetos lignocelulolíticos. A partir de um sério problema ambiental, a contaminação de solos da Baixada Santista, SP, decorrente do pólo industrial de Cubatão, um grupo de pesquisadores está desenvolvendo o projeto "utilização de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos para a biodegradação de compostos clorados".

O pólo industrial de Cubatão, SP, acumulou, nos últimos 20 anos, grande quantidade de produtos tóxicos, principalmente resíduos contendo pentaclorofenol (PCP), hexaclorobenzeno (HCB) e outros organoclorados, precursores de dioxinas. Esses produtos foram despejados em diversas áreas da Baixada Santista e algumas vezes até utilizados como adubo. Análises realizadas pela CETESB (Companhia de Saneamento Ambiental de São Paulo) mostram concentrações variadas de até 1 grama de PCP por quilo de solo e de 11 gramas de HCB por quilo de solo.

Em Samaritá, São Vicente, SP, o Ministério da Agricultura possui uma área de manguezal conhecida como Quarentenário. Nela se instalaram 4 mil famílias sem-teto. Logo, casos de cloroacne (formação de bolhas na pele) começaram a surgir. Levantamento feito por médico do SUDS/52, de Santos, SP, em 1977, revelou índices de contaminação de HCB superiores aos registrados entre trabalhadores que lidavam com pesticidas na Alemanha. Com isso, um grande depósito clandestino de organoclorados foi descoberto. Pesquisas mais recentes analisaram o índice de contaminação da água subterrânea no local, mostrando-se altas as concentrações de tetracloroeto de carbono, percloroetileno e pentaclorofenol, com aumento do risco de incidência de câncer sobre a população.

O projeto está sendo realizado por um conjunto de instituições:

- *Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo/Instituto de Botânica:*

Vera Lúcia Ramos Bononi, Marina Capelari – Doutoranda USP, Rosana Maziero – Doutoranda USP, Adriana de Mello Gugliotta – Doutoranda USP, Luci Kimie Okino – Mestranda UNESP, Joceli Adair da Silva – Técnico em Química.

- *Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho/Centro de Pesquisa do Litoral:*  
Dácio Roberto Matheus – Mestrando UNESP, Denilton dos Santos – estagiário, Carla Fabris – estagiária.
- *Universidade de São Paulo/Centro de Energia para Agricultura:*  
Dra. Regina Monteiro.
- *Centro de Tecnologia/Belo Horizonte:*  
Kátia Machado – Doutoranda UNESP.

O suporte financeiro tem sido dado pela Rhodia e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) e conta com a participação internacional do Institut für Bodenbiologie/FAL de Braunschweig, Alemanha e Departamento di Scienzi e Technologie Alimentari e Microbiologiche da Universidade de Milão, Itália.

Hoje, além de depósitos de solos contaminados por organoclorados, devidamente identificados e isolados, como é o caso da Estação de Espera da Rhodia, onde foram armazenadas 33 mil toneladas de solo contaminado, acredita-se na existência de outras áreas contaminadas em Itanhaém e Cubatão, que constituem grande problema para a descontaminação e para a saúde da população.

A única solução disponível, até o momento, para o tratamento de solos contaminados é a queima em incineradores a altas temperaturas (900-1.200°C). Esse tratamento requer muita energia, é caro e tem trazido preocupações à sociedade sobre sua segurança. Teme-se a produção de dioxinas, como resultado da combustão de organoclorados, e que o manuseio seja uma ameaça aos operários que trabalham no sistema de tratamento.

Desde 1994 o incinerador existente na Baixada Santista, de propriedade da Rhodia, foi interdito pelo Poder Judiciário, tendo sido constatada contaminação por organoclorados nos operários da fábrica. Teme-se a repetição de tragédias como a que ocorreu em julho de 1976, em Seveso, Itália, quando uma indústria química deixou escapar uma nuvem de dioxina. O veneno provocou a morte de 50 mil animais e 7 mil pessoas foram obrigadas a se mudar para outros locais. Prevendo o nascimento de monstros gerados por mutações genéticas, a Igreja Católica autorizou a realização de aborto a 2 mil mulheres.

Também é preocupante o uso indiscriminado de pacotes de microrganismos não identificados, de origem não declarada, no mercado brasileiro para implementar a produção agrícola ou descontaminar áreas. Podem colocar em risco o equilíbrio dos ecossistemas e falta conhecimento para avaliar e propor alternativas ecológicas mais recomendáveis.



## A Experiência Existente no Brasil

Para enfrentar o problema os pesquisadores brasileiros puderam contar com trabalhos publicados na literatura internacional já mencionados na introdução, com a experiência acumulada em outras áreas concretas de pesquisa e com a riqueza da biodiversidade dos fungos encontrados nos diversos ecossistemas brasileiros.

A experiência anterior existente no Brasil pode ser resumida da seguinte forma:

- Os trabalhos de taxonomia de basidiomicetos, que permitem o isolamento e identificação de espécies de fungos.
- A tecnologia de cultivo de cogumelos comestíveis, em que a técnica de produção de “matriz” ou “spawn” é utilizada para produção de inóculo em larga escala para trabalhos pilotos em biotecnologia.
- O domínio da técnica de fermentação sólida, utilizada para produção de compostos (substratos) para o cultivo de cogumelos comestíveis. Ela fornece dados importantes sobre a fisiologia de fungos, como o comportamento a diferentes pH, umidade, velocidade de colonização do substrato, profundidade e distribuição do inóculo (Bononi et al, 1995).

## Caracterização do Solo Estudado

Tanto o solo como os indícios de contaminação não são uniformes. Apenas como exemplo, encontra-se abaixo relacionado o resultado da análise de uma amostra composta de solo.

COMPOSTO	mg/kg DE SOLO
Hexaclorobutadieno	351
Tetraclorobenzeno	131
Pentaclorobenzeno	118
Hexaclorobenzeno	156
Tetracloroeto de carbono	traços
Hexacloroetano	traços
Pentaclorofenol	4,6%

## Caracterização dos Principais Compostos Organoclorados Estudados

Hexaclorobenzeno (HCB)

*Fórmula molecular:*  $C_6Cl_6$

*Peso molecular:* 284,76

*Estrutura química:*

O HCB é um sintético orgânico, fabricado pela primeira vez em 1933, não ocorrendo naturalmente no meio ambiente. É muito estável, não reativo e solúvel em água. Foi utilizado como fungicida para o tratamento de sementes, preservativo de madeiras, composições pirotécnicas, na fabricação de corantes, polivinil clorado e borracha sintética. Pode também ocorrer como resíduo na fabricação de tetracloreto de carbono e percloroetileno. Seu uso foi proibido inicialmente nos Estados Unidos (1978) e, a seguir, na Comunidade Européia e no Brasil, mas continua sendo produzido como subproduto da fabricação de compostos clorados. Resíduos já foram detectados em populações humanas. O risco adicional de câncer, segundo parâmetros da EPA/USA, é de 1:100.000 na dosagem de 7,2 mg/L.

**Pentaclorofenol (PCP)**

*Fórmula Molecular:* C<sub>6</sub>HOCl<sub>5</sub>

*Peso Molecular:* 266,36

*Estrutura Química:*

É um composto orgânico estável, pouco solúvel em água e altamente solúvel em solventes orgânicos. É fortemente adsorvido em sólidos orgânicos, como celulose, e pode causar rápida deterioração da borracha, quando dissolvido em óleo. Foi utilizado como anti-séptico para não metais, herbicida, dessecante, fungicida, bactericida, inseticida, preservativo de madeira e componente de tintas, vernizes, papéis, carros e cordas. Hoje seu uso e produção são proibidos em vários países e no Brasil. O limite em água para vida humana é de 1,010 mg/L e para proteção da vida aquática de 55,0 mg/L (parâmetros da EPA/USA).

**Escopo Global do Projeto de Pesquisa**

FASES /AÇÕES	OBJETIVOS
1 Coleta e isolamento basidiomicetos lignocelulolíticos nativos	Conhecimento da biodiversidade
2 Coleção de culturas de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos	Linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos disponíveis para processos biotecnológicos
3 Screening para fungos decompositores de lignina	Selecionar fungos degradadores de lignina e potencialmente capazes de degradar organoclorados

4 Produção de exopolissacarídeos, processos biotecnológicos, indústria alimentícia, farmacêutica, extração de petróleo, enzimas, etc.	Screening de fungos produtores de exopolissacarídeos com potencial de uso
5 Produção de enzimas relacionadas Biodegradação de lignina e organoclorados	Seleção de fungos com maior potencial produção de enzimas
6 Crescimento de fungos em presença de organoclorados	Deteccão dos limites máximos de tolerância a HCB e PCP
7 Degradação de PCP e HCB	Seleção de fungos que degradam HCB e PCP <i>in vitro</i>
8 Degradação do pireno <i>in vitro</i>	Seleção de fungos que degradam pireno
9 Biodegradação <i>in situ</i>	Avaliação da capacidade de biodegradação de solos contaminados por HCB e PCP por basidiomicetos lignocelulolíticos em campo

**Fase 1.** Coleta, isolamento em meio de cultura e identificação de basidiomicetos lignocelulolíticos brasileiros.

*Objetivo:* Constituir um banco de linhagens nativas de basidiomicetos lignocelulolíticos para futuro uso em processos biotecnológicos.

*Metodologia:* Coletas em todo o Brasil, incluindo diferentes ecossistemas preservados e áreas notadamente poluídas para contar com diversidade e espécies resistentes a diferentes tipos de poluentes. Todos os fungos coletados foram isolados em meio de cultura. As técnicas de coleta e isolamento foram descritas por Fidalgo & Bononi (1984). As linhagens obtidas em culturas puras foram previamente identificadas com auxílio de chaves e por comparação com material do herbário. Espécies de identificação duvidosa foram enviadas a especialistas no exterior para confirmação. Foi ainda anotada a característica da podridão do substrato a olho nu e com auxílio de lupa. Espécimes (basidiocarpos) após identificação foram secos e introduzidos no herbário do Instituto de Botânica (SP) como documentação.

*Resultados:* De 2.000 espécimes coletadas foram isoladas e cresceram em meio de cultura 500 linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos identificados.

## Fase 2. Coleção de culturas de basidiomicetos lignocelulolíticos brasileiros.

**Objetivo:** Ter linhagens das quais se conhece a condição mínima para crescimento em laboratório, devidamente identificada para serem utilizados em processos biotecnológicos.

**Metodologia:** Meios de cultura – BDA (Batata-Dextrose-Agar) e Extra-to de Malte. Isolamento através de parte do micélio em condições as-sépticas e em câmara de fluxo laminar. Incubação a 25°C. As culturas foram introduzidas e mantidas na Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica seguindo normas internacionais (Kirsop & Snell, 1984).

**Resultados:** Estão contidos na Tabela 1.

TABELA 1. Listagem dos fungos da coleção de cultura do Instituto de Botânica (SP).

COLEÇÃO DE CULTURAS – BASIDIOMICETOS NATIVOS					
Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA
016	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	USP, São Paulo, SP	259	<i>Psilocybe castanella</i> var. <i>subhyperella</i>	São Vicente, SP
041	<i>Agaricus cf. xanthodermus</i>	São Paulo, SP	260	<i>Lentinus bertieri</i>	São Vicente, SP
043	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	Ibt, São Paulo, SP	261	cf. <i>Ceriporiopsis aneirina</i>	São Vicente, SP
			263	<i>Dictyopanus pusillus</i>	São Vicente, SP
044	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	Ilha do Cardoso, SP	265	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	São Vicente, SP
053	<i>Coprinus comatus</i>	SAA/SP	266	<i>Polyporus arcularius</i>	São Vicente, SP
054	<i>Agrocybe</i> sp.	IBt	267	<i>Stereum ostrea</i>	São Vicente, SP
067	<i>Pleurotus</i> sp.	( <i>Antromyces</i> ), fase imperfeita	268	<i>Lentinus velutinus</i>	São Vicente, SP
068	<i>Pleurotus</i> sp.	Serra de Itapeti, SP	273	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	São Vicente, SP
110	<i>Lepista</i>	Mogi das Cruzes, CEPECC	274	<i>Lentinus zeyheri</i>	São Vicente, SP
111	<i>Coprinus comatus</i>	São Paulo, SP	277	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	São Vicente, SP
113	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	IBt, São Paulo, SP	279	<i>Macrolepiota procera</i>	Miranda/MS
156	<i>Psilocybe subcubensis</i>	IBt, São Paulo, SP	280	<i>Agaricus</i> sp.	Miranda/MS
157	<i>Lachnocladium</i>	IBt, São Paulo, SP	281	<i>Agaricus</i> sp.	Miranda/MS
158	<i>Trametes versicolor</i>	IBt, São Paulo, SP	282	<i>Peniophora utriculosa</i>	Assis, SP
160	<i>Hypochnicium</i> sp.	IBt, São Paulo, SP	284	<i>Agaricus</i> sp.	
161	<i>Agrocybe perfecta</i>	IBt, São Paulo, SP	286	<i>Peniophora cremea</i>	São Vicente, SP
162	<i>Lentinus cf. strigosus</i>	Ilha Solteira, SP	287	<i>Macrolepiota procera</i>	Belo Horizonte
164	<i>Oligoporus</i> sp.	Campinas, SP	288	<i>Lentinus velutinus</i>	Boracéia, SP
165	<i>Trametes villosa</i>	Campinas, SP	289	<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	Boracéia, SP

Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA
166	<i>Trametes pubescens</i>	Maceió, CE	290	<i>Earliella scabrosa</i>	Águas da Prata, SP
167	<i>Trametes</i> sp.	Maceió, CE	291	<i>Trametes villosa</i>	Águas da Prata, SP
168	<i>Ganoderma lucidum</i>	Maceió, CE	292	<i>Marasmiellus nanus</i>	Águas da Prata, SP
169	<i>Ganoderma australe</i>	Maceió, CE	293	<i>Hypholoma subviride</i>	IBt, São Paulo, SP
170	<i>Suillus granulatus</i>	Ribeirão Pires, SP	294	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Águas da Prata, SP
172	<i>Agaricus parasilvaticus</i>	Tietê, SP	295	<i>Trametes villosa</i>	Águas da Prata, SP
173	<i>Calvatia cyathiformis</i>	Tietê, SP	296	<i>Collybia</i> sp.	Belo Horizonte
174	<i>Lentinus</i> sp.	Mogi das Cruzes, SP	297	<i>Trichaptum bifforme</i>	Belo Horizonte
175	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Mogi das Cruzes, SP	299	<i>Agaricus porosporus</i>	Belo Horizonte
176	<i>Trametes villosa</i>	Assis, SP	300	<i>Psilocybe castanella</i>	Belo Horizonte
177	<i>Gloeophyllum striatum</i>	Assis, SP	301	<i>Agaricus parasilvaticus</i>	Belo Horizonte
178	<i>Lentinus</i> cf. <i>strigosus</i>	Águas da Prata, SP	303	<i>Collybia</i> cf. <i>trinitatis</i>	Belo Horizonte
179	<i>Oudemansiella canarii</i>	Águas da Prata, SP	304	<i>Fayodia</i> sp.	Assis, SP
182	<i>Phellinus gilvus</i>	Águas da Prata, SP	305	<i>Phellinus lividus</i>	Ribeirão Preto, SP
184	<i>Melanoporia nigra</i>	Maceió, CE	306	<i>Cladoderris dendritica</i>	Boracéia, SP
186	<i>Phellinus gilvus</i>	Maceió, CE	307	<i>Schizophyllum commune</i>	IBt, São Paulo, SP
187	<i>Panaeolus papilionaceus</i>	Jarinú, SP	308	<i>Collybia dryophila</i>	Boracéia, SP
188	<i>Gloeophyllum striatum</i>	Jarinú, SP	313	<i>Oudemansiella steffanii</i>	Boracéia, SP
189	<i>Polyporus varius</i>	Jarinú, SP	317	<i>Phellinus gilvus</i>	Boracéia, SP
190	<i>Phellinus gilvus</i>	Maceió, CE	318	<i>Coprinus jamaicensis</i>	São Paulo, SP
191	<i>Climacodon pulcherrimus</i>	Maceió, CE	320	<i>Trametes cubensis</i>	Boracéia, SP
193	<i>Tyromyces pseudolacteus</i>	Faz. Intervales, SP	321	<i>G. applanatum/ Amauroderma</i> cf. <i>preussi</i>	Boracéia, SP
195	<i>Polyporus tenuiculus</i>	Belo Horizonte, MG	322	<i>Rigidoporus lineatus</i>	Boracéia, SP
196	<i>Irpex lacteus</i>	Faz. Intervales, SP	323	<i>Ganoderma lipsiensis</i>	Boracéia, SP
197	<i>Pleurotus</i> cf. <i>flabellatus</i>	Poços de Caldas, MG	324	<i>Collybia dryophilla</i>	Boracéia, SP
199	<i>Gymnopilus earlei</i>	Jundiaí, SP	325	<i>Stereum surinamensis</i>	Boracéia, SP
200	<i>Phellinus gilvus</i>	São Paulo, SP	327	<i>Stereum gausapatum</i>	Boracéia, SP
201	<i>Coriolopsis rigida</i>	IBt, São Paulo, SP	328	<i>Russula hygrophytica</i>	Boracéia, SP
202	<i>Trametes versicolor</i>	IBt, São Paulo, SP	329	<i>Coriolopsis polyzona</i>	
203	<i>Trichaptum byssogenum</i>	São Vicente, SP	330	<i>Tricholoma pachymeres</i>	Cajamar, SP
204	<i>Peniophora cinerea</i>	São Vicente, SP	332	<i>Campanella caeruleascens</i>	Boracéia, SP
205	<i>Phellinus fastuosus</i>	Maceió, CE	333	<i>Oudemansiella steffanii</i>	Intervales, SP
206	<i>Antrodiella americana</i>	Miranda, MS	334	<i>Rigidoporus microporus</i>	Intervales, SP
207	<i>Inonotus ludovicianus</i>	Miranda, MS	335	<i>Phellinus spiculatus</i>	Intervales, SP
209	<i>Ganoderma lobatum</i>	Miranda, MS	342	<i>Gerronema citrinum</i>	Intervales, SP
210	<i>Pleurotus flabellatus</i>	Miranda, MS	344	<i>Cymatoderma dendriticum</i>	Intervales, SP
211	<i>Agrocybe</i> cf. <i>platensis</i>	Miranda, MS	346	<i>Agaricus ochraceosquamulosus</i>	Intervales, SP



Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA
212	<i>Lentinus crinitus</i>	Maceió, CE	348	<i>Trametes malicola</i>	São Paulo, SP
213	<i>Trametes villosa</i>	São Paulo, SP	349	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	Intervales, SP
214	<i>Fomitopsis spraguei</i>	São Paulo	351	<i>Dennisiomyces glabrescentipes</i>	Intervales, SP
215	<i>Agrocybe cf. platensis</i>	Miranda, MS	352	<i>Ganoderma lipsiensis</i>	Intervales, SP
216	<i>Nothopanus hygrophanus</i>	Miranda, MS	354	<i>Xeromphalina tenuipes</i>	São Paulo, SP
217	<i>Lentinus crinitus</i>	Miranda, MS	355	<i>Merulius corium</i>	Intervales, SP
221	<i>Inonotus ludovicianus</i>	Miranda, MS	356	<i>Lentinus crinitus</i>	Ubatuba, SP
224	<i>Psilocybe subcubensis</i>	Miranda, MS	360	<i>Coprinus domesticus</i>	São Paulo, SP
241	<i>Oudemansiella canarii</i>	IBt, São Paulo, SP	361	<i>Marasmius cladophyllus</i>	Intervales, SP
243	<i>Perenniporia piperis</i>	IBt, São Paulo, SP	362	<i>Crepidotus</i>	Intervales, SP
244	<i>Perenniporia tepetitensis</i>	IBt, São Paulo, SP	363	<i>Phellinus grenadensis</i>	São Paulo, SP
249	<i>Gymnopilus earlei</i>	Jarinú, SP	364	<i>Ganoderma lipsiensis</i>	São Paulo, SP
253	<i>Lentinus striatulus</i>	Ubatuba, SP	365	<i>Phellinus grenadensis</i>	São Paulo, SP
254	<i>Phellinus gilvus</i>	Mogi das Cruzes, SP	366	<i>Crinipellis trinitatis</i>	Intervales, SP
255	<i>Lentinus cf. bertieri</i>	Boracéia, SP	367	<i>Psilocybe venezuelana</i>	Intervales, SP
256	<i>Lentinus squarrosulus</i>	Boracéia, SP	368	<i>Schizophyllum commune</i>	Mogi- Guaçu, SP
257	<i>Hypholoma subviride</i>	São Vicente, SP	372	<i>Trametes versicolor</i>	Mogi-Guaçu, SP
373	<i>Gymnopilus aureobrunneus</i>	São Paulo, SP	464	<i>Crinipellis bisulcata</i>	São Vicente, SP
374	<i>Tubaria furfuracea</i>	São Paulo, SP	465	<i>Schizophyllum commune</i>	São Vicente, SP
375	<i>Gymnopilus earlei</i>	São Paulo, SP	466	<i>Schizopora apacheriensis</i>	Águas da Prata, SP
376	<i>Psathyrella tenuis</i>	São Paulo, SP	467	<i>cf. Ripartitella brasiliensis</i>	Itanhaém, SP
377	<i>Lentinus araucariae</i>	Mairiporã, SP	471	<i>Cystostreum murraii</i>	São Paulo, SP
378	<i>Marasmius sp.</i>	Mairiporã, SP	472	<i>Bovista aestivalis</i>	São Paulo, SP
380	<i>Lentinus strigellus</i>	São Vicente, SP	473	<i>Schizophyllum commune</i>	São Paulo, SP
381	<i>Gymnopilus chrysopellus</i>	Mairiporã, SP	474	<i>Schizophyllum commune</i>	São Paulo, SP
386	<i>Phellinus umbrinellus</i>	Mogi-Guaçu, SP	477	<i>Fayodia sp.</i>	São Paulo, SP
387	<i>Melanoporia nigra</i>	Intervales, SP	478	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ATCC 28326, SP
389	<i>Gymnopilus earlei</i>	Tramandaí, RS	479	<i>Collybia fibrosipes</i>	São Paulo, SP
390	<i>Trogia buccinalis</i>	Intervales, SP	482	<i>Scytinostromella sp.</i>	São Paulo, SP
391	<i>Favolaschia thwaitesii</i>	Intervales, SP	483	<i>Coprinus disseminatus</i>	São Paulo, SP
392	<i>Antrodiaella genistae</i>	Intervales, SP	484	<i>Phellinus grenadensis</i>	São Paulo, SP
394	<i>Pleurotus flabellatus</i>	Intervales, SP	485	<i>Phellinus gilvus</i>	São Paulo, SP
396	<i>Pleurotus flabellatus</i>	Itapeçerica da Serra, SP	487	<i>Polyporus udus</i>	IBt, São Paulo, SP
399	<i>Geastrum</i>	São Paulo, SP	496	<i>Amanita muscaria</i>	Campos do Jordão, SP
400	<i>Gloeoporus dichrous</i>	Intervales, SP	497	<i>Trametes hirsuta</i>	IBt, São Paulo, SP

Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	Nº REG.	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA
401	<i>Hygrocybe parvula</i>	Intervales, SP	498	<i>Earliella scabrosa</i>	Peruibe, SP
403	<i>Trichaptum abietinum</i>	Intervales, SP	499	<i>Corioliopsis rigida</i>	Mogi-Guaçu, SP
406	<i>Hygrocybe trinitensis</i>	Intervales, SP	501	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Mogi-Guaçu, SP
408	<i>Collybia neotropica</i>	Intervales, SP	502	<i>Hexagonia hydroides</i>	Mogi-Guaçu, SP
411	<i>Agaricus dennisii</i>	IBt, São Paulo, SP	503	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Mogi-Guaçu, SP
412	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	Itanhaém, SP	507	<i>Pleurotus</i>	Ribeirão Pires, SP
414	<i>Fomitella supina</i>	Mogi-Bertioga, SP	508	<i>Agaricus silvaticus</i> (blazei)	Tapiraí, SP
415	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Itanhaém, SP	509	<i>Agaricales</i>	São Paulo, SP
416	<i>Ganoderma annularis</i>	IBt, São Paulo, SP	510	<i>Phaeogyroporus</i>	Ibt, São Paulo, SP
417	<i>Ganoderma annularis</i>	IBt, São Paulo, SP	511	<i>Agaricus silvaticus</i>	IBt, São Paulo, SP
422	<i>Schizophyllum commune</i>	Cubatão, SP	512	<i>Cystoderma sipariana</i>	Ibt, São Paulo, SP
423	<i>Amylosporopus</i> sp.	Cubatão, SP	513	<i>Flammulina velutipes</i>	Itália
425	<i>Marasmius hakgalensis</i>	São Vicente, SP	514	<i>Lentinus edodes</i>	Associação MOA São Roque
426	<i>Antrodiella</i> sp.	São Vicente, SP	515	<i>Lentinus edodes</i>	Produtor de Londrina
440	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	São Vicente, SP	516	<i>Lentinus edodes</i>	P.L./Mori 465 (Inst. Japonês)
442	<i>Psilocybe clavatum</i>	São Vicente, SP	517	<i>Pleurotus</i> (cinza)	Ilha do Cardoso, SP
443	<i>Psilocybe silvatica</i>	São Vicente, SP	518	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	Ilha do Cardoso, SP
444	<i>Psilocybe castanella</i> var <i>castanella</i>	São Vicente, SP	519	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	Ilha do Cardoso, SP
445	<i>Psilocybe</i> sp.	São Vicente, SP	520	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	Ilha do Cardoso, SP
446	cf. <i>Antrodiella semisupina</i>	São Vicente, SP	521	<i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	Ilha do Cardoso, SP
447	<i>Mycena</i> sp.	Bertioga, SP	523	<i>Polyporus dictyopus</i>	Ilha do Cardoso, SP
452	<i>Trichaptum bysso-genum</i>	São Vicente, SP	524	<i>Polyporus dictyopus</i>	Ilha do Cardoso, SP
454	<i>Polyporus dictyopus</i>	Bertioga, SP	525	<i>Tricholoma</i>	São Paulo, SP
455	<i>Marasmius</i> cf. <i>niveus</i>	Bertioga, SP	526	<i>Polyporus dictyopus</i>	Ilha do Cardoso, SP
456	<i>Lepiota Itap. Adri</i> (28.5)	Itapeperica da Serra, SP	527	<i>Polyporus dictyopus</i>	Ilha do Cardoso, SP
458	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	IBt, São Paulo, SP	528	<i>Tyromyces duracinus</i>	Ilha do Cardoso, SP
462	<i>Marasmius helvelus</i>	São Vicente, SP	527	<i>Polyporus dictyopus</i>	Ilha do Cardoso, SP
463	<i>Pholiota discolor</i>	São Vicente, SP	528	<i>Tyromyces duracinus</i>	Ilha do Cardoso, SP

**Fase 3.** Seleção de fungos com alto potencial de degradação de lignina.

*Objetivo:* Selecionar, dentre as espécies de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos, linhagens com alta capacidade de degradar lignina e potencialmente capazes de degradar outros compostos orgânicos, como por exemplo organoclorados recalcitrantes.

**Metodologia:** A partir do cultivo de fungos em presença de bagaço de cana-de-açúcar ou palha de trigo foi verificada a perda de matéria orgânica do substrato, o aumento ou redução da digestibilidade e a degradação de lignina. Parte deste trabalho foi feito em Braunschweig, Alemanha.

**Resultados:** Alguns resultados estão expressos na Tabela 2 (Capelari, 1996).

TABELA 2. Perda de matéria orgânica (PMO), degradação da lignina(DL), digestibilidade *in vitro* (DIV) e pH a 25 e 30°C depois de 30 e 60 dias (peso seco).

FUNGO	T°C	dias de incubação							
		PMO %		DL %		DIV %		PH	
		30	60	30	60	30	60	30	60
CCB 161 <i>Agrocybe perfecta</i>	25	16,37	43,39	32,41	57,67	9,09	25,71	4,71	4,50
	30	28,04	57,92	48,07	55,85	20,45	1,48	4,67	5,09
CCB 211 <i>Agrocybe cf. platensis</i>	25	19,99	42,20	8,63	23,59	-3,57	-18,86	4,73	4,62
	30	16,63	30,31	0,00	4,74	-24,15	-27,35	5,32	5,15
CCB 215 <i>Agrocybe cf. platensis</i>	25	23,82	48,93	11,52	39,10	-24,28	-15,10	5,00	4,72
	30	26,29	33,84	5,27	20,89	-34,99	-33,94	5,25	5,74
CCB054 <i>Agrocybe sp.</i>	25	18,89	46,06	20,10	56,55	0,04	9,08	4,96	4,64
	30	32,05	52,12	35,83	46,45	8,67	0,47	4,69	5,00
CCB206 <i>Antrodia americana</i>	25	15,29	21,81	28,55	43,30	-2,67	-5,53	4,68	4,65
	30	19,80	31,28	29,37	43,87	-14,12	-5,73	4,85	5,05
CCB045 <i>Auricularia fuscusuccinea</i>	25	10,79	14,80	20,66	29,07	9,79	7,98	4,99	5,30
	30	16,90	21,74	32,65	47,23	28,84	22,58	5,03	5,21

**Fase 4.** Estudo e caracterização de exopolissacarídeos produzidos por basidiomicetos lignocelulolíticos cultivados em culturas submersas.

**Objetivo:** Conhecer os polissacarídeos extracelulares produzidos pelos fungos e liberados no meio, tendo em vista sua futura utilização em processos biotecnológicos.

**Metodologia:** Culturas de fungos em dois meios de cultura: Meio PGL com batata (200 g de batata, 2,0 g de extrato de levedura, 20,0 g de glicose, água até completar 1,0 litro, 15,0 g de agar - pH = 6,0, esterilização a  $\frac{3}{4}$ atm/20min) e meio de água de coco (200,0 ml de infusão de malte, 200,0 ml de infusão de batatas (40,0 g de batata), 200,0 ml infusão germe de trigo e fubá (10,0 g de germe de trigo e 10,0 g de fubá), 5,0 g de glicose, 5,0 ml de água de coco, 13,0 g de agar - pH = 6,0, esterilização a  $\frac{3}{4}$ atm/20min). A seguir, os fungos foram incubados a 25°C em meio líquido de 7 a 14 dias. Meio LA (1,0 g de peptona, 1,0 g de extrato de levedura, 4,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,85 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH = 6,0),



esterilizado em 1atm/15min e meio PDL (5,0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 g de extrato de levedura, 1,0 g de peptona, 1,0 g de  $\text{CaCO}_3$ , pH = 6,0), esterilização em 1atm/15min.

*Resultados:* Alguns resultados podem ser observados na Tabela 3.

TABELA 3. Produção de biomassa e exopolissacarídeos por basidiomicetos.

CCB	ESPÉCIE	DIAS	pH		biomassa (g/l)		polissac. (g/l)	
			pol	la	pol	la	pol	la
211	<i>Agrocybe platensis</i>	7	3.0	3.0	9.2	7.1	1.1	0.4
		14	2.8	2.8	11.2	8.2	1.7	0.8
111	<i>Coriolopsis rigida</i>	7	2.8	2.8	11.3	8.9	2.0	1.4
		14	5.4	2.9	8.2	10.0	3.3	4.1
188	<i>Gloeophyllum striatum</i>	7	3.2	3.2	5.0	3.7	0.2	0.2
		14	3.3	3.0	8.9	6.2	0.3	0.2
160	<i>Hypochnicium</i> sp.	7	2.3	3.2	12.4	8.8	1.8	1.2
		14	2.3	3.2	11.3	12.2	1.5	1.3
196	<i>Irpex lacteus</i>	7	3.8	4.1	13.7	8.1	4.3	3.7
		14	5.1	3.0	17.3	9.4	6.1	3.8
157	<i>Lachnocladium</i> sp.	7	2.3	3.1	14.2	17.7	3.1	1.3
		14	2.2	3.9	14.1	14.6	3.6	1.8
072	<i>Lentinula edodes</i>	7	6.6	6.0	7.3	6.5	2.1	1.3
		14	7.0	4.4	5.2	8.0	1.5	3.9
110	<i>Lepista</i> sp.	7	5.7	4.9	6.4	7.7	3.2	2.6
		14	4.2	3.3	14.9	8.3	3.9	2.8

### Fase 5. Produção de enzimas.

*Objetivo:* Verificar nas linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos a presença de enzimas relacionadas aos processos de biodegradação.

*Metodologia:* 5.1-Teste de Taylor (1975) para detectar a presença de algumas enzimas produzidas no meio de cultura. Apresentaram bom crescimento em meio de cultura 84 linhagens, que foram testadas para as seguintes enzimas: lacase, tirosinase, citocromo-oxidase, peroxidases e fosfatases. O teste consiste na formação de halo de cor diferente na cultura contendo bagaço de cana-de-açúcar. É um teste qualitativo e os resultados estão na tabela 4 (Okino *et al.*, 1995).

**Resultados:** Alguns resultados podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4. Presença de algumas enzimas em linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos.

ENZIMAS	Nº LINHAGENS RES. POS.	Nº LINHAGENS RES. NEG.	% PRESENÇA	CORANTE	COLORAÇÃO
Fosfatase	36	142	24	a-naftol fosfato 1% + Fast Read ITR base	púrpura
Citocromo- oxidase	155	23	83	Tetrametil- fenilodiamina (hidrogênio) clorado + ácido ascórbico 15ppm	azul
Peroxidase	163	15	89	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,4% + pirogalol 1%	amarelo- marrom
Tirosinase	56	122	26	p-cresol + etanol	laranja- marrom
Lacase	163	15	91	a-naftol	púrpura

### Medida da Produção de Enzimas

**Metodologia:** 44 linhagens de fungos com bom crescimento em laboratório, bom desempenho na degradação de lignina e positivas para o teste de produção qualitativa de enzimas lacases e peroxidases foram estudadas. Inicialmente, foi feita uma padronização da técnica utilizando *Phanerochaete chrysosporium*, linhagem já testada e fornecida pelo ATCC (American Type Culture Collection). A produção de enzimas foi medida em meio sólido com bagaço de cana-de-açúcar. A atividade total foi medida pela descoloração de Remazol azul brilhante e Peroxidases, usando o-Dianisidina como substrato (Machado *et al.*, 1995). Também foi feita medindo a atividade da lacase com ABTS (2,2-azinobis-3-etil-benzotiazol-6-ácido sulfônico), a Manganês peroxidase foi medida com uma mistura de MBTH (3-metil-2-benzotiazolina-hidrazo-hidroclorido) e DMAB (ácido 3-dimetilaminobenzóico) para duas espécies de cogumelos comestíveis: *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus* spp. (Capelari, 1996).

**Resultados:** Dos 44 basidiomicetos testados 11 mostraram significativa produção de enzimas, notadamente peroxidases. As duas espécies de cogumelos comestíveis (*Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus* sp.) produzem lacase e manganês peroxidase e a produção é dependente da temperatura de incubação e a qualidade varia em relação à idade da cultura (Capelari, 1996) (Tabela 5).

TABELA 5. Produção de complexo enzimático total (e) e peroxidases (pe) por alguns basidiomicetos.

Amostra	Taxa de cresc.em.MEA (cm/dia)	Tempo cultivo em meio VIII (dias)	E	PE (U/ml)
478	3,77	3	0,00	0,00
		5	0,10	0,03
		7	0,20	0,00
		10	0,00	0,00
165	1,61	5	0,40	0,13
		7	0,90	1,40
291	1,53	5	0,70	0,26
		7	1,00	0,43
204	1,15	7	2,00	5,89
		9	1,90	9,02
444	1,33	7	0,50	0,34
		9	0,30	0,49
376	1,50	5	0,00	0,00
		7	0,00	1,93
356	1,30	5	1,00	0,20
		7	1,50	0,41
467	1,61	5	0,10	0,05
		7	0,10	0,06
342	1,65	5	0,01	0,06
		7	0,00	6,35
426	1,76	5	0,00	0,09
		7	0,00	0,10
369	1,22	5	0,02	0,04
		7	0,42	0,11
375	1,48	5	0,10	0,01
		7	0,10	0,06
277	2,53	3	0,00	0,00
		5	0,10	0,01
		7	0,00	0,03
274	1,44	7	1,41	0,41
		7	0,60	0,09
381	1,44	5	0,40	0,16
		7	1,30	2,44
175	1,62	5	0,00	0,30
		7	0,00	0,27

**Fase 6.** Teste de crescimento de fungos em presença de organoclorados.

*Objetivos:* Selecionar linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos com boa capacidade de crescimento em solo contaminado com organoclorados (principalmente hexaclorobenzeno e pentaclorofenol) a diferentes con-centrações e pH.

*Metodologia:* Amostragem, homogeneização e caracterização de amostras de solo de Cubatão com altos teores de organoclorados. Quantificação dos organoclorados: pentaclorofenol, hexaclorobenzeno, tetracloroetileno, tetraclorobenzeno, hexaclorobutadieno, hexacloroetano, tetracloroetileno, tetracloreto de carbono, tricloroetileno, tricloroetano, clorofórmio. Inoculação dos fungos no meio contaminado em diferentes concentrações. Controles com solo esterilizado.

FUNGOS	VALOR			
	1	2	3	4
161	█			
165			█	
175	█			
176				█
184			█	█
196			█	█
204			█	█
213		█	█	
217		█	█	
271		█	█	
274			█	█
277		█	█	
291			█	█
305			█	█
356		█	█	
375	█			
376		█	█	
378			█	█
380		█	█	
381	█			
390	█			
444			█	█
446		█	█	
458	█			
467			█	█
478				█

*Resultados:* Determinação dos limites máximos de organoclorados e pH no solo, que não provocam inibição do crescimento e, portanto, potencialmente possíveis de utilização em biorremediação e determinação da atividade lignolítica (Tabelas 6 e 7).

TABELA 6. Relação dos fungos submetidos ao teste qualitativo de inibição de crescimento em presença de PCP.

VALOR ADOTADO	LIMITE DE TOLERÂNCIA AOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE HCB NO SOLO
1	Apresenta bom crescimento somente em solo não contaminado (0% de solo contaminado)
2	Apresenta bom crescimento em solo com níveis de contaminação até 4200 ppm de HCB no solo (10% de solo contaminado)
3	Apresenta bom crescimento em solo com níveis de contaminação até 21000 ppm de HCB no solo (50% de solo contaminado)
4	Apresenta bom crescimento em solo com níveis de contaminação até 42000 ppm de HCB no solo (100% de solo contaminado)

TABELA 7. Atividade ligninolítica total de basidiomicetos crescidos em solo contendo PCP (5.000 ppm) e HCB (25.000 ppm).

TRATAMENTO	COD	SOLO	ATIVIDADE LIGNINOLÍTICA TOTAL (RBB-R)				
			7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	meio sólido
T2	444	PCP	0.64	0.21	0.24	0.11	0.4
T3	176		3.07	3.35	0.91		1.6
T4	213		1.62	2.59	1.81		1.1
T5	161		0.16	0.00	0.27		0.00
T7	478		0.00	0.00	0.00		0.2
T9	444	HCB	1.74	1.18	0.63	0.00	0.4
T10	176		1.09	1.90			1.6
T11	204		15.80	3.32			1.9
T12	274		1.44	0.44	0.12		1.4
T13	478		0.23	0.00	0.00		0.2

**Fase 7.** Degradação *in vitro* de HCB e PCP.

*Objetivo:* Avaliar a capacidade de biodegradação *in vitro* de hexaclorobenzeno e de pentaclorofenol por basidiomicetos lignocelulolíticos, que apresentam bom crescimento em meio de cultura e tolerância a concentrações relativamente altas de organoclorados.

*Metodologia:* Foram previstas duas metodologias:

a) Por análise cromatográfica de alta eficiência com captura de elétrons de amostras do solo aos 15, 30 e 60 dias de incubação a 25°C com basidiomicetos lignocelulolíticos selecionados.

b) Utilizando hexaclorobenzeno e pentaclorofenol com todos os carbonos marcados com  $^{14}\text{C}$  e medindo o  $\text{CO}_2$  produzido e a radioatividade residual no substrato a 30, 60 e 90 dias.

*Resultados:* No experimento A os resultados mostraram grandes variações em cada caso, não sendo possível sua interpretação para o caso do HCB. Os resultados foram positivos para a degradação do PCP.

Para o HCB certamente houve problemas na homogeneização do solo e padronização das amostras. O solo foi homogeneizado, utilizando moinos de bolas e o experimento está sendo repetido.

O método B foi efetivamente realizado em fevereiro de 1996, em colaboração com a ESALQ-CENA em Piracicaba, SP.

**Fase 8.** Degradação de Pireno.

*Objetivo:* Testar linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos quanto à sua capacidade de degradar pireno, produto tóxico da combustão da madeira e carcinogênico.

*Metodologia:* O trabalho foi realizado na Alemanha, utilizando pireno com todos os carbonos marcados ( $^{14}\text{C}$ ).

*Resultados:* 57 linhagens brasileiras apresentaram resultado positivo para a degradação do pireno. Os resultados estão na Tabela 8 (Zadrazil, comunicação pessoal)

Degradação do pireno marcado com  $^{14}\text{C}$  através de fungo de podridão branca em cultura pura sobre palha de trigo.

**Fase 9.** Estudo Piloto de Biodegradação *in situ*.

*Objetivo:* Avaliar a capacidade de biodegradação *in situ* de solos contaminados por organoclorados, principalmente HCB e PCP por quatro linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos, selecionados nas fases precedentes, em função de capacidade de produção de enzimas

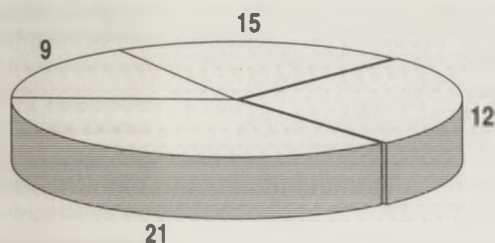
lignocelulolíticas, crescimento em presença de organoclorados e de biodegradação *in vitro*.

**Metodologia:** Definição do *design* dos pilotos, realização de testes preliminares com solo não contaminado. Preparo do local do experimento em área de propriedade da Rhodia, na Baixada Santista. Preparo do inóculo. Fumigação do solo a ser testado e já devidamente caracterizado. Inoculação dos pilotos. Acompanhamento da biodegradação por dosagens dos principais organoclorados a 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias após inoculação. Teste de sobrevivência dos fungos. Análise dos resultados.

**Resultados:** Até o momento apenas discussão sobre o *design* dos pilotos foi conduzida. O experimento deve ser montado e conduzido em 1996.

TABELA 8. Divisão do potencial de degradação das 57 linhagens de fungos da podridão branca.

Ganoderma lipsiensis CCB 323	$\Sigma = 58\%$	9 linhagens (30% - 45%)
Irpex lacteus CCB 196	$\Sigma = 46\%$	12 linhagens (>45%)
Lentinus sp. CCB 174	$\Sigma = 45\%$	15 linhagens (0% - 15%)
Lentinus crinitus CCB 212	$\Sigma = 46\%$	21 linhagens (15% - 30%)
P. chrysosporium CCB478	$\Sigma = 57\%$	
Pleurotus sp. CCB147	$\Sigma = 46\%$	
P. ostreatoroseus CCB 016	$\Sigma = 49\%$	
Pleurotus sp. CCB 068	$\Sigma = 48\%$	
Pleurotus sp. Flórida P 60 sajour-caju	$\Sigma = 51\%$	



Pleurotus sp. P2 pulmonarius	$\Sigma = 50\%$
Trametes pubesces CCB 166	$\Sigma = 47\%$

## RESUMO

Foi feita uma breve descrição das características gerais dos fungos basidiomicetos lignocelulolíticos assim como uma avaliação de seu potencial na degradação da lignina (a partir de dados da literatura).

Incluíram-se também os objetivos e resultados parciais do projeto para utilização de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos do Brasil na recuperação de solos contaminados por organoclorados, com ênfase na degradação de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUST, S.D. Degradation of environmental pollutant by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbial Ecology**, v.20, n.2, p.197-210, 1990.
- BONONI-PENTEADO, V.L.R. Basidiomicetos hidnóides da Micota Brasileira. São Paulo: Instituto de Biociências da USP, 1976. 314p. Tese, Doutorado.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: I. Espécies hidnóides. **Rickia**, v.8, p.85-90, 1979a.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: II. Hymenochaetaceae. **Rickia**, v.8, p.63-74, 1979b.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: III. Espécies clavarióides, teleforóides e estereóides. **Rickia**, v.8, p.105-121, 1979c.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, SP. **Rickia**, v.11, p.1-25, 1984.
- BONONI, V.L.R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S.F.B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Icone, 1995. 205p.
- BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B.; GRANDI, R.A.P. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. **Rickia** v.9, p.37-53, 1981
- BOOMINATHAN, K; REDDY, C.A. Fungal degradation of lignin: Biotechnological applications. In: ARORA, D.K.; ELANDER, R.P.; MUKERJI, K.D., **Handbook of Applied Mycology**, vol.4. New York: Marcel Dekker, 1992.
- BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood rotting fungus. Washington i American Chemical society, 1987a. p.340-349. (ACS Symposium Series,338.)
- BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of DDT (1,1,1-Trichloro-2,2-Bis (4-Chlorophenyl) Ethane) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.2001-, 1987b.
- CAPELARI, M. Agaricales do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (exceto Tricholomataceae). São Paulo; Instituto de Biociências da USP, 1989 356p. Dissertação, Mestrado.
- CAPELARI, M. Atividade Biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de Basidiomicetos: *Pleurotus* spp e *Agrocybe perfecta* (Rick) Sing. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. 154p. Tese. Doutorado.
- CAPELARI, M.; MAZIERO, R. Fungos macroscópicos de Rondônia, região dos rios Jarú e Ji-Paraná. **Hochnea**, v.15, p.28-36, 1988.
- CAVALCANTI, M.A.Q. Introdução ao conhecimento dos basidiomicetos poliporóides da Zona da Mata de Pernambuco. Recife: Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 1976. 200p. Tese, Livre Docência.



- FIDALGO, O. Revisão do gênero *Heteroporus* Laz. emend Donk. Piracicaba: Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1963. 116p. Tese, Doutorado.
- FIDALGO, M.E.P.K. Contribution to the fungi of Mato Grosso, Brazil. **Rickia** v.3, p.171-219, 1968.
- FIDALGO, O.; & BONONI, V.L.R., Coord. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico** São Paulo: Instituto de Botânica, 1984. Manual n.4.
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K. Revisão de fungii São Paulensis **Arquivos do Museu Nacional**, v.43, p.157-188, 1957.
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K. A new genus based on *Fistulina brasiliensis*. **Mycology**, v.54, n.4, p.342-352, 1962.
- FIDALGO, O; FIDALGO, M.E.P.K; FURTADO, J.S. Fungi of the "cerrado" region of São Paulo **Rickia**, v.2, p.55-71, 1965.
- FIELD, J.A.; HEESSELS, E.; WIJNGAARDE, K.; KOTTERMAN, M.; JONG, E.; BONT, J.A.M. The physiology of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp, strain 80555. In: **Applied Biotechnology for Site Remediation**, p.143-151. 1992.
- FONSECA, M.P. Aphyllporales da Reserva Florestal Armando de Salles Oliveira, São Paulo, São Paulo: Instituto de Biociências da USP, 1994. 171p. Dissertação, Mestrado.
- FURTADO, J.S. Some tropical species of *Ganoderma* (Polyporaceae) with pale cortex. **Persoonia** v.4, n.4, p.379-389, 1967.
- FURTADO, J.S. Taxonomy of *Amanoderma* (Basidiomycetes, Polyporaceae) **Memoirs of the New York Botanical Garden**. v.34, p.1-109, 1981.
- GUERRERO, R.T.; HOMRICH, M.H. **Fungos macroscópicos comuns do Rio Grande do Sul** Porto Alegre: Editora da Universidade, UFRGS, 118p., 1983.
- GUGLIOTTA, A.M. Polyporaceae do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. São Paulo: Instituto de Biociências da USP, 1994. 249p. Dissertação, Mestrado.
- HARTLEY, R.D.; FORD, C.W. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. In: LEWIS, N.G; PAICE, M.G., ed. **Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers**. ACS Symposium series, 399, p.137-145, 1985.
- HJORTSTAM, K.; BONONI, V.L. Fungos corticióides do Brasil (Aphyllporales). **Rikia**, v.13, p.113-125, 1986.
- JONG, S.C; BIRGMINGHAM, J.M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in Applied Microbiology**, v.37, p.101-134, 1992.
- JONG, S.C.; BIRGMINGHAM, J.M. Medicinal and Therapeutic Value of the shiitake mushroom. **Advances in Applied Microbiology**, v.39, p.153-184, 1993.
- JONG, S.C.; DOROVICKI, R. Antitumor and antiviral substances from fungi. **Advances in Applied Microbiology**, 1989.
- KIRSOP, B.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods**. London: Academic Press, 1984. 184p.
- LAMAR, R.T.; DIETRICH, D.M. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.10, p.3093-3100, 1990.
- LEITE, C.L. Políporos (Basidiomycotina) xilófilos de la Ilha de Santa Catarina, Brasil. Buenos Aires; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1990. 328p. Tese, Doutorado.
- MACHADO, K.M.G.; SILVA, W.R.F.; BONONI, V.L.R. Screening of lignolytic fungi for soil remediation II: production of peroxidases and phenoloxidases. Resumo in Abstracts books of second Latin American Biodegradation and Bioderiation Symposium. p.35.1995.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; ADAMI, A.; BONONI, V.L. Exopolysaccharide and biomass production in submerged culture by edible mushrooms. **Mushroom Science**, v.14, n.2, p.887-892, 1996.
- OKINO, L.K.; LUCON, C.M.M.; BONONI, V.L.R. Seleção de basidiomicetos nativos para atividade ligninolítica *in vitro*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46. **Resumos** Ribeirão Preto, 1995. **Resumos** p. 53-54.

- RICK, J. Basidiomycetes Eubasidii in Rio Grande do Sul, Brasília. Index (Rambo, B. ed.) **Iheringia**. Serie Botânica, v.11, p.1-32, 1963.
- SAKAKIBARA, A. Chemical structure of lignin related mainly to degradation products. In: IGUCHI, T.; CHANG, H.M.; KIRK, T.K., eds. **Recent Advances in Lignin Biodegradation Research**, p.12-33 (UNI), 1983.
- SHEWALE, J.G.; SADANA, J.C. Enzymatic hydrolysis materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar productions. **Canadian Journal of Microbiology**. v.25, p.773-783, 1979.
- SILVA, J.V.B. Contribuição ao conhecimento dos fungos poliporáceos na arborização de João Pessoa. PB, Brasil. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Universidade de Federal de Pernambuco, 1987. 106p. Dissertação, Mestrado.
- SILVEIRA, R.M.B. Aphyllophorales poliporóides (Basidiomycetes) do Parque Nacional de Aparados da Serra, RS. Porto Alegre: Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990. 204p. Dissertação, Mestrado.
- SOUZA, M.A. Contribuição ao estudo do gênero *Phellinus* Quelet (hymenochaetaceae) da reserva Florestal do Parque Estadual Turvo Tenente Portela, RS. Porto Alegre: Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1977. 167p. Dissertação, Mestrado.
- SOUZA, M.A. O gênero *Phellinus* Quélet (Hymenochaetaceae) na Amazônia Brasileira. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1980. 199p. Tese, Doutorado.
- SUSIIN, V.L.M., Biologia de Aphyllophorales xilófilos (basidiomycetes). Porto Alegre: Instituto de Biociências, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 1987. 167p. Dissertação, Mestrado.
- TAYLOR, J.B. Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. **Annals of Applied Biology**. v.78, p.113-123, 1974.
- TEIXEIRA, A.R. Himenomicetos brasileiros: Hymeniales Theleporaceae. **Boletim Técnico**. Divisão de Experimentação e Pesquisas — Instituto Agrônômico, n.7, p. 397-434, 1945
- TEIXEIRA, A.R. Himenomicetos brasileiros : Polyporaceae 2 **Bragantia** v.10, p.13-120, 1950.
- THEISSEN, F. Polyporaceae austro-brasiliensis imprimis Rio Grandensis. **Denkschriften der Akademie de Wissenschaften**. v.83, p.31-37, 1911.
- TORREND, C. As poliporáceas da Bahia e estados limítrofes. In: REUNIÃO SUL-AMERICANA DE BOTÂNICA, 1., Rio de Janeiro, 1938. **Anais** v.2, p.325-341.
- VIEGAS, A.P. A pedra flexível descrita por Anchieta. **Bragantia**. v.18. p.31-37, 1959.
- VYAS, B.R.M.; BAKOWISKI, S.; SASEK, V. & TATUCHA, M. Degradation of anhracene by selected white rot fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v.14, p.65-70, 1994.

---

# BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E TRATAMENTO DE EFLUENTES POR FUNGOS LIGNINOLÍTICOS

---

Nelson Durán

Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica,  
Universidade Estadual de Campinas,

Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP

Elisa Esposito

Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello  
Campinas, SP

---

## BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA NA MADEIRA

### Fungos Degradadores de Lignina

Os fungos degradadores da madeira podem ser divididos em três grupos, de acordo com a morfologia da degradação que produzem: fungos de degradação branca, marrom e macia. Os fungos degradadores da madeira são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence à subdivisão *Basidiomycotina*. Os basidiomicetos de degradação branca são os mais eficientes organismos degradadores de lignina. São capazes de mineralizar lignina, eventualmente até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Kirk & Farrell, 1987; Rodriguez & Durán, 1988; Orth *et al.*, 1993; Hatakka, 1994; Tuor *et al.*, 1995).

Os fungos de degradação marrom e macia são capazes de degradar lignina em alguma extensão, embora preferencialmente ataquem a celulose na madeira.

### Fungos de Degradação Branca

Os basidiomicetos causadores de degradação branca na madeira produzem degradação seletiva da lignina na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta (Blanchette, 1991; Blanchette *et al.*, 1994). Entretanto, esses fungos variam consideravelmente, de acordo com o tipo de ataque à lignina e aos polissacarídeos da madeira. Além disso, demonstram velocidades diferentes na remoção da lignina (Kirk & Farrell, 1987).

Com base nessas propriedades, os fungos de degradação branca podem ser divididos em dois subgrupos: a) fungos que degradam simultaneamente todos os componentes, aproximadamente à mesma velocidade; b) fungos que preferentemente degradam lignina. Os últimos, que degradam seletivamente a lignina, criam tipicamente áreas localizadas de degradação, e assim são designados fungos de bolsos brancos ou manchados (Eriksson, 1990).

A identificação dos fungos de degradação branca é baseada nas características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria dos basidiomicetos tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (Blanchette, 1991). Sua habilidade comum é oxidar compostos fenólicos, relacionados à lignina, que na maioria das vezes está associada a enzimas extracelulares ligninolíticas, em particular lacases.

Estudos de microscopia eletrônica nos últimos anos têm revelado que esses fungos colonizam a madeira, invadindo o lúmen de traqueídeos e fibras, segregando enzimas que degradam lignina e polissacarídeos (Ruel *et al.*, 1990; Daniel *et al.*, 1992; Ruel & Joseleau, 1991; Barrasa *et al.*, 1992).

## Fungos de Degradação Marrom

Produzem tipicamente uma quebra extensiva dos polissacarídeos da madeira (ex.: celulose e hemicelulose) e deixam a maioria da lignina intacta. Logo, a madeira degradada por esses fungos tem um aspecto amarronzado e de aparência frágil (Blanchette, 1991). Os fungos de degradação marrom predominantemente atacam madeiras moles, enquanto os de degradação branca são eficientes no ataque a madeiras duras. Os fungos responsáveis pela degradação marrom também pertencem a Basidiomycotina e a maioria das espécies à família Polyporaceae; entretanto correspondem a apenas 6% de todos os basidiomicetos que degradam a madeira (Rayner & Boddy, 1988).

Embora esses fungos não sejam capazes de efetivamente despolimerizar a lignina, podem fazer modificações, resultando em decréscimo dos grupos metoxilas da lignina da madeira. Logo, os grupos fenólicos aumentam significativamente (Jin *et al.*, 1990), alterando a lignina para subseqüentes biodegradações. Além disso, um aumento dos grupos hidroxilas alifáticos, como os carboxílicos, também produzem quebras parciais de interunidades de ligações com cadeias laterais (Jin *et al.*, 1990). Portanto, não se pode generalizar: as propriedades da degradação mostram grande variedade entre as espécies (Eriksson *et al.*, 1990).

O mecanismo pelo qual os fungos de degradação marrom modificam a lignina é ainda desconhecido, já que não produzem enzimas ligninolíticas. Acredita-se que moléculas pequenas (glicoproteínas), que que-

lam ferro, poderiam estar participando das transformações da lignina via produção de radicais de hidroxila (Enoki *et al.*, 1990; Backa *et al.*, 1992; Durán, 1996).

Os fungos de degradação marrom produzem porosidade e erosão nas células da parede da madeira, devido a uma quebra rápida do suporte celulósico das microfibrilas (Eriksson *et al.*, 1990). Perda da lignina, em particular das células dos cantos, e remoção dos grupos metoxilas são visualizadas por técnicas de microscopia eletrônica (Blanchette, 1991). Com base nessa observação, as hifas de fungos de degradação marrom podem ser divididas em dois grupos fisiológicos (Highley *et al.*, 1985): a) hifas que degradam todos os componentes da parede celular da madeira, incluindo a lignina; b) hifas que podem somente modificar a lignina, quando estão degradando os polissacarídeos da madeira. Microfibrilas específicas, por exemplo extensões lineares e emaranhado de células da parede da hifa, recentemente foram detectadas nesses fungos (Larsen *et al.*, 1992), que podem transportar enzimas hidrolíticas a um contato direto com seu substrato (Green *et al.*, 1992).

### Fungos de Degradação Macia

Os fungos pertencentes a *Ascomycotina* e *Deuteromycotina* podem causar um tipo específico de degradação na madeira, caracterizada por ser suave, de aparência úmida, que sob condições de secagem pode lembrar a degradação do tipo marrom (Blanchette, 1991). A degradação macia inclui cavidades na camada S2 das células da parede da madeira, abertas por penetração fina das hifas (Eriksson *et al.*, 1990). A formação de cavidades segue a orientação de microfibrilas na parede secundária, que é designada como degradação do Tipo 1. Células da parede da madeira podem também ser degradadas adjacientemente às hifas, degradação designada do Tipo 2. De acordo com a morfologia, há fungos de degradação macia responsáveis por degradação tanto do Tipo 1 como do Tipo 2 ou uma combinação de ambos, mas não existem fungos para decomposição somente do Tipo 2 (Nilsson, 1985; Nilsson *et al.*, 1989).

Os fungos de degradação macia preferencialmente colonizam e degradam madeiras duras, especialmente as de alta umidade (Eslyn *et al.*, 1975). Em madeiras moles, a velocidade de degradação por fungos de degradação macia é geralmente mais lenta que a dos fungos de degradação branca e marrom. Embora estes normalmente metabolizem os polissacarídeos da madeira, são capazes de algumas transformações da lignina. No caso dos fungos de degradação marrom, a lignina é usualmente modificada por desmetilação (Eslyn *et al.*, 1975). Entretanto, os fungos de degradação macia são deficientes na despolimerização de ligninas sintéti-

cas, embora convertam rapidamente compostos fenólicos relacionados com lignina (Ander *et al.*, 1988). Isso deixa mais discrepâncias na natureza dos agentes e nos mecanismos dos fungos de degradação macia, no possível envolvimento na degradação de lignina. Entretanto, em ascomicetos, como por exemplo *Chrysonilia sitophila*, foram isoladas isoenzimas de lignina peroxidase, que se mostraram semelhantes às de fungos de degradação branca, como o *Phanerochaete chrysosporium* (Durán *et al.*, 1987a,b; Ferraz *et al.*, 1991; Ferrer *et al.*, 1992; Ferraz & Durán, 1995; Rodriguez *et al.*, 1997). Estudos de degradação de madeira mole sugerem quebras oxidativas em ligações Ca-Cb e b-O-aril na lignina. Outro ascomiceto estudado recentemente é o *Thermoascus aurantiacus* (Machuca & Durán, 1992; Machuca *et al.*, 1993). Uma das enzimas importantes nesse fungo é a fenoxidase (Machuca & Durán, 1993, 1996). Também, assim como os fungos de degradação branca e marrom, estes produzem moléculas de baixo peso molecular que degradam lignina e geram aparentemente radicais hidroxilas (Machuca *et al.*, 1995a,b; Durán & Machuca, 1995; Durán, 1995)

## ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

### Aspectos Gerais

A atividade de fenoxidases extracelulares, indicando a presença de enzimas ligninolíticas, foi descoberta na década de 30 em fungos de degradação branca (Eriksson *et al.*, 1990); logo depois foi demonstrado que as reações eram catalisadas por oxidoredutases do tipo de lacases e peroxidases (Kirk, 1971; Ander & Eriksson, 1976). A habilidade para oxidar compostos fenólicos, especificamente, tem sido utilizada como critério de identificação para fungos de degradação branca verdadeiros (Käärik, 1965). Em seguida ao isolamento e caracterização de lacases, duas peroxidases, chamadas lignina peroxidase e Mn-peroxidase, foram evidenciadas na participação da quebra da lignina e outras enzimas. Essas enzimas, além daquelas relacionadas à quebra da lignina, como a produção de peróxido de hidrogênio, são indispensáveis para ligninólise e logo devem ser também relatadas (Niku-Paavola *et al.*, 1995).

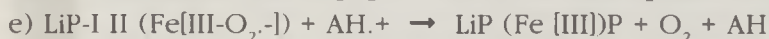
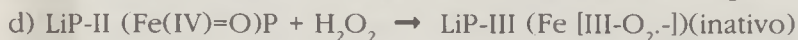
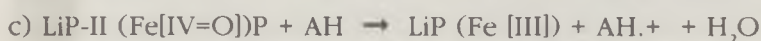
### Lignina Peroxidase

No ano de 1983, dois grupos relataram a descoberta da enzima extracelular degradadora de lignina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (Glend *et al.*, 1983; Tien & Kirk, 1983). A enzima, primeira-

mente chamada de ligninase, é uma glicoproteína, que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica. Estudos subsequentes revelaram que a lignina peroxidase (LiP) (nome atual) de *P. chrysosporium* apresenta múltiplas formas com pI de 3,2-4,7 e massa molar de 38-43 kDa. Diferentes LiPs têm sido isoladas, dependendo da cepa, condições de cultura, idade e tipo de separação (Gold *et al.*, 1989).

Lignina peroxidases têm sido isoladas em numerosos fungos de degradação branca, e em alguns fungos de degradação marrom e macia.

O ciclo catalítico da lignina peroxidase fundamentado na peroxidase de raiz forte é o seguinte (Dunford, 1991; Wariishi & Gold, 1991; Wariishi *et al.* 1991a,b; Barr & Aust, 1994a,b; Harvey & Candeias, 1995; Khindara *et al.* 1995):

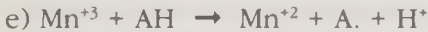
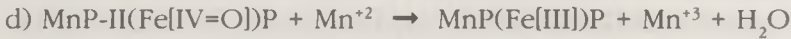
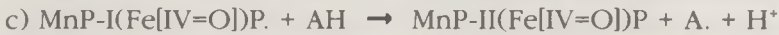
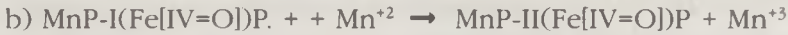
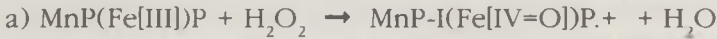


A lignina peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, é capaz de degradar compostos fenólicos e não fenólicos. Também degrada anéis aromáticos alcoxilados do tipo da lignina como também quebras de anéis em modelos da lignina dimérico como poliméricos e as cloroligninas (Dezotti *et al.*, 1995). Em resumo, a LiP gera: a) oxidação de álcoois benzílicos, b) quebra de cadeias aromáticas laterais Ca-Cb, c) desmetilação, d) rearranjos intramoleculares, e) quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina (Gold *et al.*, 1989). Álcool veratrílico tem um papel importante na catálise da LiP: é o redutor preferido pela enzima, produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise, e aparentemente protege a enzima contra a inativação do excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool veratrílico a veratraldeído, que é comum nos ensaios da atividade da LiP. *In vitro*, LiP degrada ligninas metiladas de “spruce e birch”, como de palha de milho (Vares *et al.*, 1995) e ligninas sintéticas (Sayadi & Odier, 1995; Rothschild *et al.*, 1995; Tapia & Vicuña, 1995).

## Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase MnP foi descoberta em *P. chrysosporium* junto à LiP (Kuwahara *et al.*, 1984). Essa enzima é muito semelhante à LiP:

é extracelular, glicosilada, massa molar de 45-47 kDa e possui um grupo protético heme. Entretanto, esta é dependente de peróxido de hidrogênio e do íon  $Mn^{+2}$ , e a-cetoácido como lactato estabiliza sua atividade oxidativa. O ciclo catalítico da MnP é similar ao da LiP (Gold *et al.*, 1989; Poulus *et al.*, 1995; Merslen *et al.*, 1995):



Na presença de peróxido de hidrogênio, MnP/Mn<sup>+2</sup>/malonato catalisa quebras Ca-Cb, oxidações Ca e quebras de ligações arilalquílicas de fenóis siringílicos diméricos b-1 e b-O-4 (Tuor *et al.*, 1992).

Embora a mineralização efetiva de ligninas sintéticas se correlacionem com baixo teor de Mn, com elevadas da LiP e baixa MnP, outros dados implicam a MnP na degradação da lignina. A MnP é implicada na degradação de cloroligninas e não a LiP (Michel *et al.*, 1991). A MnP também desmetila e deslignifica polpas Kraft (Paice *et al.*, 1993; Kaneko *et al.*, 1995).

## Lacases

Lacases são fenoloxidasas produzidas por fungos e por plantas, e pertencem ao grupo de oxidases que complexam cobre. Essas enzimas são segregadas na maioria dos basidiomicetos. As massas molares estão dentro da faixa de 60-100 kDa. A lacase de *T. versicolor* possui 4 átomos de cobre e todos no estado de oxidação 2<sup>+</sup> na enzima nativa, mas em três tipos iônicos: uma do tipo I, outra do tipo II e duas no tipo III, tendo diferentes coordenações no sítio ativo. Nos tipos I e II, os íons de cobre são Cu<sup>+2</sup> e paramagnéticos, enquanto nos dois do tipo III os íons formam um par binuclear antiferromagnético não detectável por EPR. As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos, gerando radicais fenoxilos (Forss *et al.*, 1989; Higuchi, 1990):



Os radicais formados rapidamente atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Logo, essas reações múltiplas levam a:



- a) polimerização;
- b) quebras alquiáricas;
- c) oxidações nos Ca e desmetilações (Katase & Bollag, 1991).

A lacase de *T. versicolor* pode oxidar modelos de lignina não fenólicos na presença de ABTS ou siringaldeído, logo se assemelhando à LiP (Bourbonnais e col., 1995). Recentemente foi proposto outro mediador, o 1-hidroxibenzotriazole, que permite 50% de deslignificação de polpas na presença de lacases (Call & Mucke, 1995).

### Outras Enzimas Relacionadas com Degradação da Lignina

Existem enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, por exemplo, glicose 1-oxidase (GO), que preferencialmente oxida glicose, e glicose-2-oxidase (POD) (Kurek & Kersten, 1995), que oxida glicose, xilose ou d-D-gliconolactona no C<sub>2</sub> (Evans e col., 1991). Álcool oxidase, ácidos graxos CoA oxidase, glioxal oxidase e arilálcool oxidase são outras das enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (Eriksson *et al.*, 1990; Kersten, 1990; Guillén *et al.*, 1992; Marzullo *et al.*, 1995). Outras enzimas que podem ser relacionadas com degradação da lignina são a NAD(PH): quinona oxido redutase, a celbiose: quinona 1-oxidoreductase (CBQ), celbiose desidrogenase (CDH), celbiose oxidase (CBO) e peroxidase independente de manganês (Constam *et al.*, 1991; Ander *et al.*, 1993; Bao *et al.*, 1993; Costa-Ferreira *et al.*, 1992; Ander, 1994; Vyas & Molitoris, 1995; Henriksson *et al.*, 1995; Feijoo *et al.*, 1995).

## IMPORTÂNCIA DAS CONDIÇÕES ECOLÓGICAS

Como todos os basidiomicetos degradam os três componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, embora a diferentes velocidades e extensão, baseados nesse conceito têm-se dividido os fungos de degradação branca em classes de degradadores simultâneos da lignina com polissacarídeos ou degradadores seletivos (Blanchete, 1991). Esta classificação tem se mostrado difícil, pelo fato de que os fungos de degradação branca podem apresentar ambos os comportamentos, quando estão atuando no mesmo substrato ou atacam a lignina e polissacarídeos seqüencialmente (Eriksson *et al.*, 1990). As condições ambientais, tais como temperatura, umidade, microclimas, conteúdo de nitrogênio dos substratos e compartimentalização, podem também governar a seletividade da biodegradação da lignina *in vivo* (Tuor *et al.*, 1995). Os gases na madeira podem influenciar as atividades enzimáticas, já que, por exemplo, a nível de hifas, elevadas concentrações de dióxido de carbono com

concomitante depressão de oxigênio sugerem que a degradação de lignina *in vivo* pode acontecer sob condições microaeróbicas. *P. chrysosporium* degrada eficientemente lignina/dioxano de palha em atmosfera de 30% de dióxido de carbono e 10% de oxigênio. Há informação de que o oxigênio puro é tóxico para fungos (Tuor *et al.*, 1995). A degradação da lignina ocorre a pHs baixos. Seus ótimos diferem entre as espécies. *P. chrysosporium* degrada lignina a pH 4 com perda da atividade a pHs mais baixos. Em outro estudo a degradação da lignina por *P. chrysosporium* e *Pleurotus sajor-caju* aumenta a atividade com decréscimo do pH abaixo de 3 (Boyle *et al.*, 1992). De acordo com a literatura, a LiP do *P. chrysosporium* tem atividade ótima a pH 3,0 e MnP a pH 4,5. Para lacase de *P. noxius* o pH é 4,6. O pH dos substratos naturais varia entre 4 e 6, tanto para madeiras duras como moles, e corresponde ao ótimo crescimento para a maioria dos fungos que degrada madeira. Além disso, os fungos podem manter o pH ambiental baixo a nível das hifas, secretando camadas finas de polissacarídeos (Buchala & Leisola, 1987).

## ESQUEMA DA BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINAS

A despolimerização da lignina pode ser considerada como um processo oxidativo, mas a metabolização dos fragmentos da lignina envolve a combinação de processos oxidativos e redutivos.

A compartimentalização das conversões oxidativas e redutivas pede um potente mecanismo de transporte nas células das paredes. Evidên-

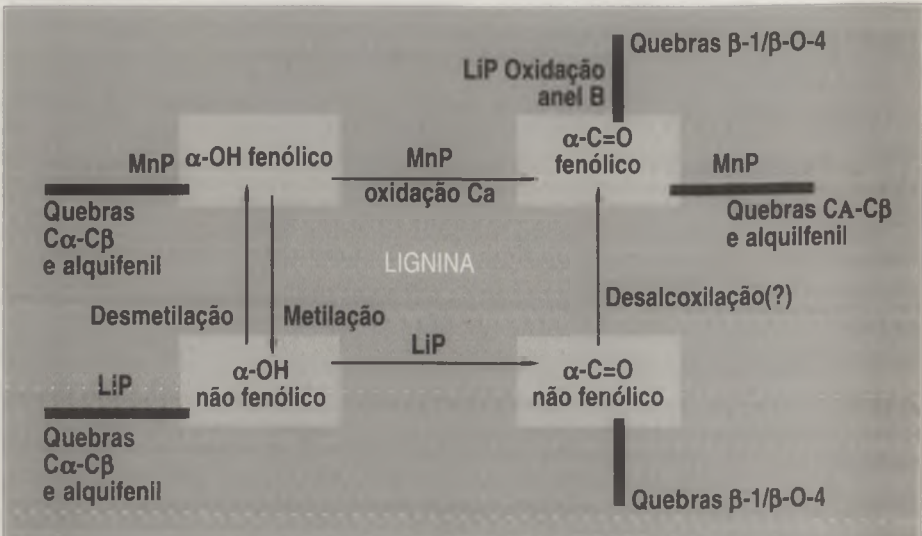


FIGURA 1. Esquema da biodegradação de ligninas (Tuor *et al.*, 1995).

cias para isto foram dadas através da remoção dos substratos da quinona redutase em culturas líquidas de *P. chrysosporium* e da observação de secreção subsequente e imediata dos produtos de redução pelas células (Tuor *et al.*, 1993). Um esquema hipotético foi apresentado por Tuor *et al.* (1995) (Fig. 1).

## ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E SEU PAPEL NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

### Tratamento Biológico de Efluentes

A industrialização da polpa e papel kraft produz uma grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, extremamente daninhos ao ambiente. Neste trabalho serão analisados os efluentes líquidos provenientes desse processo, os tratamentos convencionais aplicados na indústria papeleira e o tratamento fúngico como um método alternativo.

Os efluentes originados da produção do branqueamento das polpas kraft contêm açúcares provenientes da madeira, carboidratos, ácidos orgânicos, ácidos resinosos, compostos neutros e produtos da transformação de ligninas, além de uma série de organoclorados derivados (Fulthorpe & Allen, 1995). Estes últimos são formados a partir das reações entre a lignina presente nas fibras e o cloro empregado para o branqueamento.

Os efluentes podem causar toxicidade aguda ou crônica, mutagenicidade, deficiência de oxigênio, eutroficação nos corpos de água receptores e, por conseqüência, modificações nas comunidades de plantas e animais (Kautsky, 1992; Leonardsson, 1993). Certos compostos foram determinados por serem altamente recalcitrantes. Recentemente foi constatada a presença de dioxinas (polifenóis clorados) altamente tóxicas (a nível de parte por trilhão) em polpas branqueadas com cloro molecular e seu licor residual de branqueamento (Mountheer *et al.*, 1992; Zini, 1993). A princípio, pouca atenção foi dada ao problema (McCubbin, 1994). Em 1983 foram encontrados traços de dioxinas e furanos em peixes no rio Wiscosin, nos EUA. Mais tarde, em 1986, pesquisadores suecos constataram deformidade em peixes no mar Báltico, próximo da área de lançamento de efluentes de uma indústria papeleira (Odendahal, 1994). A forma mais tóxica de dioxina clorada, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, já foi eliminada das indústrias papeleiras na América do Norte.

As dioxinas são os compostos químicos mais tóxicos regulados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA/EUA). Em vista do impacto ambiental causado por esses efluentes, esforços têm sido feitos com o objetivo de

reduzir ou eliminar o uso de compostos clorados das etapas de branqueamento da polpa kraft. A tendência atual é a substituição desses compostos por agentes à base de oxigênio (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio).

Entretanto, as perspectivas são de que, pelo menos nos próximos 15 anos, ainda se utilizem compostos clorados (Odendahal, 1994). Em 1992, a produção mundial de polpa totalmente livre de cloro (TCF-*totally chlorine free*) atingiu somente 1% (Odendahal, 1994).

Informações recentes confirmam que a produção de polpa TCF permanece praticamente a mesma (Dra. Dâmaris Pereira – Centro de Pesquisa e Tecnologia, Aracruz Celulose S.A., comunicação pessoal, 1995). O problema, recentemente descoberto (Peck & Dalley, 1994), é que os efluentes originados do processo apresentam toxicidade crônica e os compostos ainda não foram identificados. Entretanto, sabe-se que os efluentes possuem uma alta porcentagem de peróxido de hidrogênio, o que dificulta o tratamento biológico por fungos, uma vez que as enzimas ligninolíticas estariam sendo inativadas nessas condições. A perspectiva atual é a produção de polpas ECF (*elementary chlorine free*), processo no qual se utiliza dióxido de cloro, ao invés do cloro elementar. No que diz respeito ao Brasil, podemos citar como exemplo as indústrias Aracruz Celulose S.A. (ES), onde parte da produção total de celulose (1,025 milhão de t/ano) está sendo branqueada com oxigênio e dióxido de cloro. Adicionalmente a empresa está desenvolvendo estudos sobre a relação siringil/guaiacil e seu impacto no processo kraft, além de considerar modificações genéticas na lignina de espécies de eucaliptos (Pereira *et al.*, 1995). A Ripasa Celulose Papel (SP) introduziu o peróxido de hidrogênio no branqueamento, substituindo, dessa forma, 30% dos compostos clorados (Anônimo, 1993). A Riocell (RS) vem investindo em pesquisas, em conjunto com a Universidade de Georgia (EUA) e a Universidade Estadual de Campinas (Brasil), sobre oxigênio, xilanases, ozônio e peróxido de hidrogênio (Yang *et al.*, 1993; Angelo *et al.*, 1995, 1996). Felizmente a maioria das empresas tem demonstrado preocupação em reduzir os níveis de poluição e implementar novas tecnologias para a redução dos compostos clorados. Supõe-se que essa preocupação se deva principalmente às crescentes pesquisas desenvolvidas na área, à ação de ambientalistas, às pressões do mercado externo e também da opinião pública.

### Tratamentos de Efluentes mais Empregados pelas Indústrias

As lagoas de estabilização ou lagoas aeradas são frequentemente empregadas para reduzir os níveis de sólidos suspensos e a demanda bioquímica de oxigênio de efluentes kraft. O decréscimo tanto das quan-

tidades de AOX (uma estimativa do total de organoclorados) quanto da toxicidade é muito variável (Fulthorpe & Allen, 1995). As lagoas aereadas são o método mais comumente empregado pelas indústrias papeleiras. Possuem aproximadamente 2-6 m de profundidade e têm um tempo de detenção de menos de 10 dias. São mecanicamente aereadas com difusores de ar ou aeradores mecânicos. A eficiência do processo depende do tempo de aeração, da temperatura e do tipo de efluente. Aproximadamente 80% da população microbiana das lagoas de tratamento são bactérias Gram-negativas e apenas 1% são bactérias anaeróbicas facultativas (Liss & Allen, 1992). O efluente gerado a cada novo processo varia muito. A temperatura ambiental, à qual está exposta a lagoa, não é um valor constante, o tipo de madeira empregada para a polpação também afeta a microflora local. Logo, é de se esperar que o tratamento apresente tantas variações nas reduções de toxicidade e AOX. Outro tratamento empregado por algumas indústrias papeleiras é o lodo ativado. O processo consiste essencialmente de um tratamento aeróbico, que oxida a matéria orgânica a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4$ , e nova biomassa. O ar é provido por aeração mecânica ou por um difusor. As células microbianas formam flocos. Uma característica importante do lodo ativado é a recirculação de uma grande proporção da biomassa. Essa prática ajuda a manter um grande número de microrganismos, que efetivamente oxidam compostos orgânicos em um tempo relativamente curto. O tempo de detenção varia de 4 a 8 horas (Bitton, 1994). Entretanto, a quantidade de lodo formado é muito alta. Essa é uma séria desvantagem do método.

### **Métodos Alternativos de Tratamento de Efluentes: o Potencial de Fungos de Decomposição Branca e Macia no Tratamento de Efluentes**

Os fungos de decomposição branca possuem um sistema enzimático extracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (Barr & Aust, 1994).

O processo de obtenção de polpas celulósicas e de fabricação de papel é um dos responsáveis pela maior carga poluente, que atinge os ecossistemas na forma de efluentes ou resíduos sólidos, altamente tóxicos e, muitas vezes, mutagênicos, persistentes e/ou bioacumulativos (Eriksson, 1990; Mehta & Gupta, 1991; Onysko, 1993). O efluente proveniente da primeira extração alcalina contém compostos clorados de alta e baixa massa molar, cloroligninas e clorofenóis, respectivamente. A cor escura do efluente é atribuída essencialmente a esse estágio ( $E_1$ ).

A utilização de fungos objetiva a descontaminação dos efluentes. A eficiência desses processos está diretamente relacionada com a capacidade do fungo em degradar lignina (Mehta & Gupta, 1991; Onysko, 1993).

Enzimas, como lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), são produzidas por esses fungos, em geral, como resposta a baixas concentrações de fontes de carbono, nitrogênio ou nutrientes sulfurados. Existem evidências indicando que essas enzimas são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina. Manganês e peroxidases dependentes de manganês foram relacionados na degradação enzimática da lignina. Entretanto, o papel específico do manganês é incerto. Forrester *et al.* (1988) observaram que, na ausência da enzima, o  $Mn^{3+}$  quelado foi um agente ligninolítico capaz de oxidar álcool veratrílico, compostos modelo de lignina e lignina. Foi demonstrado que a atividade ligninolítica de *Lentinula* (= *Lentinus*) *edodes*, atualmente selecionado para o tratamento de efluentes (Esposito, 1992; Esposito, 1995; Esposito *et al.*, 1995; Massai *et al.*, 1995), é dependente da adição de manganês (Leatham 1986). Acredita-se que, sob condições adequadas, o  $Mn^{3+}$  gerado por MnP possa ser uma parte importante do sistema ligninolítico de *L. edodes* e de outros fungos de decomposição branca (Forrester *et al.*, 1988). A principal peroxidase extracelular detectada em culturas de *L. edodes* foi a MnP (Forrester *et al.*, 1990). A enzima foi purificada e estudada, quanto às suas características e seqüência de aminoácidos. O efeito de vários compostos fenólicos derivados da lignina sobre o crescimento e degradação por *L. edodes* foi estudado por Shuen *et al.* (1992). A eficiência desse organismo na descontaminação de efluentes, provenientes das indústrias de polpa e papel, foi previamente demonstrada (Esposito *et al.*, 1991; Esposito, 1992; Esposito *et al.*, 1993a; Esposito, 1995; Esposito *et al.*, 1995; Massai *et al.*, 1995). *L. edodes* foi selecionado entre 51 cepas de fungos ligninolíticos para descoloração de efluente kraft E<sub>1</sub> (Esposito *et al.*, 1991). Após 5 dias de tratamento biológico, sem fonte adicional de carbono e nitrogênio, obtiveram-se 60% de redução de DQO e 73% de descoloração e desse total apenas 13% foram devidos à adsorção micelial. Em um trabalho posterior com *L. edodes* UEC-2021, obtiveram-se valores de 83% de descoloração, 53% de remoção de fenóis totais, 60% de redução de carbono orgânico total após 5 dias de tratamento (Esposito, 1995). Esse fungo mostrou-se altamente eficiente na descontaminação de efluente E<sub>1</sub>.

As MnP participam de reações de despolimerização de ligninas sintéticas (Wariishi *et al.*, 1991a,b), degradação de cloroligninas de alta massa molar (Lackner *et al.*, 1991), descoloração de efluentes do tipo kraft (Michel *et al.*, 1991).

O papel da LiP e MnP na descoloração de efluentes de branqueamento foi estudado por Michel *et al.* (1991). Nesse estudo foi evidenciada a importância das peroxidases extracelulares na descontaminação de efluentes, entretanto MnP parece ter um papel predominante sobre LiP. Esses resul-

tados foram corroborados por outros autores em trabalhos anteriores (Perez & Jeffries, 1990) e posteriores (Lee *et al.*, 1994; Jaspers *et al.*, 1994). Neste último, foi demonstrado que MnP, mas não LiP, foi produzida por *P. chrysosporium* (Basidiomycete) no efluente E<sub>1</sub> e que o tipo de pellet formado pelo fungo tem uma importância significativa sobre a produção enzimática. Lee *et al.* (1994) observaram que, durante o tratamento do efluente E<sub>1</sub> com o fungo ligninolítico KS-62, foram produzidas altas taxas de MnP e muito pouco ou nada de LiP. Esse fato, associado à eficiência do processo (80% de descoloração em 10 dias, 34% de redução da DQO e 40% de redução de AOX), levou os autores à conclusão de que MnP tem um papel relevante sobre LiP. Experimentos com as enzimas purificadas demonstraram que MnP é capaz de catalisar parcialmente a descoloração do efluente E<sub>1</sub>, mas o mesmo não foi observado com LiP. Contudo, também foi demonstrado que LiP produzida por *Chrysonilia sitophila* TFB-27441 (Ascomycete) era capaz de remover a cor de efluentes E<sub>1</sub> (Ferrer *et al.*, 1991; Durán *et al.*, 1991; Dezotti *et al.*, 1995). LiP purificada a partir de cultura de *C. sitophila* TFB-27441 (LiP-I e LiP-III) foi estudada nas formas livres e imobilizadas para descoloração de efluentes. Os resultados demonstraram que, após 72 horas, a enzima imobilizada em sefarose removia 45,7% da cor do efluente. Ao que tudo indica, as condições para a aplicação dessa enzima são muito importantes, bem como o tipo de microrganismo produtor de LiP. Recentemente, Soares & Durán (1995) questionaram a importância de MnP na descoloração do efluente kraft E<sub>1</sub> em um estudo levado a cabo com *Trametes villosa*. O fungo secreta uma quantidade significativa de lacase (120-418 U/L), b-glicosidase (30-145 U/L) e insignificantes quantidades de peroxidases (LiP, MnP e álcool veratrílico oxidase) e em um período de 48 horas descolora 70-80% do efluente e consome cerca de 75% de fenóis totais. As lacases oxidam compostos fenólicos até radicais ariloxila, os quais polimerizam espontaneamente, formando complexos insolúveis, que facilmente podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (Alberti & Klibanov, 1981). A remoção da cor de efluentes E<sub>1</sub> por enzimas ligninolíticas, entre estas lacases foi estudada por vários autores (Davis & Burns, 1990; Lankinen *et al.*, 1991; Esposito *et al.*, 1991; 1992, 1993). A lacase produzida por *Phlebia radiata* e *Merulius tremellosus* aumenta a cor do efluente nos primeiros dias de cultivo, possivelmente devido à oxidação de estruturas fenólicas a quinonas, que polimerizam originando complexos insolúveis, conforme mencionado acima (Lankinen *et al.*, 1991).

Acredita-se que os fungos considerados de decomposição branca, que utilizam MnP para mediar a degradação de lignina na natureza, também produzam agentes quelantes, tais como oxalato, para estabilizar Mn<sup>3+</sup>.

Tanto LiP quanto MnP são dependentes de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio extracelular, produzido a partir do oxigênio molecular, é suplementado por enzimas oxidativas, que utilizam glicose, glioxal, metilglioxal e outros produtos da degradação da celulose e lignina como substrato (Barr & Aust, 1994a,b; Kirk, 1993). A LiP, após sofrer oxidação por peróxido de hidrogênio, oxida núcleos aromáticos na lignina (fenólicos e não fenólicos) por extração de um elétron, gerando radicais cátions. Estes reagem com nucleófilos e com oxigênio molecular. O resultado é uma "combustão enzimática", na qual as ligações C-C e C-O, são clivadas, causando a despolimerização do polímero e a abertura dos anéis aromáticos. O álcool veratrílico é um excelente substrato para LiP e aparentemente atua como um "mediador" ou liberador de elétron entre LiP e seu substrato (Kirk, 1993). Acredita-se que o álcool veratrílico proteja a enzima da inativação do excesso de  $H_2O_2$  (Tien & Kirk, 1983). A oxidação do álcool veratrílico para aldeído veratrílico pela LiP, na presença de  $H_2O_2$ , é a reação mais utilizada como método de determinação da atividade catalítica da enzima (Tien & Kirk, 1983; Kirk *et al.*, 1986).

A MnP tipicamente oxida  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ ;  $Mn^{3+}$  é empregado para oxidar compostos químicos. Aparentemente  $Mn^{3+}$  pode oxidar hidroquinonas a radicais semiquinonas, as quais podem atuar como agentes redutores. A MnP possui um forte potencial de oxirredução ( $E^0 = 1,54$  V em água) e pequeno tamanho, comparado a proteínas, o que favorece a penetração de  $Mn^{3+}$  em substratos lignocelulósicos e oxidação da lignina.

Além das enzimas ligninolíticas mencionadas, outras enzimas oxidativas, ainda não identificadas, podem ser importantes. Em 1993, Vares *et al.* documentaram a existência de uma nova enzima fúngica, a qual é capaz de processar atividades de oxidase e peroxidase. Também foi considerada a participação de b-glicosidase com atividade transferásica (Esposito *et al.*, 1991; Esposito, 1992), no processo de descontaminação, tornando as ligninas cloradas (no caso de efluentes  $E_1$ ) um substrato mais atrativo para as enzimas ligninolíticas. As lacases, polifenóis oxidases que contêm cobre no seu sítio ativo e catalisam a redução de  $O_2$  para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos, também parecem importantes no tratamento biológico de efluentes.

Pode-se concluir que fungos ligninolíticos apresentam excelente potencial na reciclagem de contaminantes, no caso, efluentes da indústria papeleira. Aparentemente, algumas enzimas, como MnP e lacase, são mais importantes no processo de descontaminação do que outras como LiP.

## Agradecimentos

*Agradecemos ao CNPq, FAPESP e FINEP pelo apoio a nossas pesquisas.*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHMEDOVA, Z.R.; BELETSKAYA, O.P. Cellulases and ligninases of basidiomycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology** (URSS), v.29, p.614-618, 1994.
- ALBERTI, B.N.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. v.3, p. 373-379, 1981.
- ANDER, P. Concluding remarks: FEMS Symp. on Lignin Biodegradation and Transformation-FORBITEC, Lisboa, 1993. **FEMS Microbiology Review**. v.13, p.387-390, 1994.
- ANDER, P.; SENA-MARTINS, G.; DUARTE, J.C. Influence of cellobiose oxidase on peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical Journal**. v.293, p.431-435, 1993.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. The importance of phenol oxidase activity In lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**. v.109, p.1-8, 1976.
- ANDER, P.; STOYTSCHEV, I.; ERIKSSON, K.E. Cleavage and metabolism of methoxyl groups from vanillic and ferulic acids by brown-rot and soft-rot fungi. **Cellulose Chemistry and Technology**. v.22, p.255-266, 1988.
- ANDER, P.; HATAKKA, A.; ERIKSSON, K.E. Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**. v.125, p.189-202, 1980.
- ANGELO, R.S.; AGUIRRE, C.; CUROTTO, E.; DURÁN, N. Utilização de hemicelulases em seqüências de branqueamento de polpas Kraft totalmente livres de cloro. In: ENZITEC-95, SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2. Rio de Janeiro, 1995. **Anais** v.2, p.1-4, 1995.
- ANGELO, R.S.; ESPOSITO, E.; CUROTTO, E.; SACON, V.M.; BAEZA, J.; FREER, J.; DURÁN, N. TCF eucalyptus kraft pulp: effect of asperzyme 2M1 on bleaching and its effluent bioremediation with *Lentinula edodes*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, Recife, 1995. **Proceedings** v.5, p.210-214.
- ANÔNIMO. Eucalipto ganha mais espaço. **O Papel**, p.42-46, ago.1993
- BACKA, S.; GIERER, J.; REITBERGER, T.; NILSSON, T. Hydroxyl radical activity in brown-rot fungi studied by a new chemiluminescence method. **Holzforschung**. v.46, p.61-67, 1992.
- BAO, W.; USHA, S.N.; RENGANATHAN, V. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.300, p.705-713, 1993.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Critical review: Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**. v.28, p.78-87, 1994.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Conversion of lignin peroxidase compound III to active enzyme by cation radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.312, p.511-515, 1994.
- BARRASA, J.M.; GONZALEZ, A.E.; MARTINEZ, A.T. Ultrastructural aspects of fungal delignification of chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chysoscrea*. **Holzforschung** v.46, p.1-8. 1992.
- BATT, C.; SOLVEY, M. Association of laccase acting with conidiation in an aflatoxigenic strain of *Aspergillus parasiticus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.27, p.277-280, 1985.
- BITTON, G. Wastewater and water treatment microbiology. In: BITTON, G **Wastewater microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. p.139-239.
- BLANCHETTE, R.A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopatology**, v. 29, p. 381-398, 1991.
- BLANCHETTE, R.A.; OBST, J.R.; TIMELL, T.E. Biodegradation of compression wood and tension by white- and brown-rot fungi. **Holzforschung** . v.48, p.34-42, 1994.
- BOLLAG, J.M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**. v.48, p.849-854, 1984.
- BONNARME, P.; JEFFRES, T.W. Mn (II) regulation of lignin peroxidases from lignin-degrading white Rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.210-217, 1990.
- BONNARME, P.; PAICE, M.G. Mn(II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidases from lignin degrading white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.210-217, 1992.

- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; REID, I.D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1876-1880, 1995.
- BOYLE, C.D.; KROPP, B.R.; REID, I.D. Solubilization and mineralization of lignin by white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3217-3224, 1992.
- BUCHALA, A.J.; LEISOLA, M.S.A. Structure of the  $\beta$ -glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. **Carbohydrate Research**, v.165, p.146-149, 1987.
- BUGOS, R.C.; SUTHERLAND, J.B.; ADDLER, J.V. Phenolic compound utilization by the soft rot fungus *Lecybiophora hoffmannii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1882-1885, 1988.
- CALL, H.P.; MUCKE, In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, Vienna, Austria, 1995. **Abstracts**. O-F3-234, p.38.
- CASTRO E SILVA, A.; ESPOSITO, E.; FERRAZ, A.; DURÁN, N. Decay of *Parkia oppositifolia* in amazonia by *Pycnoporus sanguineus* and potential use for effluent decolorization. **Holzforschung**, v.47, p.361-368, 1993.
- CONSTAM, D.; MUHEIM, A.; ZIMMERMANN, W.; FIECHTER, A. Purification and partial characterization of an intracellular NADH: quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2209-2214, 1991.
- COSTA-FERREIRA, M.; ANDER, P.; DUARTE, J. Formation of peroxidase and cellobiose: quinone oxidoreductase in relation to degradation of synthetic lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. In: KUWAHARA, M.; SHIMADA, M. ed. **Biotechnology in pulp and paper industry**. Tokio: UNI Publications, 1992. p.351-356.
- DANIEL, G.; VOLC, J.; KUBATOVA, E.; NILSSON, T. Ultrastructural and immunocytochemical studies on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme pyranose oxidase in *Phanerochaete chrysosporium* grown under liquid culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3667-3676, 1992.
- DAVIS, S.; BURNS R.G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.721-726, 1990.
- DEZOTTI, M.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; DURÁN, N. Silica-immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignins from EucalyptusKraft effluent. **Journal of Biotechnology**, v.43, p.161-167, 1995.
- DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYYA, B.C. Lignin peroxidase production by brown-rot fungus *Polyporus ostreiformis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.72, p.402-404, 1991.
- DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYYA, B.C. Production of some extracellular enzymes by a lignin-peroxidase producing brown-rot fungus, *Polyporus ostreiformis* and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4216-4218, 1994.
- DILL, I.; KRAEPELIN, G. Der abbau von lignin/celulose durch Weissfaule-Pilze: Einfluss spezifischer ökologischer faktoren. **Forum Mikrobiologie**, v.11/88, p.484-489, 1988.
- DUNFORD, H.B. Horseradish peroxidase: Structure and kinetic properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B., ed. **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.1-24.
- DURÁN, N. Siderophores on wood degradation: Reduction of molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4., Recife, 1996. **Proceedings**, v.5, p.164-169, 1996.
- DURÁN, N. Strategies on soil and effluent bioremediation: Chlorophenols and chlorolignins. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 3, Belo Horizonte, 1993. **Proceedings**, v.3, p.296-308.
- DURÁN, N.; DEZOTTI, M.; RODRIGUEZ, J. Biomass photochemistry.XV: Photobleaching and biobleaching of Kraft effluent. **Journal of Photochemistry and Photobiology A. Chemistry**, v.62, p.269-279, 1991.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; CANHOS, V.P. A new alternative process for Kraft E1 effluent treatment. A combination of photochemical and biological methods. **Biodegradation**, v.5, p.13-19, 1994.
- DURÁN, N.; MACHUCA, A. Kraft pulp bleaching by an extracellular low molecular metabolite from the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v.53, p.3-46, 1995.

- DURÁN, N.; RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; CAMPOS, V. *Chrysonilia sitophila*: A hyperligninolytic strain. **Biotechnology Letters**, v.9, p.357-360, 1987a.
- DURÁN, N.; RODRIGUEZ, J.; FERRER, I. Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.16, p.157-163, 1987b.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E.; CANHOS, V.P. Kraft mill effluent: Biological treatment. In: Kenney, J.F.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. ed. **Cellulosics: pulp, fibre and environmental aspects**. New York: Ellis, 1993. Chapter73, p.493-498.
- DURRENS, P. The phenoloxidase of the acomycete *Podospora abserina*. The three of the major laccase activities. **Archives of Microbiology**, v.130, p.121-124, 1981.
- ENOKI, A.; YOSHIOKA, S.; TANAKA, H.; FUSE, G. **Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing and one electron oxidation system of brwon-rot fungi** S.L.: International Research Group on Wood Preservation, 1990. (IRG/WP Document, 1445).
- ERIKSSON, K.E.L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, v.24, p.79-101, 1990.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components** Berlin: Springer, 1990.
- ERIKSSON, K.E.; JOHNSRUD, S.C.; VALLANDER, L. Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *sporotrichum pulverulentum* **Archives of Microbiology**, v.135, p.161-168, 1983.
- ESLYN, W.E.; KIRK, T.K.; EFFLAND, M.J. Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. **Phytopatology**, v.65, p.473-476, 1975.
- ESPOSITO, E. Processos envolvidos no tratamento biológico de efluentes: Utilização de um bioreator de leite recheado. Campinas: UNICAMP, 1992. 120p. Dissertação de Mestrado.
- ESPOSITO, E.; CANHOS, V.P.; DURÁN, N. Photochemical pre-treatment of f-kraft effluent: biobleaching with *lentinus eclodes*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 2., Campinas, 1992. **Proceedings**, v.3, p.356-361.
- ESPOSITO, E. Tratamento biológico de efluentes: Parâmetros ótimos na utilização de um bioreator de leite recheado modificado. Campinas: UNICAMP, 1995. 69p. Tese de Doutorado.
- ESPOSITO, E.; CANHOS, V.P.; DURÁN, N. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with additional extra carbon-source. **Biotechnology Letters**, v.13, p.571-576, 1991.
- ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; DURÁN, N. Organochlorides Degradation from Kraft Effluent by Immobilized Fungus on Chemically Modified Nylon. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4, Recife, 1996. **Proceedings**, v.5, p.82-86, 1996.
- ESPOSITO, E.; DURAN, N.; FREER, J.; BAEZA, J.; INNOCENTINI-MEI, L.H. Performance of a modified packed bed reactor to evaluate immobilized *Lentinus edodes* acting on Kraft effluent. In: CHEMPOR-93: INTERNATIONAL CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE, PORTO, 1993. **Proceedings**, p.201-207.
- ESPOSITO, E.; SPERANZA, M.; BENAR, P.; GONÇALVES, A.R. Growth of ligninolytic fungi on sugar cane bagasse as a pre-treatment for organosolv delignification. In: INTERNATIONAL NON-WOOD FIBRE PULPING AND PAPERMAKING CONFERENCE, 3, Beijing, China. **Proceedings**, 1996. v.4, p.12-16.
- ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V.P.; DURÁN, N. Phenoloxidase and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-250 strain): applications. **Journal of Biotechnology**, v.29, p.219-228, 1993b.
- EVANS, C.S.; GALLAGHER, I.M.; ATKEY, P.T.; WOOD, D.A. Localization of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. **Biodegradation**, v.2, p.93-106, 1991.
- FARMER, V.C.; HENDERSON, M.E.K.; RUSSEL, J.D. Aromatic alcohol oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. **Biochemistry**, v.74, p.257-262, 1960.
- FEIJOO, G.; ROTHSCCHILD, N.; DOSORETZ, C.; LEMA J.M. Effect of addition of extracellular culture fluid on ligninolytic enzyme formation in *Phanerochaete chrysosporium* **Journal of Biotechnology**, v.40, p.21-29, 1995.
- FERRAZ, A.; BAEZA, J.; DURÁN, N. Softwood biodegradation by an ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 strain). **Letters of Applied Microbiology**, v.13, p.82-86, 1991.

- FERRAZ, A.; DURÁN, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Biodegradation**, v.6, p.265-274, 1995.
- FERRER, I.; ESPOSITO, E.; DURÁN, N. Lignin peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat-denaturation kinetics and pH stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.402-406, 1992.
- FERRER, I.; DEZOTTI, M.; DURÁN, N. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase. **Biotechnology Letters**, v.13, p.577-582, 1991.
- FORRESTER, I.T.; GRABSKI, A.C.; BURGESS, R.R.; LEATHAM, G.F. Manganese, manganese dependent peroxidase and the degradation of lignin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.157, p.992-999, 1988.
- FORRESTER, I.T.; BRABSKI, A.C.; MISHRA, C.; KELLY, B.D.; STRICKLAND, W.N.; LEATHAM, G.F.; BURGESS, R.R. Characteristics and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.359-365, 1990.
- FORSS, K.A.J.; JOKINEN, K.; SAVOLAINEN, M.; WILLIAMSON, H. Utilization of enzymes for effluent treatment in the pulp and paper industry. **Paperi ja Puu-Paper and Timber**, v.10, p.1109-1112, 1989.
- FROEHNER, S.C.; ERIKSSON, K.E. Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors. **Journal of Bacteriology**, v.120, p.450-457, 1994.
- FULTHORPE, R.R.; ALLEN, D.G. A comparison of organochlorine removal from bleached Kraft pulp and paper-mill effluents by dehalogenating *Pseudomonas*, *Ancylobacter* and *Methylobacterium* Strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.782-789, 1995.
- GALIANO, H.; GAS, G.; BOUDET, A.M. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes-Mn peroxidase and laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.478-482, 1991.
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; NICOLE, M.; NANDRIS, D. Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* II: Effect of *R. lignosus* laccase LI on thioglycolic lignin of hevea. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.13, p.97-110, 1986.
- GLEND, J.K.; MORGAN, M.A.; MAYFIELD, M.B.; KIWAHARA, M.; GOLD, M.H. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.114, p.1077-1083, 1983.
- GOLD, M.H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: WHITAKER, J.R.; SONNET, P.E. ed. **Biocatalysis in agricultural biotechnology**. Washington: American Chemical Society, 1989. p.127-140. (ACS Symposium Series, 389).
- GOLOVLEVA, L.A.; LEONTIEVSKY, A.A.; MALTSEVA, O.V.; MYASOEDOVA, N.M. Ligninolytic enzymes of the fungus *Panus tigrinus* 8/18: Biosynthesis, purification and properties. **Journal of Biotechnology**, v.30, p. 71-77, 1993.
- GOSHADZE, M.K.; ELISASHVILI, V.I. Biosynthesis and some properties of laccase from *Lentinus tigrinus* IBR-101. **Biochemistry (URSS)**, v.58, p.1148-1452, 1994.
- GREEN III, F.; CLAUSEN, C.A.; LARSEN, M.J.; HIGHLEY, T.L. Immuno-scanning electron microscopic localization of extracellular wood-degrading enzymes within the fibrillar sheath of the brown-rot fungus *Postia placenta*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.898-904, 1992.
- 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.
- GUILLÉN, F.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.465-469, 1990.
- HARKIN, J.M.; OBST, J.R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**, v.29, p.381-387, 1973.
- HARVEY, P.J.; CANDEIAS, L.P. Radical cation cofactors in lignin peroxidase catalysis. **Biochemical Society Transactions**, v. 23, p. 262-267, 1995.

- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: Production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, v.13, p.125-135, 1994.
- HENRIKSSON, G.; ANDER, P.; PETTERSSON, B.; PETERSSON, G. Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a wood degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan on a synthetic lignin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.790-796, 1995.
- HIGHLEY, T.L.; MURMANIS, L.; PALMER, J.G. Micromorphology of degradation in western hemlock and sweetgum by brown-rot fungus *Poria placenta*. **Holzforchung**, v.39, p.73-78, 1985.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, v.24, p.23-63, 1990.
- HÜTTERMANN A.; MILSTEIN, O.; NICKLAS, B.; TROJANOWSKI, J.; HAAR, A.; JESPER, C.J.; JIMENEZ, G.; PENNINCUX, M.J. Evidence of role of Mn-peroxidase in the decolorization of kraft pulp bleach plant of fluent by *Phanerochaete chrysosporium*. effect of initial culture conditions on enzyme production. **Journal of Biotechnology**, v.37, p.229-234. KHARAZIPOUR, A. Enzymatic modification of lignin for technical use. In: GLASSER, W.G.; SARKANEN, S. ed. **Lignin-properties and materials**. Washington: American Chemical Society, 1989. p.361-370. (ACS Symposium Series, 397).
- JIN, L.; SCHULTZ, T.P.; NICHOLAS, D.D. Structural characterization of brown-rotted lignin. **Holzforchung**, v.44, p.133-138, 1990.
- KAARIK, A. The identification of the mycelia of wood decay fungi by their oxidation reaction with phenolic compounds. **Studies of Forest Succ.** n.31, p.1-80, 1965.
- KANEKO, R.; IIMORI, T.; MIYAWAKI, S.; MACHIDA, M.; MURAKAMI, K. Biobleaching with manganese peroxidase purified from the pulp bleaching fungus SKB-1152. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59, p.1584-1585, 1995.
- KATASE, T.; BOLLAG, J.M. Transformation of trans-4-hydroxycinnamic acid by a laccase of the fungus *Trametes versicolor*: its significance in humidification. **Soil Science**, v.151, p.291-296, 1991.
- KAUTSKY, H. The impact of pulp-mill effluent on phytobenthic communities in the Baltic sea. **Ambio**, v.21, p.308-313, 1992.
- KERSTEN, P.J. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.87, p.2936-2940, 1990.
- KHINDARIA, A.; BARRY, D.P.; AUST S.D. Lignin peroxidase can also oxidize manganese? **Biochemistry**, v.34, p.7773-7779, 1995.
- KIRK, T.K. Lignin Biodegradation: basic research progress, and applications in soil remediation and biopulping. In: KENNEDY, J.F.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A., ed. **Proceedings of cellulose: pulp, fibre and environmental aspects**. New York: Ellis Horwood, 1993. Chapter 63, p.421-430.
- KIRK, T.K. Effects of microorganisms on lignin. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.185-210, 1971.
- KIRK, T.K.; TIEN, M.; JOHNSRUD, S.C.; ERIKSSON, K.E. Lignin degrading activity of *phanerochaete chrysosporium* burds: comparisson of cellulase-negative and other strains. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.8, p.75-80, 1986.
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.465-505, 1987.
- KUREK, B.; KERSTEN, P.J. Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.751-756, 1995.
- KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.151, p.1338-1345, 1982.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from iginolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.169, p.247-250, 1984.
- LACKNER, R.; SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.178, p.1092-1098, 1991.
- LANKINEN, V.P.; INKEROINEN, M.M.; PELLINEN, J.; HATAKKA, A.I. The onset of lignin-modifying enzymes, decrease of AOX and color removal by white-rot fungi grown on bleach plant effluents. **Water and Science Technology**, v.24, p.189-198, 1991.

- LARSEN, M.J.; GREEN III, F. Mycofibrillar cell wall extensions in the hypha sheath of *Postia placenta*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.905-911, 1992.
- LAW, D.J.; TIMBERLAKE, W.E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v.144, p.509-517, 1980.
- LEATHAM, G.F. The ligninolytic activities of *Letinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.51-58, 1986.
- LEATHAM, G.F.; FORRESTER, I.F.; MISHRA, C. Enzymes from solid substrates. Recovering extracellular degrading enzymes from *Lentinus edodes* cultures from a commercial wood medium. In: LETHAM, G.F.; HIMELL, M.E., ed. **Enzyme in biomass conversion**. Washington: American Chemical Society, 1991. p.95-100. (ACS Symposium Series).
- LEE, S.H.; KONDO, R.; SAKAI, K. Treatment of Kraft Bleaching Effluents by Lignin-Degrading Fungi III. treatment by Newly Found Fungus KS-62 Without Additional Nutrients. **Mokuzai Gakkaishi**, v.40, p.612-619, 1994.
- LEISOLA, M.S.A.; KOZULIC, B.; MEUSSDOERFFER, F.; FIECHTER, A. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.419-424, 1987.
- LEONARDSSON, K. Long-term ecological effect of bleaching pulp mill effluents on benthic macrofauna in the Gulf of Bothnia. **Ambio**, v.22, p.359-362, 1993.
- LISS, S.N.; ALLEN, D.G. Microbiological study of a bleached Kraft pulp mill aerated lagoon. **Journal of Pulp and Paper Science**, v.18, p.216-221, 1992.
- LOBOS, S.; LARRAIN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNA, R. Isozymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of General Microbiology**, v.140, p.2691-2698, 1994.
- MACHUCA, A.; DURÁN, N. Growth optimization of *Thermoascus aurantiacus*: an efficient fungus acting on extractable phenols. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 2., Campinas, 1992. **Proceedings**, v.3, p.377-388.
- MACHUCA, A.; DURÁN, N. Phenoloxidase production and wood degradation by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.43, p.37-44, 1993.
- MACHUCA, A.; DURÁN, N. Optimization of some parameters influencing *Thermoascus aurantiacus* growth: effect of lignin-related compounds. **Journal of Industrial Microbiology**, 1996. No prelo.
- MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURÁN, N. Characterization of the ligninolytic enzyme from *Thermoascus aurantiacus* induced by lignocellulosic substrates. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 3., Belo Horizonte, 1993. **Proceedings**, v.4, p.332-335.
- MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURÁN, N. Novo composto com atividade de fenoloxidase, produzido por *Thermoascus aurantiacus*: utilização no tratamento de efluentes. In: ENZITEC-95. SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2., Rio de Janeiro, 1995. **Anais**, p.1-5.
- MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURÁN, N. Characterization of low molecular mass compound with high phenoloxidase activity isolated from *Thermoascus aurantiacus*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4., Recife, 1996. **Proceedings**, 5, p.223-227, 1995b.
- MARZULLO, L.; CANNIO, R.; GIARDINO, P.; SANTINI, M.J.; SANNIA, G. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotad ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.3823-3827, 1995.
- MASSAI, L.R.; ESPOSITO, E.; HAUN, M.; DURÁN, N. Fungal treatment of pulp and paper industry: kraft-E<sub>1</sub> and final effluent-E<sub>2</sub> after aerobic treatment. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4., Recife, 1996. **Proceedings**, v.5, p.69-72, 1995.
- MEHTA, V.; GUPTA, J.K. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Research Industry**, v.36, p.161-167, 1991.
- MERSTEN, T.; JONG, DE FIELD; J.A. Manganese regulation of veratryl alcohol in white-rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1881-1887, 1995.

- MCCUBIN, N. A bleaching revolution is in progress. **Pulp and Paper Canada**, v.95, p.12-16, 1994.
- MICHEL Jr., F.C.; DASS S.B.; GRULKE, E.A.; REDDY, C.A. Role of manganese peroxidase and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of Kraft plant effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2368-2375, 1991.
- MOUNTEER, A.H.; COLODEITE, J.L.; GOMIDE, J.L.; CAMPOS, A.S. Alternativas para o branqueamento sem cloro molecular. **O Papel**, p.25-35, 1992.
- MULHEIM, A.; WLDNER, R.; LEISOLA, M.S.A.; FIECHTER, A. An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p.204-209, 1990.
- MUSTRANTA, A. Production of peroxidase by *Imonotus weirii*. **Applied Microbiology and Technology**, v.27, p.21-26, 1987.
- NIKU-PAAVOLA, M.I.; KARHUNEN, E.; SALOLA, P.; RAUNIO, V. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Plebia radiata*. **Biochemical Journal**, v.254, p.877-884, 1988.
- NIKU-PAAVOLA, M.L.; RANUA, M.; SUURNAKKI, A.; KANTELINEN, A. Effect of lignin-modifying enzyme on pine Kraft pulp. **Bioresources Technology**, v.50, p.73-77, 1995.
- NILSSON, T. **Defining fungal types-a proposal for discussion**. S.L.: International Research Group on Wood Preservation, 1985. (IRG/WP Document,1264).
- NILSSON, T.; DANIEL, G.; KIRK, T.K.; OBST, J.R. Chemistry and microcoscopy of wood decay by some higher ascomycetes. **Holzforschung**, v.43, p.11-18, 1989.
- ODENDAHAL, S. Environmental protection and consumer demands: a review of trends and impacts, **Pulp and Paper Canada**, v.95, p.30-34, 1994.
- ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. **Biotechnology Advance**, v.11, p.179-198, 1993.
- ORTH, A.B.; ROYSE, D.J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin wood-degrading fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4017-4023, 1993.
- 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 and Environmental Microbiology**, v.59, p.260-265, 1993.
- PECK, V.; DALLEY, R. Toward a greener pulp and paper industry. The search for mill effluent contaminants and pollution prevention technology. **Environmental Science and Technology**, p.28, v.524-530, 1994.
- PEREIRA, D.E.D.; DEMUNER, B.J.; BERTOLUCCI, F.L.G.; DA SILVA, C. The influence of the variability of lignin characteristics of eucalypt species in delignification rate of wood pulping process. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4. ,Recife, 1996. **Proceedings**, v.5, p.39-44, 1995.
- PEREZ, J.; JEFFRIES, T.W. Mineralization of <sup>14</sup>C-ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1806-1812, 1990.
- PERIE, F.; GOLD, M.H. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2240-2245, 1991.
- POULUS, T.L.; PATTERSON, W.R.; SUNDARAMOORTHY, M. The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidase: The role of non-haem material on the catalytic mechanisms. **Biochemical Society Transaction**, v.23, p.228-232, 1995.
- RAYNER, A.D.M.; BODDY, L. **Fungal decomposition of wood** its biology and ecology. Chichester: John Wiley, 1988.
- RODRIGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v.21, p.411-422, 1988.
- RODRIGUEZ, J.; ESPOSITO, E.; BAEZA, J.; FREER, J.; DURAN, N. Decolorization mechanism of Kraft pulp bleaching mill effluents from soft and hardwood. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 3, Belo Horizonte, 1993. **Proceedings**, v.4, p.336-339, 1993.

- RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; NOGUEIRA, R.F.P.; FERRER, I.; ESPOSITO, E.; DURÁN, N. A review on lignin biodegradation by ascomycete. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 1997. No prelo.
- ROTHSCHILD, N.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. Ligninolytic systems formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1833-1838, 1995.
- RUEL, K.; JOSELEAU, J.P. Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.374-383, 1991.
- RUEL, K.; ODIER, E.; JOSELEAU, J.P. Immunocytochemical observation of fungal enzymes during degradation of wood cells by *Phanerochaete chrysosporium* (strain K-3). In: KIRK, T.K.; CHANG, H.M., ed. **Biotechnology in pulp and paper manufacture**. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1990. p.83-97.
- RUTTIMANN, C.; SCHWENBER, E.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNA, R. Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Plebeia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.16, p.64-76, 1992.
- SANNIA, G.; LIMONGI, P.; COCCA, E.; BUONOCORE, F.; NITTI, G.; GIARDINA, P. Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleorotus ostreatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1073, p.114-119, 1991.
- SAYADI, S.; ODIER, E. Degradation of synthetic lignin by the protoplast of *Phanerochaete chrysosporium* in the presence of lignin peroxidase or manganese peroxidase. **Acta Biotechnologica**, v.45, p.57-66, 1995.
- SHUEN, S.K.; BUSWELL, J.A. Effect of lignin derived phenols and their methylated derivatives on the growth of *Lentinus spp.* **Letters in Applied Microbiology**, v.15, p.12-14, 1992.
- SOARES, C.H.L.; DURÁN, N. Enzyme activities during biodegradation of bleached Kraft pulp effluent by basidiomycetes *Trametes villosa*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4. Recife, 1996. **Proceedings**, v.5, p.66-68, 1995.
- SRINIVASAN, C.; D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4274-4277, 1995.
- TAPIA, J.; VICUNA, R. Synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora* is inhibited by an increase in the pH of the culture resulting from fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2476-2481, 1995.
- THACKER, D.G.; GOOD, H.M. The composition of air in trunks of sugar maple in relation to decay. **Canadian Journal of Botany**, v.30, p.475-485, 1952.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v.221, p.661-663, 1983.
- TUOR, U.; WARIISHI, H.; SHOEMAKER, H.E.; GOLD, M.H. Oxidation of phenolic arylglycerol b-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*; oxidative cleavage of an a-carbonyl model compound. **Biochemistry**, v.31, p.4986-4995, 1992.
- TUOR, U.; SHOEMAKER, H.E.; LEISOLA, M.S.A.; SCHMIDT, H.W.H. Isolation and characterization of substituted 4-hydroxy-cyclohex-2-enones as metabolites of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol and its methyl ether in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.674-680, 1993.
- TUOR, 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.
- VARES, T.; LUNDELL, T.K.; HATAKKA, A. Production of ligninolytic enzymes by two white-rot fungi. *Plebeia ochraceofulva* and *Junghuhnia separabilima*. In: DUARTE, J.C.; FERREIRA, M.C.; ANDER, A., ed. **Proceedings FEMS Symposium on Lignin Biodegradation and Transformation. Biotechnological Applications**. Lisboa: Forbitec, 1993. p.65-66.
- VARES, T.; KALSI, M.; HATAKKA, A. Lignin peroxidase, manganese peroxidase and other ligninolytic enzymes produced by *Plebeia radiata* during solid state fermentation of wheat straw. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3515-3520, 1995.



- VYAS, B.R.M.; MOLITORIS, H.P. Involvement of an extracellular  $H_2O_2$ -dependent ligninolytic acting on the white-rot fungus *Pleorotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3919-3927, 1995.
- WALDNER, R.; LEISOLA, M.S.A.; FIECHTER, A. In vitro depolymerization of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.400-407, 1988.
- WARIISHI, H.; HUANG, J.; DUNFORD, H.B.; GOLD, M.H. Reaction of lignin peroxidase compound I and II with veratryl alcohol: transient-state kinetic characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.20694-20699, 1991a.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.176, p.269-275, 1991b.
- WARIISHI, H.; GOLD, M.H. Lignin peroxidase compound III: mechanism of formation and decomposition. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.2070-2077, 1991.
- YANG, J.L.; SACON, V.M.; LAW, S.E.; ERIKSSON, K.-E. Bleaching of Eucalyptus Kraft pulp with the ENZONE process. **TAPPI Journal**, v.76, p.91-96, 1993.
- ZINI, C.A. Análise de dioxinas. **O Papel**, p.26-31, 1993.

---

## REFERÊNCIAS ADICIONAIS ENCONTRADAS NA FASE DE PUBLICAÇÃO

### A) LIGNINAS

- ASIEGBU, F.O.; PATERSON, A.; SMITH, J.E. The effect of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrate digestibility. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.273-279, 1996.
- BEBEKOVA, M.V.; SALOVAROVA, V.P.; STEPANOVA, L.M.; KOZLOV, Y.P. **Proc. 8th. Meeting Eur. Biomass Conference Biomass Energy, Environ. Agriculture Industry**, v.2, p.1343-1349, 1995.
- CAMARERO, S.; GALETTI, G.C.; MARTINEZ, A.T. Demonstration of in situ oxidative degradation of lignin side chains by two white-rot fungi using analytical pyrolysis of methylated wheat straw. **Rapid Communication in mass Spectrometry; RCMS**, v.11, p.331-337, 1997.
- CARAMIHAI, M.D.; GAZDARU, V. Modeling of lignin biodegradation. **DECHEMA Monography, 133 (Biodeterioration and Biodegradation)**, p.701-706, 1996.
- CRESTINI, C.; GIOVANNOLZI-SERMANNI, G. Biodegradation of monomeric, dimeric and polymeric lignin models by *Lentinus edodes*. **Holzforchung**, v.50, p.193-198, 1996.
- GAO, Y.; CHEN, J. Lignin biodegradation and biomechanical pulping. **Zhongguo Zaozhi Xuebao**, v.11, p.88-94, 1996.
- HAMMEL, K.E. Extracellular free radical biochemistry of lignolytic fungi. **New Journal of Chemistry**, v.20, p.195-201, 1996.
- LU, X.; LIU, Z.; GAO, P. Chemical mechanism of lignin biodegradation. **Linchan Huaxue Yu Gongye**, v.16, p.75-82.
- MA, D.; LIU, Z.; GUO, P.; WANG, Z. Advances in the research of lignin biodegradation. **Xianweisu Kexue Yu Jishu**, v.4, p.1-12, 1996.
- MEDVEDEVA, S.A.; ALEKSANDROVA, G.P.; BABKIN, V.A. Chemical transformation of lignin during the biodegradation and organosolv pulping of deciduous wood. **Chemistry of Natural Compounds**, v.31, p.503-509, 1995.
- PENNINCKX, M.J. Application of lignocellulose degrading enzymes in the pulp and paper industry. **Cerevisia**, v.21, p.64-68, 1996.
- VARES, T.; HATAKKA, A. Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. **Canadian Journal of Botany**, v.75, p.61-66, 1997.

YOUN, H.D.; HAH, Y.C.; KANG, S.O. Role of laccase lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.132, p.183-187, 1995.

ZHAO, J.; JANSEN, B.J.H. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by white rot fungi in solid media. **FEMS Microbiology Letters**, v.145, p.393-397, 1996.

## B) EFLUENTES

AHTIAINEN, J.; NAKARI, T.; SILVONEN, J. Toxicity of TCF and ECF pulp bleaching effluents assessed by biological toxicity tests. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN ENVIRONMENTAL FATE EFF. BLEACHED PULP MILL EFFLUENTS, 2., 1996. S.L.: s.n., 1996. p.33-40.

ANTUNES, R.E.; PERALTA-ZAMORA, P.; GROTO, R.; DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Produção de lignina peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium* e sua aplicação na degradação de contaminantes. **Anais I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, v.1, p.201-205, 1997.

DURÁN, N. Enzimas oxidativas aplicadas a biorremediação. **Anais I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, v.1, p.183-188, 1997.

FEIJOO, G.; VIDAL, G.; MOREIRA, M.T.; MENDEZ, R.; LEMA, J.M. Degradation of high molecular weight compounds of kraft pulp mill effluents by a combined treatment with fungi and bacteria. **Biotechnology Letters**, v.17, p.1261-1266, 1995.

INDUSTRIAL effluent treatment. **World Ater and Environmetal Engineering**, v.19, p.12-16, 1996.

LIN, L.; WANG, S.; CHEN J. Effect of white rot fungus on elimination of toxicity of effluent from CEH bleaching of bagasse kraft pulp. **Shuichuli Jishu**, v.22, p.240-244, 1996

MASSAI, L.R.; ESPOSITO, E.; HAUN, M.; DURÁN, N. Degradação de fenol e guaiacol dos efluentes kraft E1 e final Ef pelo fungo *Lentinus* (*Lentinula*) edodes. **Anais I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, v.1, p.159-162, 1997.

LARISCH, B.C.; DUFF, S.J.B. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on characteristics and biological treatment of TCF bleached pulp mill effluent. **Water Research**, v.31, p.1694-1698, 1997.

HASEGAWA, M.M.; BARTON, D.A. The effect of oxygen delignification, complete chlorine dioxide substitution and biological treatment on bleached kraft mill effluent quality. **Water Science and Technology**, v.35, p.1-5, 1997.

PERALTA-ZAMORA, P.; ESPOSITO, E.; PELEGRINI, R.; GROTO, R.; REYES, J.; DURÁN, N. Remediação de efluentes da indústria papelera por peroxidases imobilizadas em diversos suportes. **Anais I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, v.1, p.113-120, 1997.

PERALTA-ZAMORA, P.; ESPOSITO, E.; REYES, J.; DURÁN, N. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose. Tratamento biológico e fotocatalítico. **Química Nova**, v.20, p.186-190, 1997.

RAGHUKUMAR, C.; CHANDRAMOHAN, D.; REDDY, C.A. Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi. **Biotechnology Letters**, v.18, p.105-108, 1996.

SINGH, S.P.; ROYMOULIK, S.K. Role of biotechnology in the pulp and paper industry: a review Part 3. Effluent treatment. **IPPTA**, v.8, p.57-60, 1996.

SOARES, C.H.L.; DURÁN, N. Degradabilidade de efluentes de indústrias de papel e celulose pelos fungos basidiomicetos degradadores de madeira *Panus citrinus* e *Trametes villosa*. **Anais I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, v.1, p.163-167, 1997.

TRIPATHI, C.S.; ALLEN, D.G. Kinetics of organochlorine removal from bleached kraft pulp mill effluent during biological treatment. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.75, p.104-109, 1997.

WANG, S.; GAO, Y.; QIN, M.; CHEN, J.; YU, J.; YU, H.; HUANG, X. GC-MS analyses of chlorinated phenolic compounds in effluents from reed CEH bleaching. **Zhongguo Zaozhi Xuebao**, v.11, p.36-41, 1996.

---

# DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA POR BACTÉRIAS

---

Paulo Mazzafera

Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6190, CEP 13081-970, Campinas, SP

---

## INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nutrientes é o principal fator ambiental controlando o crescimento de organismos em qualquer ecossistema. A falta de nutrientes e, portanto, de energia, dificultará a sobrevivência, uma vez que outros fatores, que eventualmente possam vir a limitar o crescimento, não serão superados (Morita, 1992). Conseqüentemente, na escassez de nutrientes estabelece-se a competição entre várias populações de microrganismos.

No perfil do solo, temperatura, umidade, o conteúdo de gases e o pH variam com as condições climáticas e com a profundidade. Entretanto, a disponibilidade de nutrientes ainda é o principal fator afetando a sobrevivência e o número de microrganismos (Berkeley, 1971). Apesar de algumas exceções, normalmente o que se observa é a diminuição do número de microrganismos em camadas inferiores do solo, o que pode ser considerado reflexo da diminuição da matéria orgânica nessas camadas (Berkeley, 1971).

Espera-se que as características físicas e químicas de solos sejam alteradas, quando utilizados para fins agrícolas, pela aplicação de defensivos, herbicidas, fertilizantes, como também pelo tipo de cultura praticada sobre ele. De modo semelhante, solos em áreas não exploradas pela agricultura podem apresentar características particulares, resultantes do tipo de vegetação no local. Dessa forma, compostos presentes em determinadas plantas em quantidades significativas podem ser incorporados

ao solo e afetar não só plantas posicionadas próximas, portanto com ação alelopática, como também os microrganismos presentes nele.

Entretanto, dada a carência de nutrientes no solo, não seria incomum a utilização desses compostos por microrganismos, como fonte de energia. No presente capítulo discute-se a degradação de cafeína por bactérias, com especial atenção àquelas isoladas de solo.

## DEGRADAÇÃO DE PURINAS POR BACTÉRIAS

Ampla revisão sobre a utilização de purinas e compostos derivados como fonte de energia (carbono e nitrogênio) por microrganismos foi feita por Vogels & van der Drift (1976). Entre os compostos degradados, além das purinas adenina e guanina, degradadas por adenina/guanina deaminase, incluíam-se uréia, ácido úrico, hipoxantina, 1-metilxantina, 3-metilxantina, alantoína, ácido alantóico, 6-mercaptipurina, 2-tioxantina, 3-metil-2-tioxantina, 6,8-dihidroxipurina etc. Com exceção de uréia, ácido úrico, alantoína e ácido alantóico, para os quais enzimas específicas atuam na degradação, urease, uricase, alantoinase e alantoicase, respectivamente, os outros derivados de xantina foram observados ser substratos para xantina oxidase/desidrogenase, havendo, no entanto, variação na eficiência de degradação. Dependendo do microrganismo, NAD ou NADH podem ser os cofatores da reação.

Até o levantamento bibliográfico feito por Vogels & van der Drift (1976), apenas um trabalho mostrava a degradação de cafeína por uma bactéria (Woolfolk, 1975).

Woolfolk (1975) isolou uma linhagem de *Pseudomonas putida*, que cresceu em até 0,5% de cafeína como a única fonte de carbono e nitrogênio. O isolamento foi feito incubando-se, por uma semana, amostras de solo em meio salino líquido, contendo 0,05% de cafeína e 0,0005% de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4).6\text{H}_2\text{O}$ . Quatro dias após sua transferência para meio sólido com a mesma composição, foi observado crescimento de colônias, parecendo todas serem do mesmo tipo. Várias transferências foram feitas antes de se cultivar em meio sólido contendo apenas cafeína (0,1%) como única fonte de carbono e nitrogênio. O isolado também crescia em qualquer di ou monometilxantinas, derivadas de cafeína. Usando células intactas ou extratos protéicos livres de células, o autor concluiu que a cafeína teria os radicais metil removidos hidroliticamente, com a formação final de xantina e metanol. Xantina seria, então, degradada a ácido úrico por xantina desidrogenase, entrando na via normal do metabolismo de purinas. O metanol e seus derivados seriam degradados por hidrogenases específicas.

Blecher & Lingens (1977) obtiveram vários isolados bacterianos a partir de solo, sendo todos identificados como *P. putida*. O melhor crescimento obtido foi com 0,35% de cafeína no meio, e em 0,55% o crescimento era totalmente inibido. Para o isolamento, 300g de solo foram misturados com 0,5 g de cafeína e mantidos a 30°C por 6 meses. Regularmente umedecia-se a mistura com água deionizada. Desse material foram tomadas amostras de 5 g, que foram, então, ressuspensas em meio mineral líquido, contendo 0,1% de cafeína e 0,1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e incubadas a 30°C por 4 dias. Após várias transferências para o mesmo meio, amostras foram semeadas em meio sólido rico em nutrientes e colônias crescendo nesse meio foram transferidas para placas contendo cafeína como única fonte de carbono e nitrogênio. As colônias obtidas no meio rico eram de um só tipo e foram todas identificadas como *P. putida*, demonstrando a seleção ocorrida ao longo do tempo de incubação. Quando amostras de solo foram incubadas com cafeína por apenas uma semana, ao invés de 6 meses, outras bactérias, além de *Pseudomonas*, eram observadas, confirmando a seletividade da cafeína em incubações por longo tempo.

De modo semelhante, Glück & Lingens (1987), Middelhoven & Bakker (1982) e Asano *et al.* (1983) obtiveram, a partir de solo, isolados de *P. putida* apresentando capacidade para degradar cafeína. No isolamento também foi usado o enriquecimento do meio com cafeína. Os isolados de Glück & Lingens (1987) e Asano *et al.* (1983) cresceram em 2% de cafeína e o de Middelhoven & Bakker (1982) em 0,5%.

Vários isolados bacterianos degradando cafeína foram isolados por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995), a partir de solo cultivado com café. Além de *P. putida* e *Pseudomonas fluorescens*, foram isoladas *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp. e uma bactéria corineforme. Os isolados de *P. putida* foram os que apresentaram maior capacidade de crescer em meio contendo exclusivamente cafeína como fonte de carbono e nitrogênio. Crescimento de alguns isolados de *P. putida* foi observado em até 5% de cafeína em meio sólido (Fig. 1). Nessa concentração a cafeína cristalizava-se no meio, tornando-o opaco, e à medida em que havia o crescimento, no local do crescimento o meio voltava a ficar translúcido. Além de cafeína, vários desses isolados apresentaram capacidade para degradar outras metilxantinas, como é mostrado na Tabela 1.

Talvez o determinante para que os isolados de Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995) tenham crescido em 5% de cafeína, concentração mais alta do que a de qualquer relato anterior na literatura, tenha sido o fato de ter sido usado solo coletado sob plantas de café. Suporte para isso vem da maneira como foi feito o isolamento, ou seja, não foi feito enriquecimento e/ou cultivo prolongado com o alcalóide. Amostras de 10 g solo foram

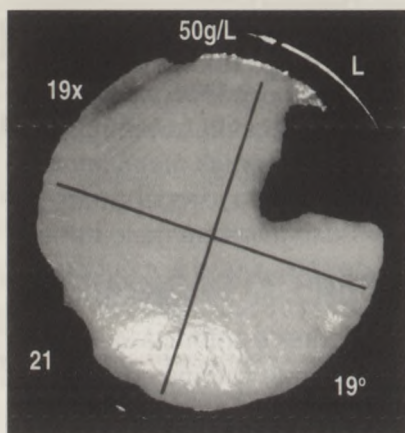


FIGURA 1. Crescimento de isolados de *Pseudomonas putida* em meio sólido contendo cafeína (50g/L) como única fonte de carbono e nitrogênio.

TABELA 1. Degradação de outras metilxantinas por isolados de *Pseudomonas putida* e linhagens controle, após 96 h de incubação. A concentração inicial dos compostos no meio era 0,3 g/L. Os dados são expressos em mg/L.

	THF*	THB	XAN	HPX	URI
<b>CONTROLES</b>					
1806	150	280	0	9	0
PC11B	200	282	0	8	2
<i>Pseudomonas putida</i>					
isolado L	25	28	0	8	4
isolado dob5	0	0	0	9	2
isolado Pp	0	0	0	8	2

\* THF = teofilina; THB = teobromina; XAN = xantina; HPX = hipoxantina; URI = ácido úrico

ressuspensas em meio mineral líquido, contendo apenas cafeína (0,03%) como fonte de carbono e nitrogênio e incubadas por 72 horas. Após diluições em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ), 0,1 ml foi semeado em placas com meio sólido Nutriente Agar e incubadas a 30°C. Colônias crescendo nessas placas foram, então, transferidas para placas com meio mineral sólido contendo apenas cafeína (0,03%) como fonte de carbono e nitrogênio, e incubadas a 30°C por 48 horas. Anteriormente, Mazzafera *et al.* (1995) obtiveram ainda, de maneira mais simples, um isolado de *Serratia marcescens*, ressuspendendo amostras de solo sob cultivo de café em água, com posterior semeadura em meio sólido contendo cafeína.

Para ambos os casos citados acima, onde o isolamento foi feito a partir de solo cultivado com café, as bactérias isoladas provavelmente já se apresentavam adaptadas para degradar a cafeína proveniente de cafeeiros. De outro modo, o que ocorre naturalmente nesses solos foi o que Blecher & Lingens (1977) provocaram, ao incubarem por seis meses solo ao qual foi adicionada cafeína.

Woolfolk (1976) observou que, quando células de *P. putida* crescidas em meio contendo xantina, ao invés de cafeína, eram usadas como inóculo em meio contendo cafeína, havia atraso no crescimento. O mesmo foi posteriormente observado por Blecher & Lingens (1977), quando o inóculo foi crescido em xantina e ácido úrico. Porém, o crescimento era normal, quando o inóculo foi preparado com 7-metilxantina e teobromina. Semelhantemente, quando o isolado L de *P. putida*, obtido por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995), foi crescido em meio rico em nutrientes (Luria-Broth-LB) e usado como inóculo em meio contendo apenas cafeína (M9), também houve um atraso no crescimento e na degradação de cafeína, quando comparado com inóculo produzido em meio com cafeína (Fig. 2a,b). Portanto, a degradação de cafeína nessas bactérias parece ser induzida pelo próprio alcalóide.

## ASPECTOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA

Dikstein *et al.* (1957) e Bergmann *et al.* (1964) detectaram em linhagens de *Pseudomonas* a presença de uma desidrogenase capaz de oxidar 3-metilxantina, mas não 1-metilxantina.

Mais tarde, utilizando o mesmo grupo de bactérias, Woolfolk (1975) concluiu que uma desidrogenase, provavelmente xantina desidrogenase, era capaz de oxidar 1 e 3-metilxantina. O mesmo autor sugeriu que a cafeína seria inicialmente metabolizada por ação de uma enzima que, hidroliticamente, removeria os três grupos metil, com a produção de metanol e xantina livre. O metanol provavelmente seria oxidado para CO<sub>2</sub>.

A degradação da cafeína sob efeito de concentração de oxigênio foi analisada por Middlhoven & Bakker (1982) em *P. putida*, isolada de solo. Concluíram que a primeira etapa enzimática resultava numa remoção sucessiva dos três grupos metil da molécula de cafeína, reações provavelmente catalizadas por monooxigenases.

Sauer (1982) obteve indicações de atividade de citocromo P-450 em extratos protéicos de leveduras degradadoras de cafeína, deduzindo que o metabolismo do alcalóide poderia ser semelhante ao do homem.

Por outro lado, Schwimmer *et al.* (1971), estudando em fungos a degradação de cafeína para teofilina, e Blecher & Lingens (1977), em bac-

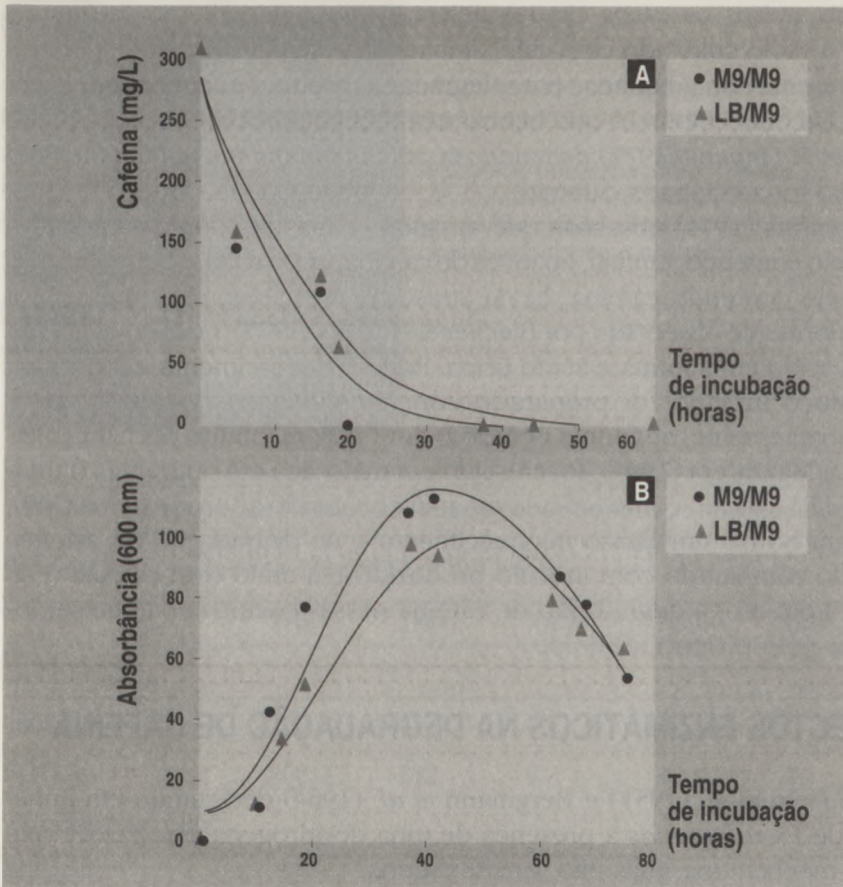


FIGURA 2. Degradação de cafeína (A) e crescimento (B) do isolado L de *Pseudomonas putida* a partir de inóculo produzido em meio M9 (com cafeína) e LB (sem cafeína).

térias, de cafeína para teobromina, observaram que a degradação era diferente daquela observada em leveduras, indicando a participação de diferentes enzimas no metabolismo.

Aspectos enzimológicos da demetilação da cafeína em uma linhagem mutante de *P. putida*, identificada por Blecher & Lingens (1977), foram investigados por Hohnloser *et al.* (1980). Usando cafeína como substrato e NADPH e o íon cobalto como cofatores, observaram somente a produção de teobromina, indicando que havia um só sistema de enzima que demetilava a cafeína. Utilizando outras xantinas metiladas (paraxantina, teobromina e 7-metilxantina) no lugar de cafeína, não se observou nenhuma atividade. Os resultados sugeriram que o crescimento pobre das bactérias no meio de cultura, usando a cafeína como fonte de carbono, era decorrente da baixa taxa de demetilação e que era o fator limitante



para o crescimento dos microrganismos. O fato do extrato enzimático, obtido por Hohnloser *et al.* (1980), ser ativo somente contra cafeína é, de certa forma, conflitante com os resultados de Blecher & Lingens (1977), que observaram crescimento desse mesmo isolado com outras metilxantinas, como teobromina, paraxantina etc.

Gluck & Lingens (1987), também trabalhando com *P. putida*, não conseguiram obter somente teobromina como primeiro produto da degradação de cafeína; a maioria das linhagens produziam uma mistura de teobromina e paraxantina. Esses resultados ajudaram a confirmar os trabalhos de Blecher & Lingens (1977), onde havia sido sugerido que a cafeína é demetilada através de duas vias paralelas, com formação de teobromina e de paraxantina. O trabalho de Mazzafera *et al.* (1995) também evidencia estas duas vias de degradação em *S. marcescens*. Posterior a estes compostos havia formação de 7-metilxantina e xantina. No caso de *S. marcescens*, através de eletroforese em gel de poliácridamida não desnaturante, observou-se atividade de xantina oxidase contra cafeína, dimetilxantinas e monometilxantinas.

## A CAFEÍNA NO SOLO: INCORPORAÇÃO, COMPORTAMENTO QUÍMICO E ALELOPATIA

Como para qualquer alcalóide, cafeína é sintetizada somente por plantas. Deste modo, a sua presença no solo é condicionada à presença de plantas crescendo sobre ele. Ao se desprenderem, folhas, frutos e outras partes da planta são os principais “fornecedores” de cafeína ao solo. Também deve-se considerar a possibilidade da lavagem da cafeína das folhas, feita pela água das chuvas.

Não existem informações precisas sobre a incorporação de cafeína em solo cultivado com plantas que possuam este alcalóide. Em uma estimativa grosseira, pois não consistia de uma situação normal, Waller *et al.* (1986) cortaram um cafeeiro adulto em várias partes e colocaram-nas sobre uma tela suspensa a uma certa distância de um recipiente. Sempre após uma chuva a quantidade de cafeína era estimada na água coletada no recipiente. Desta maneira, chegou-se ao valor de incorporação anual de 1-2 g/m<sup>2</sup> de solo.

Uma vez no solo a cafeína é fortemente adsorvida por argilas, posicionando-se entre as camadas de sílica (Lailach *et al.*, 1968). A estrutura planar da cafeína permite a formação de camadas únicas, com as moléculas inclinadas, ou ainda de camadas duplas, havendo a formação de forças de van der Waals-London com ambas as camadas de sílica. Isto faz com que a retenção da cafeína pela matrix do solo seja extrema-

mente forte, sendo baixa sua recuperação, mesmo sob condições extremas de extração, tal como o uso de ácido sulfúrico ou fluorídrico concentrado (Waller *et al.*, 1986). O emprego de bases fortes (NaOH), como recomendado por Griffith *et al.* (1976), também não melhorou a recuperação de cafeína (Mazzafera, dados não publicados).

Desta forma, a cafeína adsorvida pela matrix do solo seria indisponível para os microrganismos do solo, como também para ter qualquer efeito sobre plantas. Portanto, o efeito alelopático atribuído à cafeína em vários trabalhos (ver referências em Rice, 1984; Rizvi & Rizvi, 1992), como também a autotoxicidade do cafeeiro, causada pela liberação de sua própria cafeína, como alegado por Waller *et al.* (1986), seria possível somente devido à cafeína livre, não adsorvida. Considerando, porém, que esta cafeína disponível poderia ser degradada por microorganismos, como tem sido indicado acontecer (Mazzafera *et al.*, 1995; Yamaoka-Yano & Mazzafera, 1995), o efeito alelopático de cafeína em condições de campo e a própria autotoxicidade sobre o cafeeiro devem ser questionados.

Até o presente, os trabalhos sobre o efeito alelopático de cafeína sempre foram feitos em condições artificiais de laboratório e sempre desconsiderou-se que em condições de campo há a possibilidade da degradação de cafeína por microrganismos do solo. Evidência para a degradação de cafeína em diferentes solos, com diferentes composições em argila (textura), foram dadas por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995), que adicionaram cafeína a amostras de solo que foram esterilizadas ou não. Após um certo período de incubação, muito menos cafeína foi recuperada no solo não estéril. A Tabela 2 mostra os resultados de dois experimentos independentes, sobre a incorporação de cafeína em solo estéril e não estéril.

TABELA 2. Recuperação de cafeína adicionada em amostras de solos estéreis e não estéreis, após uma semana de incubação à temperatura ambiente.

TIPO DE SOLO	TRATAMENTO	% CAFEÍNA RECUPERADA*	
		Experimento 1	Experimento 2
Londrina/PR (textura argilosa)	estéril	69	76
	não estéril	42	53
Marília/SP (textura arenosa)	estéril	62	80
	não estéril	27	41
Campinas/SP (textura intermediária)	estéril	51	87
	não estéril	15	60

\* % da cafeína adicionada

## APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS PARA BACTÉRIAS E OUTROS MICRORGANISMOS COM CAPACIDADE DE DEGRADAR CAFEÍNA

Duas são as principais possibilidades de aplicação tecnológica de microrganismos que apresentam capacidade para degradar cafeína: a descafeinação da palha de café para uso posterior como ração animal e a produção de compostos derivados de cafeína.

Asano *et al.* (1993), utilizando uma linhagem de *P. putida* que crescia em cafeína como única fonte de carbono e nitrogênio, verificaram que a adição de  $Zn^{2+}$  ao meio líquido de cultura resultou em acúmulo de teobromina, sendo a dimetilxantina liberada no meio. Concluíram que o íon atuava como um inibidor seletivo de uma das enzimas que demetilam a teobromina. Sem a adição de  $Zn^{2+}$  quase não havia acúmulo de teobromina, devido à contínua demetilação do alcalóide. Sob condições ótimas de cultivo, com 20 g/L cafeína, obteve-se um rendimento de 92% na produção de teobromina. Este foi o primeiro trabalho mostrando a viabilidade na produção de derivados de cafeína, utilizando-se bactérias como degradadoras do alcalóide.

Mazzafera *et al.* (1995) observaram que um isolado de *S. marcescens* liberava teobromina, paraxantina e 7-metilxantina no meio de cultura quando cultivada em meio com cafeína. Entretanto, devido à baixa taxa de degradação de cafeína e crescimento lento, o seu emprego para a produção de derivados de cafeína foi descartado.

No beneficiamento do fruto do café, a semente, que é o produto de interesse econômico, é retirada e a palha aparece como subproduto, correspondendo a pouco mais de 60% do peso do fruto seco (Coste, 1959).

Na maioria das propriedades rurais, a palha gerada pelo benefício dos frutos do café é geralmente utilizada como adubo na própria lavoura. Entretanto, apesar de apresentar boa composição em relação a outros adubos orgânicos, principalmente no conteúdo de nitrogênio e potássio, a palha tem o inconveniente de ocupar bastante volume, dificultando sua incorporação no solo (Elías, 1987). Este mesmo problema, ou seja, o volume, dificulta o uso da palha para a extração de cafeína (Bressani, 1987b).

Além do uso como fertilizante, vários trabalhos têm sido feitos para a investigação do emprego da palha de café como alimento animal, principalmente para bovinos, equinos, suínos e aves (Braham, 1987; Bressani, 1987b; Cabezas *et al.*, 1987; Jarquín, 1987). Apesar de suas qualidades nutricionais, principalmente o teor de proteínas (Elías, 1987), dois fatores, o alto conteúdo de taninos e cafeína, limitam o seu uso para este fim (Bressani, 1987a; Clifford & Ramirez-Martinez, 1991).

A limitação causada pelos taninos reside no fato de provocar sabor amargo à palha de café, afetando a palatabilidade, e também por complexarem proteínas, formando compostos insolúveis, diminuindo a absorção do nitrogênio pelo trato digestivo dos animais. Recentemente, estudos realizados por Menezes *et al.* (1993) mostraram que uma linhagem de *Lactobacillus plantarum* era capaz de degradar perto de 90% do tanino encontrado na palha de café. O processo de fermentação foi simples, onde palha de café foi homogeneizada e incubada a 32°C por 8 dias na presença de inóculo de 24 horas de *L. plantarum*, com adição de sacarose 1%. Apesar de não ter sido testado, os autores sugeriram o uso dessa palha na alimentação animal.

Quanto às limitações impostas pela cafeína, são listadas desde o gosto amargo, também afetando a palatabilidade, até uma série de distúrbios fisiológicos que podem surgir quando ingerida em grande quantidade. James (1991) apresenta excelente revisão sobre o excesso no consumo de cafeína em animais de laboratório e suas consequências fisiológicas. Estudos com animais de médio e grande porte foram revistos por outros autores (Braham, 1987; Bressani, 1987b; Cabezas *et al.*, 1987; Jarquín, 1987).

De modo geral, os estudos do uso da palha de café como alimento animal foram feitos colocando-a como um componente de silagem, tendo já sido observada uma redução, não acentuada, no teor de cafeína (Murillo, 1987). Estudos mais recentes com um isolado do fungo *Peni-*

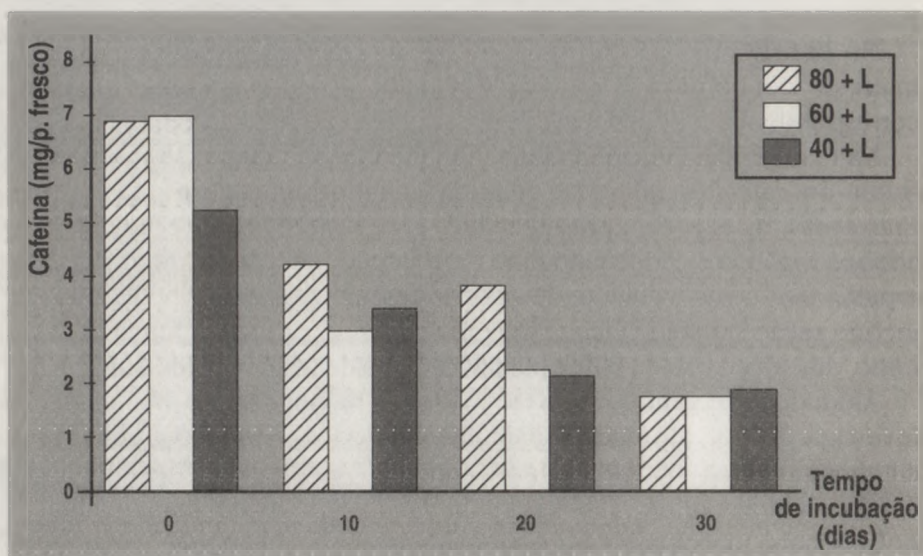


FIGURA 3. Redução no conteúdo de cafeína em palha de café após inoculação com o isolado L de *Pseudomonas putida*.

*cillium roqueforti* mostraram a potencialidade do emprego de microrganismos para a redução significativa desse alcalóide em palha de café (Roussos *et al.*, 1989).

Devido à alta capacidade do isolado L de *P. putida* em degradar cafeína, Mazzafera & Yamaoka-Yano (dados não publicados) realizaram ensaios preliminares para averiguar a possibilidade do seu emprego na descafeinação da palha de café, para uso na alimentação animal. Inóculo (1 ml) de cultura de 24 horas foi adicionado à palha de café (20 g), que havia sido umedecida a 40, 60 e 80% de seu peso, e a intervalos de 10 dias foram tiradas amostras para dosagem de cafeína. Antes da inoculação, a palha foi esterelizada em autoclave. Após 30 dias de incubação, a cafeína havia sido drasticamente reduzida (Fig. 3), demonstrando o potencial de aplicação desse isolado.

## CONCLUSÕES

Apesar dos vários trabalhos sobre a degradação de cafeína por bactérias, pouco ainda realmente se conhece sobre os passos metabólitos envolvidos, principalmente no que diz respeito às enzimas atuantes no processo. Há de se considerar porém, que alguns trabalhos com diferentes bactérias mostraram que diferentes enzimas podem estar envolvidas.

Além do uso potencial de bactérias para a produção de derivados de cafeína ou na descafeinação da palha de café e seu emprego como alimento animal, deve-se ressaltar que genes codificando enzimas para a degradação de cafeína poderiam ser isolados e utilizados na produção de plantas transgênicas, mais especificamente, café e chá, sabidamente possuidoras de cafeína e com amplo consumo de suas bebidas. O mercado para o café descafeinado atualmente representa próximo a 25% de todo o café comercializado no mundo. Esta é uma alternativa bastante atraente em face às dificuldades apresentadas na produção de plantas transgênicas, portando DNA antisense para a enzima envolvida na síntese desse alcalóide em café (Mazzafera *et al.*, 1994). Portanto, ao invés de bloquear a síntese de cafeína no tecido vegetal, seria estimulada a sua degradação a partir do gene bacterial.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASANO, Y.; KOMEDA, T.; YAMADA, H. Microbial production of theobromine from caffeine. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v.57, p.1286-1289, 1993.
- BERGMANN, F.; UNGAR-WARON, H.; KWIETNY-GOVRIN, H. Action of 8-azaguanine and 8-azaxanthine on *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical Journal**, Liverpool, v.91, p.270-276, 1964.

- BERKELEY, R.C.W. Microbiology of soil. p.479-514. In: HAWKER, L.E.; LINTON, A.H., ed. **Microorganisms** function form and environment. London: Edward Arnold, 1971.
- BLECHER, R.; LINGENS, F. The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.** Bd., Strassburg, v.358, p.807-817, 1977.
- BRAHAM, J.E. Coffee pulp in other species. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp** composition, technology, and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.51-54.
- BRESSANI, R. Antiphysiological factors in coffee pulp. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp** composition, technology, and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987a. p.83-88.
- BRESSANI, R. Potential uses of coffee berry by-products. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp** composition, technology, and utilization. Panamá: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987b. p.17-25
- CABEZAS, M.T.; FLORES, A.; EGANA, J.I. Use of coffee pulp in ruminant feeding. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp** composition, technology, and utilization. Panamá: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.25-38.
- CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, New York, v.40, p.35-42, 1991.
- COSTE, R. **Les caféiers et les cafés dans le monde**. Paris, Éditions Larose, 1959. t.2, v.1.
- DIKSTEIN, S.; BERGMANN, F.; HENIS, Y. Studies on uric acid and related compounds. IV. The specificity of bacterial xanthine oxidases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.224, p.67-77, 1957.
- ELÍAS, L.G. Chemical composition of coffee-berry by-products. In: BRAHAM, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp** composition, technology, and utilization. Panama: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.11-16.
- GLUCK, M.; LINGENS, F. Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.25, p.334-340, 1987.
- GRIFFITH, S.M.; SOWDEN, F.J.; SCHNITZER, M. The alkaline hydrolysis of acid-resistant soil and humic acid residues. **Soil Biology and Biochemistry**, Victoria, v.8, p.529-531, 1976.
- HOHNLOSER, W.; OSSWALD, B.; LINGENS, F. Enzymological aspects of caffeine demethylation and formaldehyde oxidation by *Pseudomonas putida* C1. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologie und Chemie**, Strassburg, v.361, p.1763-1766, 1980.
- JAMES, J.E. **Caffeine and Health**. San Diego: Academic Press, 1991.
- JARQUÍN, R. Coffee pulp in swine feeding. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp** composition, technology, and utilization. Panama: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.39-49.
- LAILACH, G.E.; THOMPSON, T.D.; BRINDLEY, G.W. Absorption of pyrimidines, purines, and nucleosides by Li-, Na-, Mg-, and Ca-Montmorillonite (clay-organic studies XII). **Clays and Clay Mineralogy**, London, v.16, p.286-293, 1968.
- MAZZAFERA, P.; WINGSLE, G.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. S-adenosyl-L-methionine:theobromine 1-N-methyltransferase, an enzyme catalysing the synthesis of caffeine in coffee. **Phytochemistry**, Oxford, v.37, p.1577-1584, 1994.
- MAZZAFERA, P.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. **Microbial Ecology**, New York, 1996. No prelo.
- MENEZES, H.C.; SAMAAN, F.S.; CLIFFORD, M.N.; ADAMS, M.R. The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LA CHIMIE DU CAFÉ, 15., Montpellier. **Resumos** Montpellier, Association Scientifique Internationale du Café, s.d. p.858-860.
- MIDDELHOVEN, W.J.; BAKKER, C.M. Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* strain C3024. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.15, p.214-217, 1982.

- MORITA, R.Y. Survival and recovery of microorganisms from environmental samples. In: LEVIN, M.A.; SEIDLER, R.J.; ROGUL, M. ed **Microbial Ecology** principles, methods, and applications. New York, McGraw-Hill, Inc., 1992. p.435-453
- MURILLO, B. Coffee-pulp silage. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp**: composition, technology, and utilization. Panamá: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.55-62.
- RICE, E.L. **Allelopathy** 2. ed. Orlando, Academic Press, 1984.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. ed. **Allelopathy** London: Chapman & Hall, 1992. p.443-472.
- ROUSSOS, S.; AQUIAHUATL, A.; CASSAIGNE, J.; FAVELA, E.; GUTIERREZ, M.; HANNIBAL, L.; HUERTA, S.; NAVA, G.; RAIMBAULT, M.; RODRIGUEZ, W.; SALAS, J.A.; SANCHEZ, R.; TREJO, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGÍA EN LA AGROINDUSTRIA CAFETALERA, 1., Xalapa, México. **Resumos** Xalapa: Instituto Mexicano del Café, s.d. p.123-143.
- SCHWIMMER, S.; KURTZMAN, R.H., JR.; HEFTMANN, E. Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.147, p.109-113, 1971.
- VOGELS, G.D.; DRIFT, C.v.d. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. **Bacteriological Review**, Baltimore, v.40, p.403-468, 1976.
- WALLER, G.R.; KUMARI, D.; FRIEDMAN, J.; FRIEDMAN, N.; CHOU, C.H. Caffeine autotoxicity in *Coffea arabica* L. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.-S. ed. **The Science of Allelopathy**. New York: John Wiley, 1986. p.243-269.
- WOOLFOLK, C.A. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on the caffeine as sole source of carbon and nitrogen. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.123, p.1088-1106, 1975.
- YAMAOKA-YANO, D.M.; MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by *Pseudomonas* and other bacteria isolated from soil. Enviado para publicação em **Revista de Microbiologia**. São Paulo, 1995.





# 14

## BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

Yoko Bomura Rosato

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

UNICAMP, Cidade Universitária

Caixa Postal 6109, CEP 13087-930

Campinas, SP

### I. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos e com um alto conteúdo de energia. Ele se origina do betume das rochas-mãe, que determina as diferenças na sua composição básica. O petróleo, ou óleo cru, sofre mudanças consideráveis na composição durante a migração primária. Somente uma pequena quantidade do betume total disperso é mobilizado e transferido para as rochas-reservatório e ainda uma menor quantidade é acumulada nos poços. Nas áreas de produção, a taxa de óleo betume varia de 1:10 a 1:10.000. A comparação entre o betume presente nas rochas-mãe e o óleo no reservatório mostra que a drenagem é seletiva. As moléculas mais pesadas e polares, como o asfalteno, são fortemente adsorvidas na rocha-mãe e dificilmente são expelidas para o reservatório. Conseqüentemente, a composição do petróleo está na dependência da capacidade de adsorção desses compostos, ou seja, os hidrocarbonetos saturados menos polares são mais frequentes, seguidos pelos compostos aromáticos e benzotiofenos, e os menos abundantes são as resinas mais polares e facilmente adsorvidas e os asfaltenos menos solúveis. Mesmo considerando-se os n-alcenos, as moléculas mais leves parecem ser mais favorecidas do que as pesadas (Tissot *et al.*, 1978).

O petróleo é considerado termodinamicamente metaestável sob condições geológicas. Nos reservatórios é altamente suscetível a alterações, causadas por diferentes fatores e observadas mundialmente. As causas, químicas ou físicas, podem estar relacionadas com a relativa instabilidade-

de do petróleo e/ou o fato de que estão num sistema aberto e grau de profundidade variável. As alterações levam conseqüentemente a mudanças na composição do óleo, de tal forma que obscurece suas características, influenciando a qualidade e seu valor econômico. As alterações do tipo termal e o deasfaltamento podem ocorrer simultaneamente e levam a uma composição de óleos mais leves, devido à precipitação dos compostos mais pesados. Os outros dois processos, biodegradação e efeito da água, ou seja, a alteração microbiana e a remoção de compostos solúveis em água, são comumente observadas em áreas invadidas por água proveniente do solo ou chuvas. Os dois processos não são necessariamente acoplados, mas freqüentemente observados em combinação. A água carrega oxigênio dissolvido e microrganismos para o reservatório e os coloca em contato com a interface óleo-água.

## II. BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

A capacidade de certos microrganismos serem capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono foi apresentada por ZoBell em 1946. Ele também verificou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza, e a utilização de hidrocarbonetos era altamente dependente da natureza química dos compostos existentes na mistura do petróleo e das condições ambientais.

Na década de 60 ocorreram três incidentes levando à poluição ambiental por petróleo: o naufrágio do tanque Torrey Canyon no English Channel, o incidente de Santa Barbara e o ocorrido na Florida. Esses três acidentes focalizaram o problema da poluição ambiental e diversos estudos foram iniciados para verificar o destino e as conseqüências do derrame de petróleo no ecossistema. A demanda crescente na utilização dessa fonte de energia levando à exploração de novas fronteiras, incluindo o oceano e a região Ártica, assim como os derrames acidentais que ocorrem durante as operações de exploração, refinaria, transporte e armazenamento, têm mantido as pesquisas em desenvolvimento constante. Outros acidentes mais recentes como o derrame de mais de 200.000 barris de petróleo do Exxon Valdez, no Alaska, tem levado a uma maior discussão dos problemas. O enfoque é também influenciado por uma maior divulgação dos incidentes que ocorrem ao redor do mundo e a consciência ecológica despertada pelas contaminações do solo, mananciais de água e principalmente do oceano e faixas litorâneas.

A biodegradação do petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. Alguns compostos do

petróleo são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na natureza. Várias revisões que tratam da degradação de hidrocarbonetos por microrganismos incluem os fatores, as vias metabólicas, os principais tipos de microrganismos e os efeitos da contaminação em comunidades microbianas (Atlas, 1977, 1981, 1984; Colwell e Walker, 1977; Leahy e Colwell, 1990). A maioria das revisões enfoca também o problema da poluição nos oceanos e áreas litorâneas que, além de serem os últimos receptores da poluição do petróleo são também os locais onde ocorrem os grandes derrames de óleo (Bartha & Atlas, 1977; Colwell e Walker, 1977; Prince, 1993).

Essa revisão pretende apresentar as bases da ecologia microbiana da degradação de hidrocarbonetos considerando-se os fatores biológicos e ambientais. Serão também apresentados aspectos da biodegradação no ambiente terrestre e principalmente marinho. Alguns casos, como o derrame ocorrido em Prince William Sound no Alasca, são descritos em maior detalhe. Um novo aspecto da biodegradação ou fitorremediação é também descrito. No contexto dessa revisão, a palavra biodegradação significa quebra de componentes do petróleo para componentes de menor peso molecular ou mais polares. Por ser o petróleo composto principalmente de hidrocarbonetos, a biodegradação completa resulta na produção de dióxido de carbono e água. Apesar da composição do petróleo (óleos refinados e resíduos petroquímicos) ser muito variável, as estratégias utilizadas para a biodegradação têm sido muito similares e muitas das considerações a serem efetuadas nesta revisão são aplicáveis à maioria dos tipos de componentes.

## **II. 1. Biodegradação dos Componentes Isolados do Petróleo**

O petróleo contém hidrocarbonetos, que variam da simples molécula, como metano, a moléculas com alto peso molecular. A maioria dessas moléculas é composta de carbono e hidrogênio, mas a maioria dos óleos contém uma pequena porcentagem de enxofre orgânico e traços de nitrogênio orgânico. Os diferentes componentes do petróleo são usualmente agrupados em frações, dependendo de suas propriedades físico-químicas. As principais frações são as parafinas, os cicloalcanos, os aromáticos e uma fração asfáltica ou polar. Cada uma dessas frações pode ser subdividida em grupos de moléculas, mas não há ainda uma lista compreensível incluindo todas as moléculas. Isso pode ser atribuído ao enorme número de moléculas presentes e à falta de processos químicos adequados para resolver as moléculas individualmente.

As vias metabólicas utilizadas para degradação dos compostos existentes no petróleo têm sido revisadas por diferentes autores (Rogoff, 1961;

Van der Linde & Thijsse, 1965; MacKenna & Kallio, 1965; Gibson, 1968, 1971; Markovetz, 1971; Stirling, 1977; Perry, 1977, 1979). Há uma grande diversidade taxonômica nos organismos capazes de degradar hidrocarbonetos (Austin *et al.*, 1977; Kaneko *et al.*, 1979; Atlas, 1981; Leahy & Colwell, 1990). A maioria dos estudos de microbiologia da degradação de hidrocarbonetos inclui organismos mesofílicos. Alguns microrganismos foram encontrados em ambientes extremos, como na região Ártica e Antártida (Premuzic & Lin, 1991; Karl, 1992), mas poucos foram encontrados em ecossistemas com altas temperaturas. Nessas condições foram detectadas evidências de biodegradação em temperaturas de até 60°C, como no deserto do Kuwait (Sorkhoh *et al.*, 1993). Todos os isolados bacterianos pertencem ao grupo Bacteria, exceto por uma bactéria halotolerante pertencente ao grupo de Proteobacteria (Bertrand *et al.*, 1990), distribuídos em diversos gêneros. Apesar das bactérias serem provavelmente as maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente, fungos e leveduras (Cerniglia *et al.*, 1977; Oudot *et al.*, 1987; Snellman *et al.*, 1988; Kirk & Gordon, 1988; Blasig *et al.*, 1989; Macgillivay & Shiaris, 1993), cianobactérias, algas e mesmo protozoários apresentam capacidade de degradação (Cerniglia *et al.*, 1979, 1980; Kaska *et al.*, 1991).

Como a degradação de hidrocarbonetos para CO<sub>2</sub> envolve uma reação de oxidação, os organismos, em sua maioria, são aeróbicos. Entretanto, parece ocorrer uma taxa lenta de degradação anaeróbica, como no caso do tolueno e xileno, em condições de redução de sulfato (Rogerson *et al.*, 1981; Saylor *et al.*, 1983; Roszak & Colwell, 1987), nitrato (Spain & Van Veld, 1983; Schutt, 1989; Gilewicz *et al.*, 1991) e FeII (Schwarz *et al.*, 1974).

O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO<sub>2</sub> na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados como glóbulos e alguns alcanos podem ser incorporados como biomassa (Bertrand *et al.*, 1983; Dumenil *et al.*, 1988), ou convertidos para produção de diferentes lipídios aplicáveis na indústria oleoquímica (Radwan & Sorkhoh, 1993). A longo prazo, a maioria dos hidrocarbonetos é convertida a CO<sub>2</sub>; entretanto, os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original e, portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (Wang *et al.*, 1990).

## II. 1. 1. Biodegradação da fração saturada

A fração saturada compreende os n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicloalcanos (naftenos). Os n-alcanos são considerados os mais facil-

mente degradáveis e foi demonstrada a biodegradação de até n-C<sub>4</sub> (Haines & Alexander, 1974). A biodegradação dos n-alcenos procede normalmente por um ataque monoterminal: há formação de um álcool primário, seguido por um aldeído e um ácido monocarboxílico (MacKenna & Kallio, 1964; Miller & Johnson, 1966; Van der Linden & Thijsse, 1965; Van Eyk & Bartels, 1968). O ácido carboxílico é degradado via  $\beta$ -oxidação com a formação de ácidos graxos com dois C a menos e formação de acetil-coenzima A, com liberação eventual de CO<sub>2</sub>. Ácidos graxos, alguns dos quais tóxicos, podem se acumular, durante o processo de biodegradação (Atlas & Bartha, 1973; King & Perry, 1975). Outras vias podem ser encontradas em alguns casos (Atlas, 1981). Os alcenos altamente ramificados, como o pristano, sofrem uma  $\beta$ -oxidação com formação de ácidos dicarboxílicos, como a via degradativa mais comum (MacKenna & Kallio, 1971; Pirnick *et al.*, 1974). Os grupos metil aumentam a resistência dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano (Pirnick, 1977; Fall *et al.*, 1979; Schaeffer *et al.*, 1979). Os cicloalcenos são particularmente resistentes à biodegradação (Ooyama & Foster, 1965; Stirling *et al.*, 1977; Perry, 1979; Chosson *et al.*, 1991). Os compostos alicíclicos, como os hopanos (compostos tripentacíclicos), estão entre os mais persistentes na natureza. O metabolismo microbiano dos hidrocarbonetos cíclicos foi revisto por Perry (1977) e, no máximo, seis anéis condensados podem ser degradados (Walker *et al.*, 1975). Vários cicloalcenos não substituídos, incluindo os cicloalcenos condensados, sofrem co-oxidação com formação de acetona ou álcool (Beam & Perry, 1973, 1974,ab; Perry, 1979). Ocorrida a oxidação, a degradação procede via clivagem do anel. A degradação de cicloalcenos substituídos parece ocorrer mais facilmente do que a degradação das formas não substituídas, particularmente se há n-alcenos substituintes de comprimento de cadeia adequado (Perry, 1979). Em tais casos, o ataque microbiano ocorre primeiro na porção substituída, levando a um produto intermediário do ácido carboxílico cicloexano ou um composto relacionado. O outro passo para a degradação do ácido carboxílico cicloexano envolve a formação de um intermediário aromático, seguida pela clivagem da estrutura aromática.

## II. 2. 2. Biodegradação da fração aromática

A degradação de compostos aromáticos tem recebido maior atenção e foi descrita por vários autores (Rogoff, 1961; Gibson, 1968, 1971; Cerniglia, 1992). Um, dois ou três anéis aromáticos são degradados facilmente e há linhagens capazes de degradar compostos com até cinco anéis aromáticos. Os compostos com menor número de anéis são degradados mais facilmente. Tipicamente a degradação bacteriana envolve a ação de uma

dioxigenase que gera a formação de um diol, com subsequente clivagem e formação de um diácido como cis, cis-ácido mucônico. Em organismos eucariotos, entretanto, a oxidação por uma monoxigenase leva à formação de um trans-diol, como por exemplo, trans-1,2-diidroxi-1,2-diidro-naftaleno, proveniente do naftaleno (Ferris *et al.*, 1976; Cerniglia & Gibson, 1977, 1978; Cerniglia *et al.*, 1978). Os resultados indicam que somente um átomo de oxigênio molecular é incorporado no núcleo aromático. Em fungos, há formação de trans-7,8-diidroxi-7,8-diidroxibenzopireno por *Cunninghamella elegans*, proveniente da oxidação de benzopireno. As cianobactérias também se mostraram capazes de oxidar naftaleno no claro, mas não no escuro, utilizando diferentes mecanismos para iniciar a oxidação do naftaleno e mesmo bifenil (Cerniglia & Gibson, 1979; Cerniglia *et al.*, 1980). Os compostos aromáticos mais leves são sujeitos à evaporação e à degradação microbiana no estado dissolvido. O ataque enzimático pode ser no substituinte alquil ou diretamente no anel (Gibson, 1971). As estruturas condensadas podem sofrer um processo de degradação similar às estruturas monocíclicas (Gibson, 1975; Dean-Raymond & Bartha, 1975), sendo, entretanto mais resistentes.

## II. 2. 3. Biodegradação da fração asfáltica

Os passos metabólicos para a degradação dos componentes asfálticos são menos compreendidos. Eles são complexos na sua estrutura e de difícil análise. Diversos isolados bacterianos são capazes de mineralizar moléculas contendo enxofre ou nitrogênio, diretamente ou cometabolicamente (Aislabie *et al.*, 1989, 1990; Fedorak *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992), mas uma melhor compreensão da biodegradação dessas moléculas tem sido dificultada pela ausência de métodos analíticos mais precisos. Essa deficiência técnica é mais extrema para análise das resinas e os asfaltenos. Pouco se conhece sobre a degradabilidade dessas moléculas e supõe-se que sejam inertes para a biodegradação.

## III. MICRORGANISMOS CAPAZES DE DEGRADAR HIDROCARBONETOS

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias e fungos. Eles podem ser encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Os organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente de forma que é requerida uma mistura de populações com capacidade enzimática ampliada para degradação de comple-

xos de hidrocarbonetos encontrados no petróleo existente no solo (Bosset & Bartha, 1984), água (Cooney, 1984) e no mar (Atlas, 1981; Floodgate, 1984). Em 1946, Zobell descreveu mais de 100 espécies, representando 30 gêneros diferentes. Bartha & Atlas (1977) expandiram a lista para 22 gêneros de bactérias, 1 de algas e 14 de fungos isolados de ambientes aquáticos. Floodgate (1984) listou 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos, todos isolados de ambiente marinho. Do solo foram registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos (Bosset & Bartha, 1984). Os gêneros mais comuns de degradadores de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos foram principalmente bactérias e leveduras dos gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Os fungos parecem ser mais importantes na biodegradação que ocorre em amostras do solo (Jones & Eddington, 1968). Onze gêneros de fungos e 6 de bactérias foram os mais comuns. Cerniglia & Perry (1973) verificaram que fungos como *Penicillium* e *Cunninghamella* spp. apresentavam maior capacidade de degradação do que *Flavobacterium*, *Brevibacterium* e *Arthrobacter* spp. Em geral, as bactérias e leveduras apresentam capacidade decrescente de degradação de acordo com o aumento da cadeia de carbono ao passo que os fungos não exibem degradação preferencial de tamanho (Walker *et al.*, 1975). Além dos gêneros de leveduras acima citados, Komagata *et al.* (1964) e Ahearn *et al.* (1971, 1973) ampliaram a lista, incluindo *Candida*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* e *Trichosporon*.

Segundo a literatura, os gêneros mais importantes de bactérias, tanto de ambiente terrestre como marinho são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas* spp. e os corineformes. As linhagens de *Vibrio* são limitadas ao ambiente marinho (Leahy & Cowell, 1990). *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Nocardia* spp., pertencentes à família Enterobacteriaceae, actinomicetes e os corineformes perfazem 95% dos isolados (Austin *et al.*, 1977). Entre os fungos, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* spp. são os isolados mais comuns do ambiente marinho e *Trichoderma* e *Mortierella* spp. são mais comuns no solo.

A participação de bactérias, fungos ou leveduras no processo de biodegradação dos hidrocarbonetos, apesar dos estudos limitados, parece ser função do ecossistema e das condições ambientais.

Recentemente foram descritas algumas espécies de protozoários capazes de transformar n-alcenos e potencialmente alcenos halogenados (Polne-Fuller, 1987; Kaska *et al.*, 1991) ou acelerar a degradação (Rogerson & Berger, 1983).

## IV. BIODEGRADAÇÃO NO AMBIENTE MARINHO

O óleo cru ou petróleo bruto constitui o maior componente dos derrames que ocorrem no mar, pois é a carga principal dos grandes cargueiros. Os produtos refinados estão também trafegando em quantidades maiores mas usualmente em cargueiros menores.

Num derrame de petróleo no mar ocorre uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, alterando a composição original dos hidrocarbonetos. O despejo do petróleo em grandes quantidades afeta o ecossistema e o grau dessa alteração depende da localização do derrame, do tipo de óleo e da quantidade. Os derrames catastróficos ocorrem em geral nas regiões costeiras, afetando o ecossistema marinho e litorâneo. Inicialmente o petróleo se espalha pela superfície da água, sofre um processo de evaporação e os componentes solúveis em água se dissolvem no oceano. Os componentes voláteis do óleo começam imediatamente a evaporar e, à medida em que o óleo se espalha, forma-se uma fina camada na superfície da água. Com isso há aumento da viscosidade e densidade do óleo, limitando sua dispersão. A luz do sol pode induzir oxidações em algumas moléculas, podendo em alguns casos levar a uma degradação completa para  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Nagata & Kondo, 1977). Alguns grandes derrames de petróleo, ocorridos de 1976 a 1989, da ordem de  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  galões, desapareceram no mar sem impactos maiores na região costeira. O desaparecimento está na realidade associado com o efeito de diluição, não de remoção ou degradação completa. Em outros casos, os derrames ocorrem próximos à região costeira, levando a uma poluição dessa região. Uma vez em contato com o sedimento, ocorrem reações complexas, que tornam os compostos aromáticos mais protegidos (Weissenfels *et al.*, 1992).

Os surfactantes desempenham um papel importante para a remediação *in situ* e também como uma medida auxiliar para estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos. Eles permitem a solubilização dos diversos componentes do petróleo, aumentando a área de superfície e permitindo um maior contato dos microrganismos com o substrato. A emulsificação permite também maior aeração e dispersão de nutrientes. Há, entretanto, hidrocarbonetos de cadeia longa e insolúveis. Como ocorre a interação nesse caso? Prince (1993) apresenta três mecanismos não excludentes: interação com os baixos níveis de material dissolvido, contato direto com as gotas ou superfícies da fase insolúvel e interação com hidrocarbonetos pseudo-solubilizados pela interação com os surfactantes. Diversos microrganismos são produtores de agentes surfactantes (ZoBell, 1946; Abbott & Gledhill, 1971; Reisfeld *et al.*, 1972; Guire *et al.*, 1973;



Zajic *et al.*, 1974; Iqbal *et al.*, 1995) e alguns têm sido utilizados para limpeza de tanques-reservatórios de petróleo (Gutnick & Rosenberg, 1977). O papel dos surfactantes pode ser observado em mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, incapazes de crescer em hexadecano. Alguns desses mutantes não produzem ramolipídio e eram incapazes de absorver o hexadecano; entretanto, a adição exógena do composto ausente restaurava a capacidade de crescer em meio contendo o composto (Koch *et al.*, 1991). O outro tipo de mutante de *P. aeruginosa*, induzido por raios gama, apresentou um aumento de 3-4 vezes na produção de surfactante com aumento concomitante na biodegradação de heptadecano (Iqbal *et al.*, 1995). A eficiência dos biosurfactantes levou à análise de surfactantes químicos mais baratos, como por exemplo heptametilnonano, Triton X, Tween 20 e álcool etoxilado (Bury & Miller, 1993). Apesar do papel dos surfactantes ser claro, em alguns casos, há controvérsias, pois alguns dispersantes podem inibir a degradação (Foght *et al.*, 1982; Efrogmson & Alexander, 1991) e os efeitos tóxicos causarem maior impacto ambiental do que o petróleo em si.

## V. EFEITO DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS NA BIODEGRADAÇÃO

### V.1. Temperatura

A temperatura influencia a biodegradação pelo efeito na natureza física e química do petróleo bem, como pela alteração na população microbiana. A biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer numa faixa de temperatura relativamente grande, de 0° a 70°C (Mateles *et al.*, 1967; Sorkhoh *et al.*, 1993). Em geral, à baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização dos alcanos de cadeia curta é reduzida, o que leva a um processo de biodegradação mais lento, devido à redução na atividade enzimática. Tipicamente o metabolismo dos hidrocarbonetos é máximo à temperatura de 30-40°C.

Ocorrem mudanças cíclicas na composição da comunidade microbiana que existe naturalmente nos derrames de petróleo, o que se reflete na taxa de biodegradação. Atlas e Bartha (1973), por exemplo, verificaram que no inverno era detectável um maior número de microrganismos capazes de crescer a 5°C do que em outras estações. O efeito da temperatura difere, dependendo da composição dos hidrocarbonetos. A presença de componentes tóxicos voláteis retarda o processo de biodegradação a baixas temperaturas (Atlas & Bartha, 1972). Os diferentes tipos de petróleo também sofrem biodegradação diferenciada dependendo da tem-

peratura de incubação (Atlas, 1975). A 20°C, os óleos mais leves apresentaram maiores perdas abióticas e maior suscetibilidade à biodegradação; os óleos mais pesados apresentaram taxa de mineralização mais lenta. Entretanto, a temperaturas mais baixas (10°C), há menor volatilização dos compostos tóxicos e voláteis, ocasionando uma fase lag antes do início do processo de biodegradação, o que não ocorre com os compostos mais pesados. Alguns autores relatam uma biodegradação mais intensiva a baixas temperaturas, usando-se culturas adaptadas à mesma temperatura de incubação (Colwell *et al.*, 1975).

## V.2. Nutrientes

O petróleo é composto principalmente de hidrocarbonetos, que podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de microrganismos. Há, entretanto, necessidade de outros nutrientes e, entre eles, o nitrogênio e o fósforo são requeridos em maior quantidade. Há também demanda por micronutrientes, tais como o enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio. A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes e eles podem ser adicionados para estimular a biodegradação. No solo, o ajuste no balanço C/N/P pode ser facilmente efetuado pela adição de fertilizantes. Entretanto, em ambiente aquático, o ajuste desse balanço oferece maiores problemas, pois deve ser efetuado de forma a não ser dissipado da interface óleo-água. Duas estratégias têm sido utilizadas: o encapsulamento do fertilizante numa matriz que permita a flutuação e a liberação lenta ou o uso de componentes oleofílicos que permaneçam na interface (Atlas & Bartha, 1973). Entre os fertilizantes oleofílicos podem ser utilizados uréia parafinada, octilfosfato, octoato férrico, fosfato duplo de amônia e magnésio parafinado, que podem estimular a biodegradação em diferentes ecossistemas aquáticos (Atlas & Bartha, 1973; Dibbie & Bartha, 1976; Horowitz & Atlas, 1977, 1980; Olivieri *et al.*, 1976; Bergstein & Vestal, 1978). A grande maioria dos trabalhos utilizando a adição de N e P relatam o aumento da biodegradação, entretanto, alguns trabalhos não observaram aumento ou observaram aumento muito lento (Lehtomaki & Niemela, 1975; Raymond *et al.*, 1976; Odu, 1978).

## V.3. Oxigênio

O oxigênio é requerido para o processo de biodegradação, pois os passos iniciais no catabolismo dos hidrocarbonetos envolvem a oxidação do substrato por oxigenases (Atlas, 1984). A degradação anaeróbica deve ocorrer a taxas muito pequenas na natureza e há poucos registros desse processo (Bailey *et al.*, 1973; Pierce *et al.*, 1975; Zobell & Prokop,

1966; Gilewicz *et al.*, 1991; Lovley *et al.*, 1993, 1994). Os trabalhos descritos sugerem que sulfato, nitrato e mesmo FeIII podem servir como um aceptor terminal de elétrons. Apesar do papel da biodegradação anaeróbica na natureza não ser conhecido, alguns compostos, como benzoato, aromáticos halogenados, benzeno, tolueno, xileno, naftaleno e acenafteno podem ser degradados na ausência de oxigênio (Boyd & Shelton, 1984; Chen *et al.*, 1988; Grbic-Galic *et al.*, 1987; Mihelcic & Luthy, 1988ab; Suflita *et al.*, 1982; Zeyer *et al.*, 1986; Gilewicz *et al.*, 1991).

#### V.4. Outros Fatores

A temperatura influencia a biodegradação do petróleo pois induz alterações físicas, químicas e biológicas (Atlas, 1981). Em baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, a evaporação é reduzida, aumentando a solubilidade dos hidrocarbonetos de cadeia curta, e o processo de biodegradação é retardado (Atlas, 1984). Em temperaturas mais altas, há aumento no metabolismo de hidrocarbonetos até o máximo, ao redor de 30-40°C, acima do qual há aumento da toxicidade (Bosset & Bartha, 1984). Foram, entretanto, registrados microrganismos, que metabolizam hidrocarbonetos a temperaturas extremas, como por exemplo os termofílicos, que atuam a altas temperaturas (Klug & Markovetz, 1967; Mateles *et al.*, 1967) ou a baixas temperaturas, de 3 e -1°C (Colwell *et al.*, 1978; Huddleston & Cresswell, 1976).

A biodegradação no ambiente terrestre sofre limitações pela existência de água. A atividade de água no solo pode variar de 0 a 0,99, valor que difere consideravelmente do ambiente aquático. A biodegradação no ecossistema terrestre pode ocorrer, portanto, em condições limitantes para o crescimento e metabolismo dos microrganismos. O outro fator a ser considerado no solo é a variação do pH, de 2,5 a 11,0, em diferentes solos (Bosset & Bartha, 1984). A maioria das bactérias e fungos apresenta um melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação com a correção do pH do solo (Verstraete *et al.*, 1976).

## VI. EFEITO DO DERRAME NA COMUNIDADE MICROBIANA

O aumento na capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos que ocorre em algumas populações de microrganismos nativas, em ambientes poluídos com óleo, é chamado de adaptação (Spain *et al.*, 1980). Segundo Leahy & Colwell (1990), há três mecanismos inter-relacionados, que podem contribuir para a adaptação: indução e/ou desrepressão

de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos.

A entrada de hidrocarbonetos em um ecossistema pode resultar num aumento ou decréscimo seletivo do tamanho da população microbiana. O efeito do petróleo no tamanho da população dependerá da composição química do óleo contaminante e das espécies de microrganismos presentes na comunidade de um ecossistema particular.

Em alguns casos, há enriquecimento primário por microrganismos capazes de utilizar os hidrocarbonetos, e secundariamente por microrganismos capazes de utilizar os metabólitos produzidos pelos organismos primários. Esse enriquecimento leva ao aumento dos microrganismos primários e secundários, resultando em um aumento geral no número total de microrganismos presentes no ecossistema, tanto em ambiente marinho como na água doce. O enriquecimento seletivo foi observado em maiores detalhes, em experimentos de laboratório e de campo, por diversos autores e revisto em diferentes períodos (Colwell & Walker, 1977; Floodgate, 1984; Cooney, 1984; Bossert & Bartha, 1984; Leahy & Colwell, 1990). Pode ocorrer um aumento da população de um número restrito de microrganismos ou mesmo de espécies únicas. Foi observado que tanto o tipo de óleo como a temperatura são importantes para se considerar as diferenças de população. Vários gêneros são selecionados em resposta aos vários tipos de óleos e o mesmo tipo de óleo pode favorecer diferentes gêneros em diferentes temperaturas de incubação.

Além do enriquecimento seletivo, sabe-se também que há decréscimo de alguns microrganismos, quando expostos aos componentes do petróleo. Compostos, como o tolueno e o fenol, encontrados no petróleo, têm sido usados como desinfetantes. A ação dos componentes pode ser bacteriostática ou bactericida para os microrganismos, dependendo da solubilidade e da concentração. O tolueno, por exemplo, pode estimular o crescimento de microrganismos em baixa concentração, mas mostra ação bacteriostática em alta concentração (Davis, 1967). O fenol é outro exemplo e pode ser utilizado por alguns microrganismos, mas apresenta atividade bactericida quando em alta concentração. Além do efeito direto dos componentes do petróleo na comunidade microbiana, há também o efeito tóxico dos produtos liberados, durante o processo de degradação. Os produtos da oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos, por exemplo, podem ser mais tóxicos que os compostos originais. Liu (1973), por exemplo, verificou que os alcanos  $C_5$ - $C_9$  não eram tóxicos, entretanto os álcoois correspondentes apresentavam atividade bacteriostática.

Alguns microrganismos apresentam também comportamento neutro em resposta à adição de hidrocarbonetos e nesses casos a população

permanece inalterada. Walker *et al.* (1975) verificaram que certas populações bacterianas aumentaram ou diminuíram, quando expostas ao óleo, mas a população de fungos não foi modificada.

De forma geral, há aumento da capacidade degradativa, quando as amostras são provenientes de ambientes poluídos, ocorrendo em alguns casos a ampliação de substratos (Bauer & Capone, 1988; Kerr & Capone, 1988). Nesses casos, os autores relataram a capacidade de uma população microbiana degradar fenantreno e ampliar seu metabolismo para uso de um composto similar, o naftaleno, devido possivelmente a uma via metabólica comum ou devido à ampla especificidade por hidrocarbonetos poliaromáticos.

O mecanismo genético primário para a adaptação de uma comunidade microbiana é a amplificação por meio de enriquecimento seletivo, mutação e transferência genética dos genes envolvidos no metabolismo dos contaminantes (Spain *et al.*, 1983; Barkay & Pritchard, 1988). Os plasmídeos podem ter um papel importante na adaptação, porquanto eles podem ser transferidos, via transformação, conjugação ou transdução, para outras linhagens receptoras, conferindo a estas uma nova característica. As vias metabólicas para degradação de vários compostos aromáticos do tipo naftaleno, salicilato, cânfora, octano, xileno e tolueno são codificadas por plasmídeos em *Pseudomonas* (Chakrabarty, 1976). Há possibilidade de expandir o potencial catabólico de linhagens, transferindo-se esses plasmídeos metabólicos para linhagens com capacidade limitada de utilização de alguns compostos (Ramos *et al.*, 1995). A exposição de populações de microrganismos aos hidrocarbonetos pode conferir uma vantagem seletiva às linhagens, que possuem plasmídeos contendo genes catabólicos, resultando na amplificação dessas linhagens. A importância desse tipo de plasmídeo tem sido observada pela frequência com que ele se apresenta em isolados provenientes de ambientes contaminados, comparado com aqueles provenientes de regiões não contaminadas. Entretanto, os resultados obtidos por diferentes autores não são conclusivos. Hada & Sizemore (1981) analisaram 440 isolados de *Vibrio spp.*, coletados no Golfo do México e 35% das linhagens provenientes de regiões contaminadas apresentaram plasmídeos, contrastando com 23% no controle. Os isolados das áreas poluídas apresentaram também maior multiplicidade de plasmídeos, em média 2,5, em relação ao controle (1,5). A existência de plasmídeos foi também maior, em cerca de 35% das linhagens isoladas de um manancial de água contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ao passo que as isoladas de um aquífero não contaminado, foi de apenas 8% (Ogunseitan *et al.*, 1987). Resultados similares foram relatados por Kobori *et al.* (1984). En-

tretanto, Fredrickson *et al.* (1988) verificaram que, dentre 163 bactérias analisadas, aquelas provenientes das camadas mais profundas do solo exibiam uma maior incidência de plasmídeos (39%) do que os de superfície (14%) ou de um manancial raso (16%). Foi também verificada a resistência à penicilina em 70% dos isolados, à ampicilina (49%) e à carbenicilina (32%), e essa resistência era mais comum em isolados contendo plasmídeos. A maioria dos isolados analisados era proveniente de uma região não contaminada, no entanto os valores foram próximos daqueles relatados por autores anteriores. A falta de correlação entre frequência de plasmídeos e proximidade de áreas contaminadas foi também relatada por Leahy *et al.* (1990), que detectaram a frequência de plasmídeos associada com a profundidade da coleta da amostra. Todos os trabalhos que detectaram a incidência de plasmídeos em populações microbianas isoladas de regiões contaminadas, não relatam, entretanto, o papel desses plasmídeos na adaptação ou mesmo no metabolismo de hidrocarbonetos e, portanto, permanecem na categoria de plasmídeos crípticos. A única exceção foi apresentada por Fredrickson *et al.* (1988), que utilizaram uma sonda contendo os genes TOL e detectaram homologia em algumas linhagens.

O monitoramento do processo de biodegradação, considerando-se as comunidades que atuam seqüencial ou sinergisticamente, pode ser analisado, usando sondas de DNA, específicas para os diferentes genes, que regulam as vias catabólicas dos hidrocarbonetos (Trevors, 1985). As sondas de DNA, provenientes dos genes TOL (oxidação do tolueno) e NAH (naftaleno) foram utilizadas por Saylor *et al.* (1985) na hibridização de colônias com amostras provenientes de solos contaminados. Foi detectada uma correlação entre o aumento da degradação de compostos aromáticos policíclicos e o aumento no número de colônias, contendo seqüências homólogas às sondas utilizadas. Entretanto, as técnicas de hibridização oferecem algumas dificuldades para análise de amostras numerosas coletadas em campo. Atualmente, o uso da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) pode melhorar a sensibilidade da técnica, além da facilidade de uso com amostras coletadas de sedimentos.

## VII. ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO

### VII. 1. Em Ambiente Aquático

Os derrames de petróleo ou derivados, principalmente os que ocorrem no mar, causam danos consideráveis para o meio ambiente, gran-

do uma preocupação pública enorme, que pressiona para soluções rápidas e econômicas. Quando ocorre o derrame, em geral, as primeiras providências tomadas para atenuar o efeito ambiental, são a coleta física do material por meio de adsorventes e escumadeiras superficiais. Entretanto, a medida não é efetiva em grandes derrames. Outras medidas incluem o uso de dispersantes, a queima do óleo *in situ* ou a aplicação de agentes que catalisam a fotoxidação. Dentre as novas estratégias, a biorremediação emerge como a menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico.

Há diversas patentes geradas e mais de 40 companhias oferecem produtos e serviços de biorremediação (Prince, 1993). O princípio de todos os processos é propiciar um aumento na biodegradação, por diferentes mecanismos. O mais simples mencionado é o estímulo pela adição de nitrogênio e fósforo. Outros consideram o aumento da superfície do óleo, que se torna mais facilmente exposto ao ataque microbiano ou à combinação de microrganismos ou nutrientes num dispersante, para estimular a degradação. Métodos mais sofisticados adicionam microrganismos exógenos com capacidade degradativa conhecida, isolados naturalmente ou manipulados geneticamente.

Alguns grupos têm estudado a biorremediação em experimentos de campo onde o óleo foi colocado em pequenas áreas. A aplicação de fertilizantes tem-se mostrado bastante eficiente aumentando de 5-10 vezes a taxa de degradação do petróleo. Em experimentos efetuados na Nova Scotia (Prince, 1993) verificou-se que os fertilizantes oleofílicos e de liberação lenta estimularam a degradação do óleo cru. A degradação foi medida pela taxa de decréscimo de n-heptadecano/pristano e n-octadecano/fitano. Alguns oleofílicos tipo Inipol EAP22, utilizados nos testes em Spitzbergen, apresentaram pouca eficiência para estimular a degradação na interfase óleo-água, entretanto mostraram uma eficiência melhorada em areia grossa.

O uso de compostos contendo microrganismos na sua composição parece ter um efeito duvidoso no estímulo à biodegradação (Prince, 1993). Isso deve ocorrer, devido ao enriquecimento natural da população microbiana, que atua competitivamente para não permitir o estabelecimento de uma população exógena. Em Prince William Sound esse efeito foi notório, a ponto de ter sido observado um melhor efeito, após a esterilização do produto, sugerindo que os produtos poderiam estar contribuindo com elementos-traço. As tentativas para isolamento dos microrganismos nativos, enriquecimento *in vitro* para posterior inoculação também não produziram efeitos animadores e não foram melhores do que a adição apenas de nutrientes inorgânicos.

O não efeito da inoculação em processo de biorremediação em ambiente marinho foi também observado no solo (Vecchioli *et al.*, 1990).

O uso da biorremediação em derrames reais é mais recente. Ele é efetuado em regiões costeiras, porquanto o controle no amplo ambiente marinho é extremamente difícil de ser avaliado. Prince (1993) descreve alguns casos, entre os quais o ocorrido em Spitzbergen, na região Ártica, em 1985, quando Inipol EAP22 foi aplicado num derrame de 88.000 l. Houve uma redução de 90% da contaminação dos sedimentos após um ano, contrastando com 15% em regiões não tratadas. Mas o caso mais documentado foi sem dúvida, o derrame ocorrido em Prince William Sound, no Alaska, em março de 1989, onde ocorreu um derrame de aproximadamente 11 milhões de galões. Uma série de cinco artigos, publicados de janeiro a maio de 1991, descreve todas as etapas efetuadas por diferentes pesquisadores, empresas e instituições incumbidas de promover a limpeza da região (Kelso & Kensziorek, 1991; Maki, 1991; Westermeyer, 1991; Galt *et al.*, 1991; Pritchard & Costa, 1991). Após o derrame, durante as oito semanas seguintes, o óleo se espalhou no Golfo do Alaska e ao longo de 1.750 km da costa, estendendo-se até 750 km do sítio inicial do derrame (Wolfe *et al.*, 1994). O derrame forneceu uma oportunidade ímpar para testar a eficiência da biorremediação. Após alguns testes preliminares, foram escolhidas duas praias, a de Snug Harbor e Passage Cove, para os testes de campo. As duas áreas apresentavam pedregulhos grandes com cobertura de óleo e areia misturada com óleo e cascalho sob pedregulhos em diferentes profundidades. Foram testados três tipos de fertilizantes considerando-se as estratégias de aplicação, problemas logísticos para aplicação em grande escala, disponibilidade no mercado e a capacidade de liberar nitrogênio e fósforo na superfície e subsuperfície por períodos prolongados. Os fertilizantes escolhidos foram: um de liberação lenta, um oleofílico e um fertilizante solúvel aplicado como uma solução. Os fertilizantes de liberação lenta utilizados eram formulações na forma de briquetes e granular (2-3 mm diâmetro). Ambos os produtos apresentam uma liberação inicial rápida de nutrientes, após o que o nitrogênio e fósforo remanescentes são liberados lentamente durante 3-4 semanas. Foi escolhido o agente oleofílico Inipol EAP22, que podia ser produzido rapidamente em larga escala e apresentava as características desejáveis para as condições ambientais da região. Esse produto é uma microemulsão estável, consistindo de uma matriz de uréia coberta por um carreador de ácido oléico. Laurilfostato, um surfactante e fonte de fósforo, é incorporado como um estabilizador, e metilcelulose adicionado como um redutor de viscosidade. A aplicação foi efetuada em áreas superficiais primárias, onde nada havia sido efetuado após o derrame, e em áreas secundárias, onde havia sido



efetuada uma limpeza física. A primeira aplicação do fertilizante ocorreu em julho do mesmo ano e aproximadamente 2-3 semanas mais tarde, os pedregulhos da praia estavam visivelmente mais limpos. Havia, entretanto, quantidades significativas de óleo sob os pedregulhos e na sub-superfície, que desapareceram após algumas semanas. Esses resultados contrastaram com as regiões de controle não tratadas ou tratadas com os briquetes, onde não foram observadas mudanças visuais. As medidas da taxa de biodegradação, efetuadas pela proporção de alcanos C18/fitano, apresentaram um declínio de 70%, após quatro semanas. Houve uma variação considerável na biodegradação, em função da distribuição altamente heterogênea do óleo na praia. A observação contínua mostrou que após algum tempo, todas as áreas, tratadas e não tratadas, se apresentavam mais limpas. O uso do fertilizante tinha acelerado o processo de limpeza por aproximadamente dois meses. Não foi observado um aumento significativo das populações microbianas com o resultado da adição de fertilizantes. Assim que o tratamento geral em Prince William Sound havia sido iniciado, os testes de biorremediação foram implantados em um segundo sítio, em Passage Cove. Foram aplicados fertilizantes inorgânicos solúveis ou Inipol EAP22 + fertilizante de lenta liberação. Ocorreu uma clara limpeza da região fertilizada, comparada com a região sem tratamento, e foi possível mostrar diferenças significativas entre elas. Em julho de 1990, o programa de monitoramento instalado para avaliar o efeito da biorremediação, mostrou que a adição de fertilizantes tinha estimulado as atividades de degradação em 3-4 vezes. Isso levou à reaplicação do fertilizante em áreas onde havia ainda grandes quantidades de óleo. Com a chegada do verão, a colonização bacteriana cresceu, propiciando ainda uma taxa de degradação maior.

Após a Guerra do Golfo em 1991, áreas poluídas na Arábia Saudita foram cobertas por um tapete verde resultante da associação de microrganismos fotossintéticos e outros não fotossintéticos. A associação dessas algas fixadoras de nitrogênio com bactérias heterotróficas sugere que o ecossistema é limitado pelo nitrogênio e que os microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos são limitados às áreas onde o nitrogênio pode ser liberado pelos fixadores de nitrogênio. Sabe-se que algumas bactérias que degradam hidrocarbonetos são também fixadores de N (Laguerre *et al.*, 1987; Roy *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1993; Tocalino *et al.*, 1993).

Em 1990, ocorreu também um derrame de cerca de 4 milhões de galões de petróleo no Golfo do México, Texas, após o incêndio do supertanque Mega Borg. Linhagens microbianas, desenvolvidas por C. Oppenheimer e capazes de utilizar uma ampla variedade de hidrocarbonetos, foram utilizadas para a descontaminação em mar aberto. Há indícios de ocorrência

de biodegradação, entretanto, há dificuldades na coleta de dados e na certificação de que os microrganismos inoculados e não os nativos seriam os responsáveis pelo processo (Holden, 1990).

## VII. 2. Em Ambientes Terrestres

As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados indesejáveis, que poluem o ambiente e são os principais poluidores do solo e mananciais de água. As fontes desses produtos são provenientes principalmente do fundo dos tanques-reservatórios e das unidades de tratamento. Os tanques de armazenamento contribuem significativamente para provocar a poluição. Nos Estados Unidos, por exemplo, há 2 milhões de tanques subterrâneos para armazenamento de gasolina e 90.000 deles oferecem riscos (Toccalino, 1993). A composição dos dejetos varia de acordo com a origem, armazenamento e o histórico do tratamento. Entre os métodos utilizados para eliminação desses compostos, o *landfarming* é o escolhido por várias refinarias. Esse processo consiste na dispersão dos resíduos no solo e ocorrência de biodegradação por microrganismos nativos.

A biodegradação do óleo no solo foi descrita por diversos autores. Entretanto muitos desses trabalhos, apesar de constatarem a degradação de diferentes tipos de óleos, não consideraram os microrganismos ativos e nem os produtos remanescentes da biodegradação. Raymond *et al.* (1976) efetuaram uma análise mais detalhada, adicionando produtos selecionados em solos de diferentes regiões geográficas dos Estados Unidos. A análise, empregando seis diferentes tipos de óleo (óleo de carro e caminhão, óleo da Arábia, óleo Coastal Mix, óleo de aquecimento e um óleo residual 6) foi aplicada uma única vez em 14 localidades geográficas. Os produtos foram misturados com o solo e analisados durante um ano. Cada região que recebeu a aplicação de óleo, foi subdividida em duas sub-áreas, sendo que metade de cada área recebeu fertilizante. A concentração do óleo decresceu em todas as áreas, com uma redução de 48,5 a 90%, dependendo do tipo de óleo e da localização geográfica. O máximo de degradação observada foi de  $2,4 \text{ m}^3 \times 10^3$  por mês. As mudanças na composição do óleo, medidas por fracionamento em sílica gel, cromatografia gasosa e absorbância em luz ultravioleta, ocorreram com todos os componentes, mas mais lentamente para os compostos mais polares. Foi observado um aumento significativo de microrganismos capazes de degradar n-hexadecano ou o óleo aplicado, mas não foi observado aumento significativo na população de fungos. Os produtos de degradação exibiram, após 9 meses, efeito inibitório no crescimento de plantas na região. Posteriormente Dibble & Bartha (1979) efetuaram experimentos de laboratório

para avaliar e otimizar os parâmetros ambientais do processo de *landfarming*. A biodegradação foi monitorada pela evolução de CO<sub>2</sub> e análise periódica dos hidrocarbonetos residuais. A biodegradação ocorreu com maior eficiência na faixa de umidade de 30-90%, pH de 7,5 a 7,8, temperatura superior a 20°C, taxa C:N de 60:1, taxa C:P de 800:1 e a adição de micronutrientes e suplementos orgânicos não foi benéfica. A quebra dos hidrocarbonetos saturados (alcanos e cicloalcanos) foi mais alta com aplicações mais baixas, mas taxas mais altas favoreceram a biodegradação das frações aromáticas e asfáltica. Uma taxa de aplicação de 5% de hidrocarbonetos ao solo forneceu os melhores resultados de biodegradação para todas as classes de compostos.

Apesar da adição de fertilizantes ser benéfica ao estimular o processo de biodegradação, alguns casos, como os citados, por exemplo, não oferecem evidências claras de sua eficiência. A demanda de N para o desenvolvimento da população de microrganismos é bastante alta e tem sido sugerido que o *landfarming* propicia seletivamente o desenvolvimento de microrganismos fixadores de N, não simbióticos. Vários pesquisadores relatam o isolamento de bactérias heterotróficas, capazes de fixar N atmosférico, isoladas de amostras de solo poluídas (Coty, 1967; Laguerre *et al.*, 1987). Entretanto, a ocorrência e a atividade dos microrganismos fixadores de nitrogênio não parecem ser efetivas em todos os tipos de compostos. Toccalino *et al.* (1993) por exemplo, verificaram por experimentos de laboratório, que a degradação de propano e butano, os principais componentes da fase gasosa de um derrame de gasolina, pode ser estimulada inicialmente por adição de N, durante um período médio de três meses. Entretanto, após esse período, a degradação dos dois compostos apresenta diferenças e a de propano torna-se mais lenta, limitada pela insuficiência de N. Com butano, essa limitação pode ser superada pela fixação de N, efetuada por bactérias que crescem em solo contendo butano mas não propano. Essa sugestão foi confirmada pela medida de N total existente no solo com butano e pela redução de acetileno. A presença de um excesso de N foi também mostrada pela falta de resposta ao N exógeno e pelo estímulo provocado na degradação do propano, quando se misturou solo de degradação de butano.

Além das refinarias de petróleo, a indústria petroquímica também gera diversos dejetos poluentes. Dave *et al.* (1994), por exemplo, detectaram cerca de 240 compostos de hidrocarbonetos, dos quais 54% são C<sub>5</sub>-C<sub>11</sub> e 46% de C<sub>12</sub> a C<sub>25</sub>. O fracionamento em sílica gel apresentou 62% de compostos saturados, 17% de aromáticos e 21% de compostos polares. Foram isoladas 22 culturas bacterianas capazes de degradar o composto, sendo que 7 delas foram eficientes para uma degradação de 30-40% em 15 dias, usando-se meio de cultura líquido. A adição de glicose e extrato

de leveduras aumentou a biodegradação até 70%. Usando-se essas bactérias no solo, houve um aumento da degradação durante 30 dias de 40% para 70%. O solo contaminado com o complexo de hidrocarbonetos, mas esterilizado, apresentou fitotoxicidade para plântulas de trigo, tanto na germinação quanto no crescimento. Em solo não estéril o composto apresentou um efeito menor na germinação, mas com a inoculação das bactérias houve um decréscimo substancial na toxicidade, permitindo um aumento na germinação de 55% para 80% das sementes e aumento da concentração de clorofila. A biodegradação no solo também aumentou para 80% e esse aumento foi atribuído ao efeito estimulatório da rizosfera (Walton & Anderson, 1992). O uso de plantas para estimular a biodegradação foi também relatada recentemente por Radwan *et al.* (1995). Na região desértica do Kuwait, após a Guerra do Golfo, ocorrida em 1991, houve uma poluição de cerca de 50 km<sup>2</sup>. Apesar de alguma evidência de despoluição natural por atividade de microrganismos nativos, ainda permanecem áreas bastante contaminadas, que não suportam nenhuma atividade agrícola. Entretanto, em áreas pouco ou moderadamente contaminadas, foi possível a observação de plantas que se desenvolveram e cujas raízes estavam associadas a milhões de microrganismos capazes de degradar petróleo. Esses microrganismos absorvem e metabolizam vários hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos rapidamente, detoxificando e biorremediando o solo ao redor das raízes. Os autores sugerem que as plantas “resistentes” ao óleo, poderiam ser utilizadas em processos de biorremediação, cultivando-as em regiões poluídas. As áreas muito poluídas poderiam ser misturadas com areia pura para diluir o óleo aos níveis tolerados pelas plantas.

## VIII. FITORREMEDIAÇÃO

Existem evidências convincentes de que as raízes das plantas, juntamente com a comunidade microbiana, oferecem um estratégia importante para a remediação de solos contaminados. Sob diferentes condições ambientais a vegetação tem mostrado capacidade de aumentar a biodegradação de solos contaminados. A fitorremediação, ou o uso de plantas para o tratamento *in situ* de solos contaminados é uma tecnologia emergente com potencial para uma limpeza efetiva e barata, permitindo a mineralização completa na rizosfera (Anderson *et al.*, 1993; Schnoor *et al.*, 1995). A rizosfera tem sido analisada nas pesquisas agrícolas, devido à sua importância para a produtividade. É uma zona de alta atividade microbiana na interface raiz-solo, que está sob influência da raiz. O aumento no crescimento microbiano e atividade na rizosfera pode ser o responsável pelo

aumento da taxa de degradação metabólica de compostos xenobióticos na rizosfera. A composição da população de microrganismos é dependente do tipo da raiz, espécie e idade da planta e tipo de solo, bem como de outros fatores, como a exposição das raízes aos diferentes tipos de compostos. As mudanças contínuas na interface raiz-solo produzem alterações constantes na estrutura do solo e na população microbiana.

Devido ao pequeno desenvolvimento dos estudos da fitorremediação, esta ainda não é uma tecnologia amplamente aceita pelas agências que regulam o controle ambiental. Basicamente as plantas atuam por três mecanismos: absorção direta de contaminantes e subsequente acumulação de metabólitos não fitotóxicos nos tecidos da planta; liberação de exsudatos e enzimas que estimulam a atividade microbiana e as transformações bioquímicas e aumento da mineralização na rizosfera. Os três mecanismos possíveis, bem como algumas aplicações da fitorremediação em áreas contaminadas com compostos químicos, foram revistos recentemente (Schnoor *et al.*, 1995). Alguns tipos de plantas, tais como trigo, cana-de-açúcar, trevo, arroz, milho, ervilha, algodão, soja, tabaco, linho, etc. têm sido analisados para a fitorremediação (Anderson *et al.*, 1993).

O uso da fitorremediação para limpeza de áreas contaminadas com petróleo ou hidrocarbonetos mais complexos é mais recente. Alguns pesquisadores observaram aumento de degradação de óleo na rizosfera durante o estudo do crescimento de arroz em solos onde havia ocorrido aplicação de resíduos de óleo. Os autores creditaram o aumento no crescimento à remoção do óleo da rizosfera por microrganismos específicos, identificados como *Bacillus* sp., que cresceram no óleo somente na presença de exsudatos das raízes de arroz (in Anderson *et al.*, 1993).

Recentemente foi descrita a identificação de bactérias e fungos capazes de degradar hidrocarbonetos e que foram isolados da rizosfera de algumas plantas (Radwan *et al.*, 1995). As plantas, pertencentes à família Compositae, eram capazes de crescer em uma areia negra e poluída por óleo, mas possuíam as raízes brancas e limpas. Mesmo a areia ao redor das raízes não apresentava indícios de poluição, contrastando com a areia mais distante que mantinha as características da poluição. A areia poluída foi utilizada para cultivar outras espécies vegetais, como milho, tomate e termis. Todas as três espécies de plantas germinaram normalmente, apresentando, entretanto, altura inferior ao esperado, após quatro semanas. A amostra da rizosfera de todas as plantas apresentou cerca de  $10^8$  bactérias e  $10^5$  propágulos por g de peso fresco de raiz. *Arthrobacter* estava presente numa frequência de 95% na rizosfera. Outros gêneros como *Rhodococcus*, *Pseudomonas* e *Bacillus* eram predominantes, com *Arthrobacter* perfazendo no máximo 5%. Os fungos predominantes na

rizosfera foram *Penicillium* e *Fusarium*, enquanto, no solo não rizosférico, predominou *Trichoderma*. Leveduras foram detectadas em baixos níveis na microflora da rizosfera.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, T.A.; GUTHRIE, E.A.; WALTON, B.T. Bioremediation. **Environmental Science & Technology**, v.27, p.2630-2636, 1993.
- ABBOT, B.J.; GLEDHILL, W.G. The extracellular accumulation of metabolic products by hydrocarbon-degrading microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.14, p.249-288, 1971.
- AHEARN, D.G.; MEYERS, S.P.; STANDARD, P.G. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. **Developments in Industrial Microbiology**, v.12, p.126-134, 1971.
- AISLABIE, J.; ROTHENBURGER, S.; ATLAS, R.M. Isolation of microorganisms capable of degrading isoquinoline under aerobic conditions. **Applied & Environmental Microbiology**, v.55, p.3247-3249, 1989.
- AISLABIE, J.; BEJ, A.K.; HURST, H.; ROTHENBURGER, S.; ATLAS, R.M. Microbial degradation of quinoline and methylquinolines. **Applied & Environmental Microbiology**, v.56, p.345-351, 1990.
- ATLAS, R.M. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. **Applied Microbiology**, v.39, p.396-403, 1975.
- ATLAS, R.M. Stimulated petroleum biodegradation. **Critical Review in Microbiology**, v.5, p.371-386, 1977.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v.45, p.180-209, 1981.
- ATLAS, R.M. ed. **Petroleum Microbiology**. New York: Macmillan, 1984.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Abundance, distribution, an oil biodegradation of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. **Biotechnology & Bioengineering**, v.14, p.309-317, 1972.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. **Canadian Journal of Microbiology**, v.18, p.1851-1855, 1972.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. **Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology & Serology**, v.39, p.257-271, 1973.
- AUSTIN, B.; CALOMIRIS, J.J.; WALKER, J.D.; COLWELL, R.R. Numerical taxonomy and ecology of petroleum degrading bacteria. **Applied & Environmental Microbiology**, v.34, p.60-68, 1977.
- BARKAY, T.; PRITCHARD, H. Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. **Microbiology Science**, v.5, p.165-160, 1988.
- BARTHA, R.; ATLAS, R.M. The microbiology of aquatic oil spills. **Advances in Applied Microbiology**, v.22, p.225-266, 1977.
- BAUER, J.E.; CAPONE, D.G. Effect of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. **Applied & Environmental Microbiology**, v.54, p.1649-1655, 1988.
- BAYLEY, N.J.L.; JOBSON, A.M.; ROGERS, M.A. Bacterial degradation of crude oil: comparison of field and experimental data. **Chemical Geology**, v.11, p.203-221, 1973.
- BEAM, H.W.; PERRY, J.J. Co-metabolism as a factor in microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons. **Archives of Microbiology**, v.91, p.87-90, 1973.
- BEAM, H.W.; PERRY, J.J. Microbial degradation and assimilation of n-alkyl substituted cycloparaffins. **Journal of Bacteriology**, v.118, p.394-399, 1974a.
- BEAM, H.W.; PERRY, J.J. Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-metabolism and commensalism. **Journal of General Microbiology**, v.82, p.163-169, 1974b.
- BERGSTEIN, P.E.; VESTAL, J.R. Crude oil biodegradation in Arctic tundra ponds. **Arctic**, v.31, p.158-169, 1978.

- BERTRAND, J.C.; ALMALLAH, M.; ACQUAVIVA, M.; MILLE, G. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. **Letters in Applied Microbiology**. v.11, p.260-263, 1990.
- BERTRAND, J.C.; RAMBELOARISOA, J.F.; RONTANI, G.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. **Biotechnology Letters**, v.5, p.567-572, 1983.
- BLASIG, R.; HUTH, J.; FRANKE, P.; BORNELEIT, P.; SCHUNCK, W.H.; MULLER, H.G. Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Candida maltosa*. III. effect of solid n-alkanes on cellular fatty acid composition. **Applied Microbiology & Biotechnology**. v.31, p.571-576, 1989.
- BOSSERT, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: ATLAS, R.M., ed. **Petroleum Microbiology**. New York: Macmillan, New York, 1984. p.434.
- BOYD, S.A.; SHELTON, D.R. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. **Applied & Environmental Microbiology**. v.47, p.272-277, 1984.
- BURY, S.J.; MILLER, C.A. Effect of micellar solubilization of biodegradation rates of hydrocarbons. **Environmental Science of Technology**. v.27, p.104, 1993.
- CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. **Applied & Environmental Microbiology**. v.34, p.363-370, 1977.
- CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T. Metabolism of naphthalene by cell extracts of *Cunninghamella elegans*. **Archives of Biochemistry & Biophysics**. v.186, p.121-127, 1978.
- CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6. **Biochemical & Biophysical Research Communication**. v.88, p.50-58, 1979.
- CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T.; VAN BAALEN, C. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. **Journal of General Microbiology**. v.116, p.495-500, 1980.
- CERNIGLIA, C.E.; HEBERT, R.L.; SZANISZLO, P.J.; GIBSON, D.T. Fungal transformation of naphthalene. **Archives of Microbiology**. v.117, p.135-143, 1978.
- CERNIGLIA, C.E.; PERRY, J.J. Crude oil degradation by microorganisms isolated from the marine environment. **Zeitung für Allgemeine**. v.13, p.299-306, 1973.
- CERNIGLIA, C.E.; VAN BAALEN, C.; GIBSON, D.T. Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM. **Journal of General Microbiology**. v.116, p.485-494, 1980.
- CHAKRABARTY, A.M. Plasmids in *Pseudomonas*. **Annual Review of Genetics**, v.10, p.7-30, 1976.
- CHEN, M.; HONG, C.S.; BUSCH, B.; RHEE, G.Y. Anaerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls by bacteria from Hudson river sediments. **Ecotoxicology & Environmental Safety**, v.16, p.95-105, 1988.
- CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSERT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, London, v.351, p.640-642, 1991.
- COLWELL, R.R.; WALKER, J.D. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. **Critical Reviews in Microbiology**. v.5, p.423-445, 1977.
- COLWELL, R.R.; MILLS, A.L.; WALKER, J.D.; GARCIA-TELLO, P.; CAMPOS, P.V. Microbial ecology of the Metula spill in the Straits of Magellan. **Journal of Fishing Research Board Canadian**, v.35, p.573-580, 1978.
- COONEY, J.J. The fate of petroleum pollutants in fresh-water ecosystems. In: ATLAS, R.M., ed. **Petroleum Microbiology**. New York: Macmillan, 1984. p.399-434.
- COTY, Y.F. Atmospheric nitrogen fixation by hydrocarbon-oxidizing bacteria. **Journal of Bacteriology**. v.88, p.468-472, 1967.
- DAVE, H.; RAMAKRISHNBA, C.; BHATT, B.D.; DESAI, J.D. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, p.653-656, 1994.
- DAVIS, J.B.; COTY, Y.F.; STANLEY, J.P. Atmospheric nitrogen fixation by methane-oxidizing bacteria. **Biotechnology & Bioengineering**. v.9, p.25-32, 1964.
- DEAN-RAYMOND, D.; BARTHA, R. Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum components by marine bacteria. **Developments in Industrial Microbiology**. v.16, p.97-110, 1975.

- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. The effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. **Applied & Environmental Microbiology**, v.37, p.729-739, 1976.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied & Environmental Microbiology**, v.31, p.544-550, 1979.
- DUMENIL, G.; MATTEI, G.; SERGENT, M.; BERTRAND, J.C.; LAGET, M.; PHAN-TAN-LUU, R. Application of a Doehlert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.27, p.405-409, 1988.
- EFROYMSON, R.A.; ALEXANDER, M. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. **Applied & Environmental Microbiology**, v.57, p.1441-1447, 1991.
- FALL, R.R.; BROWN, J.L.; SHAEFFER, T.L. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. **Applied & Environmental Microbiology**, v.38, p.715-722, 1979.
- FEDORAK, P.M.; GRBIC-GALIC, D. Aerobic microbial cometabolism of benzothiophene and 3-methyl-benzothiophene. **Applied & Environmental Microbiology**, v.57, p.932-940, 1991.
- FERRIS, J.P.; MACDONALD, L.H.; PATRIE, M.A.; MARTIN, M.A. Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the fungus *Cunninghamella bainieri*. Evidence of the presence of cytochrome P450. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, v.175, p.443-452, 1976.
- FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: ATLAS, R.M. ed. **Petroleum Microbiology**. New York: Macmillan, New York, 1984. p.355-398.
- FOGHT, J.M.; WESTLAKE, D.W.W. Effect of dispersant Corexit 9527 on the microbial degradation of Prudhoe Bay oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.117-122, 1982.
- FREDRICKSON, J.K.; HICKS, R.J.; LI, S.W.; BROCKMAN, F.J. Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. **Applied & Environmental Microbiology**, v.54, p.2916-2923, 1988.
- GALT, J.A.; LEHR, W.J.; PAYTON, D.L. Fate and transport of the Exxon Valdez oil spill. **Environmental Science & Technology**, v.25, p.202-209, 1991.
- GIBSON, D.T. Microbial degradation of aromatic compounds. **Science**, v.161, p.1093-1097, 1968.
- GIBSON, D.T. The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Microbiology**, v.1, p.199-223, 1971.
- GIBSON, D.T. Oxidation of carcinogens benzo(a)pyrene and benzo(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. **Science**, v.189, p.295-297, 1975.
- GILEWICZ, M.; MONPERT, G.; ACQUAVIVA, M.; MILLE, G.; BERTRAND, J.-C. Anaerobic oxidation of 1-n-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.36, p.252-256, 1991.
- GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T.M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. **Applied & Environmental Microbiology**, v.53, p.254-260, 1987.
- GUIRE, P.E.; FRIEDE, J.D.; GHOLSON, R.K. Production and characterization of emulsifying factors from hydrocarbonoclastic yeast and bacteria. In: AHEARN, D.F.; MEYERS, S.P. ed. **The microbial degradation of oil pollutants**. Baton Rouge: Louisiana State University, Center for Wetland Resources, 1976. p.229-231. (Publication LSU-SG-73-01).
- GUTNICK, D.L.; ROSENBERG, E. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. **Annual Review of Microbiology**, v.31, p.379-396, 1977.
- HADA, H.S.; SIZEMORE, R.K. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the northwestern Gulf of Mexico. **Applied & Environmental Microbiology**, v.41, p.199-202, 1981.
- HAINES, J.R.; ALEXANDER, M. Microbial degradation of high-molecular weight alkanes. **Applied Microbiology**, v.28, p.1084-1085, 1974.
- HOLDEN, C. Gulf lick a free lunch for bacteria. **Science**, v.249, p.120, 1990.
- HOROWITZ, A.; ATLAS, R.M. Continuous open flow-through system as a model for oil degradation in the Arctic Ocean. **Applied & Environmental Microbiology**, v.33, p.647-653, 1977.



- HOROWITZ, A.; ATLAS, R.M. Microbial seeding to enhance petroleum hydrocarbon biodegradation in aquatic Arctic ecosystems. In: OXLEY, T.A.; BECKER, G.; ALLSOPP, D. ed. **Proceedings of the 4th International Biodeterioration Symposium** London: Pitman, 1980. p.15-20
- IQBAL, S.; KHALLID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.
- JONES, J.G.; EDDINGTON, M.A. An ecological survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v.52, p.381-390, 1968.
- KANEKO, T.; KRICHEVSKY, M.L.; ATLAS, R.M. Numerical taxonomy of bacteria from the Beaufort Sea. **Journal of General Microbiology**, v.110, p.111-125, 1979.
- KARL, D.M. The grounding of the Bahia Paraiso: microbial ecology of the 1989 oil spill. **Microbial Ecology**, v.24, p.123, 1990.
- KASKA, D.D.; POLNE-FULLER, M.; GIBOR, A. Biotransformation of alkanes and haloalkanes by a marine amoeba. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 34, p.814-817, 1991.
- KELSO, D.D.; KENDZIOREK, M. Alaska's response to the Exxon Valdez oil spill. **Environmental Science & Technology**, v.25, p.16-29, 1991.
- KERR, R.P.; CAPONE, D.G. The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. **Marine Environmental Research**, v.26, p.181-198, 1988.
- KING, D.H.; PERRY, J.J. The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism, *Mycobacterium vaccae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, p.85-89, 1975.
- KIRK, P.W.; GORDON, A.S. Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. **Mycologia**, v.80, p.776-782, 1988.
- KLUG, M.J.; MARKOVETZ, A.J. Thermophilic bacteria isolated on n-tetradecane. **Nature**, London, v.215, p.1082-1083, 1967.
- KOBORI, H.; SULLIVAN, C.W.; SHIZUYA, H. Bacterial plasmids in Antarctic natural microbial assemblages. **Applied & Environmental Microbiology**, v.48, p.515-518, 1984.
- KOCH, A.S.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.4212, 1991.
- KOMAGATA, K.T.; NAKASE, T.; KATSUYA, N. Assimilation of hydrocarbons by yeasts. I. Preliminary screening. **Journal of General Microbiology**, v.10, p.313-321, 1964.
- LAGUERRE, G.; BOSSAND, B.; BARDIN, R. Free living dinitrogen-fixing bacteria isolated from petroleum refinery oily sludge. **Applied & Environmental Microbiology**, v.53, p.1674-1678, 1987.
- LANDRUM, P.F.; EADIE, B.J.; FAUST, W.R. Variation in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Diporeia* (spp) with sediment aging. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v.11, p.1197, 1992.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v.54, p.305-315, 1990.
- LEHTOMAKI, M.; NIEMELA, S. Improving microbial degradation of oil in soil. **Ambio**, v.4, p.126-129, 1975.
- LIU, D.; MAGUIRE, R.J.; PACEPAVICIUS, G.L.; NAGY, E. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics. **Environmental Toxicology & Water Quality**, v.7, p.355, 1992.
- LOVLEY, D.R.; GIOVANNONI, S.J.; WHITE, D.C.; CHAMPINE, J.E.; PHILLIPS, E. J.P.; GORBY, Y.A.; GOODWIN, S. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. **Archives of Microbiology**, v.159, p.336-344, 1993.
- LOVLEY, D.R.; WOODWARD, J.C.; CHAPELLE, F.H. Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. **Nature**, London, v.370, p.128-131, 1994.
- MacGILLIVRAY, A.R.; SHIARIS, M.P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. **Applied & Environmental Microbiology**, v.59, p.1613-1618, 1993.

- MAKI, A.W. The Exxon Valdez oil spill: Initial environmental impact assessment. **Environmental Science & Technology**, v.25, p.24-29, 1991.
- MARKOVETZ, A.J. Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganism. **Critical Reviews in Microbiology**, v.1, p.225-237, 1971.
- MATELES, R.I.; BARUAH, J.N.; TANNENBAUM, S.R. Growth of a thermophilic bacteria on hydrocarbons: a new source of single-cell protein. **Science**, v.157, p.1322-1323, 1967.
- McKENNA, E.J.; KALLIO, R.E. Hydrocarbon structure: its effect on bacterial utilization of alkanes. In HEUKEKIAN, H.; DONDERO, N.C. ed **Principles and application in aquatic microbiology**. New York: John Wiley, 1964. p.1-14
- McKENNA, E.J.; KALLIO, R.E. The biology of hydrocarbons. **Annual Review of Microbiology**, v.19, p.183-208, 1965.
- McKENNA, E.J.; KALLIO, R.E. Microbial metabolism of the isoprenoid alkane, pristane. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.68, p.1552-1554, 1971.
- MIHELICIC, J.R.; LUTHY, R.C. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. **Applied & Environmental Microbiology**, v.54, p.1188-1198, 1988.
- MIHELICIC, J.R.; LUTHY, R.C. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons under various redox conditions in oil-water systems. **Applied & Environmental Microbiology**, v.54, p.1182-1187, 1988.
- MILLER, T.L.; JOHNSON, M.J. Utilization of normal alkanes by yeasts. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 8, p.549-565, 1966.
- NAGATA, S.; KONDO, G. Photo-oxidation of crude oils. In: INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE. 1977, Washington. **Proceedings**. Washington: American Petroleum Institute, 1977. p.617.
- ODU, C.T.I. The effect of nutrient application and aeration on oil degradation in soil. **Environmental Pollution**, v.15, p.235-240, 1978.
- OGUNSEITAN, O.A.; TEDFORD, E.T.; PACIA, D.; SIROTKIN, K.M.; SAYLER, G.S. Distribution of plasmids in ground-water bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v.1, p.311-317, 1987.
- OLIVIERI, R.; BACCHIN, P.; ROBERTIELLO, A.; ODDO, N.; DEGEN, L.; TONOLO, A. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. **Applied & Environmental Microbiology**, v.31, p.629-634, 1976.
- OOYAMA, J.; FOSTER, J.W. Bacterial oxidation of cycloparaffini hydrocarbons. **Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology & Serology**, v.31, p.45-65, 1965.
- LOUDOT, J.; FUSEY, P.; ABDELOUAHID, D.E.; HALOUI, S.; ROQUEBERT, M.F. Capacités dégradatives des bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.232-243, 1987.
- PERRY, J.J. Microbial metabolism of cyclic hydrocarbons and related compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v.5, p.387-412, 1977.
- PERRY, J.J. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.43, p.59-72, 1979.
- PIERCE, R.H.; CUNDELL, A.M.; TRAXLER, R.W. Persistence and biodegradation of spilled residual fuel oil on an estuarine beach. **Applied Microbiology**, v. 29, p.646-652, 1975.
- PIRNICK, M.P. Microbial oxidation of methyl branched alkanes. **Critical Reviews in Microbiology**, v.5, p.413-422, 1977.
- PIRNICK, M.P.; ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. **Journal of Bacteriology**, v.119, p.866-878, 1974.
- POLNE-FULLER, M. A multinucleate marine amoeba which digests seaweeds. **Journal of Protozoology**, v.34, p.159-165, 1987.
- PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v.19, p.217-242, 1993.
- PRITCHARD, P.H.; COSTA, C.F. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. **Environmental Science & Technology**, v.25, p.372-379, 1991.

- RADWAN, S.S.; SORKHOH, N.A. Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their application potential. **Advances in Applied Microbiology**, v.39, p.29-90, 1993.
- RADWAN, S.; SORKHOH, N.; EL-NEMR, I. Oil biodegradation around roots. **Nature**, v.376, p.302, 1995.
- RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; HUERTAS, M.J.; HAIDOUR, A. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentration of aromatic hydrocarbons. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.3911-3916, 1995.
- RAYMOND, R.L.; HUDSON, J.O.; JAMISON, V.W. Oil degradation in soil. **Applied & Environmental Microbiology**, v.31, p.522-535, 1976.
- REISFELD, A.E.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Microbial degradation of oil: factors affecting oil dispersion in seawater by mixed and pure cultures. **Applied Microbiology**, v.24, p.363-368, 1972.
- ROGERSON, A.; BERGER, J. Effect of crude oil and petroleum-degrading microorganism on the growth of fresh-water and soil protozoa. **Journal of General Microbiology**, v.124, p.53-59, 1981.
- ROGERSON, A.; BERGER, J. Enhancement of the microbial degradation of crude oil by the ciliate *Colpidium colpoda*. **Journal of General & Applied Microbiology**, v.29, p.41-50, 1983.
- ROGOFF, M.H. Oxidation of aromatic compounds by bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v.3, p.193-221, 1961.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v.51, p.365-379, 1987.
- ROY, I.; SHUKLA, S.K.; MISHRA, A.K. n-Dodecane as a substrate for nitrogen fixation by ana alkane-utilizing *Azospirillum sp.* **Current Microbiology**, v.16, p.303-, 1988.
- SAYLER, G.S.; PERKINS, R.E.; SHERRILL, T.W.; PERKINS, B.K.; REID, M.C.; SHIELDS, M.S.; KONG, H.L.; DAVIS, J.W. Microcosm and experimental pond evaluation of microbial community response to synthetic oil contamination in fresh-water sediments. **Applied & Environmental Microbiology**, v.46, p.211-219, 1983.
- SAYLER, G.S.; SHIELDS, M.S.; TEDFORD, E.T.; BREEN, A.; HOOPER, S.W.; SIROTKIN, K.M.; DAVIS, J.W. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. **Applied & Environmental Microbiology**, v.49, p.1295-1303, 1985.
- SCHAEFFER, T.L.S.; CANTWELL, S.G.; BROWN, J.L.; WATT, D.S.; FALL, R.R. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. **Applied & Environmental Microbiology**, v.38, p.742-746, 1979.
- SCHNOOR, J.L.; LICHT, L.A.; McCUTCHEON, S.C.; WOLFE, N.L.; CARREIRA, L.H. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. **Environmental Science & Technology**, 29, p.318-323, 1995.
- SCHUTT, C. Plasmids in the bacterial assemblage of a dystrophic lake: evidence for plasmid-encoded nickel resistance. **Microbial Ecology**, v.17, p.49-62, 1989.
- SCHWARZ, J.R.; WALKER, J.D.; COLWELL, R.R. Growth of deep-sea bacteria on hydrocarbons at ambient *in situ* pressure. **Developments in Industrial Microbiology**, v.15, p.239-249, 1974.
- SHERRILL, T.W.; SAYLER, G.S. Phenantrene biodegradation in freshwater environments. **Applied & Environmental Microbiology**, v.39, p.172-178, 1980.
- SNELLMAN, E.A.; COLLINS, R.P.; COOKE, J.C. Utilization of fuel oils by fungi isolated from oceanic tar balls. **Letters in Applied Microbiology**, v.6, p.105-107, 1988.
- SORKHOH, N.; AL-HASAN, R.; RADWAN, S. Self cleaning of the Gulf. **Nature**, v.359, p.109, 1992.
- SORKHOH, N.A.; IBRAHIM, A.S.; GHANNOUM, M.A.; RADWAN, S.S. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.39, p.123-126, 1993.
- SPAIN, J.C.; PRITCHARD, P.H.; BOURQUIN, A.W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. **Applied & Environmental Microbiology**, v.40, p.726-734, 1980.
- SPAIN, J.C.; Van VELD, P.A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structures. **Applied & Environmental Microbiology**, v.45, p.428-435, 1983.

- STIRLING, L.A.; WATKINSON, R.J.; HIGGINS, I.J. Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium **Journal of General Microbiology**, v.99, p.119-125, 1977.
- SUFLITA, J.M.; HOROWITZ, A.; SHELTON, D.R.; STEWART-TULL, D.E. Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. **Science**, v.218, p.1115-1117, 1982.
- TISSOT, B.P.; WELTE, D.H. Petroleum formation and occurrence. Berlin: Springer-Verlag, 1978. 539p.
- TOCCALINO, P.; JOHNSON, R.; BOONE, D.R. Nitrogen limitation and nitrogen fixation during alkane biodegradation in a sandy soil. **Applied & Environmental Microbiology**, v.59, p.2977-2983, 1993.
- TREVORS, J.T. DNA probes for the detection of specific genes in bacteria isolated from the environment. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.291-293, 1985.
- VAN DER LINDEN, A.C.; THIJSSE, G.J.E. The mechanism of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons. **Advances in Enzymology**, v.27, p.469-546, 1965.
- VAN DER LINDEN, A.C.; TRAXLER, R.W. The mechanism of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons. **Advances in Enzymology**, v.27, p.469-546, 1965.
- VAN EYK, J.; BARTELS, T.J. Paraffin oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*. I. Introduction of paraffin oxidation. **Journal of Bacteriology**, v.96, p.706-712, 1968.
- VECCHIOI, G.I.; DEL PANNO, M.T.; PAINCEIRA, M.T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. **Environmental Pollution**, v.67, p.249, 1990.
- VERSTRAETE, W.; VANLOOCKE, R.; DEBORGER, VERLINDE, A. Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. In: SHARPLEY, J.M.; KAPLAN, A.M. ed. **Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium**. London: Applied Science Publishers, 1976. p.99-112.
- WALKER, J.D.; COLWELL, R.R.; VAITUZIS, Z.; MEYER, S.A. Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii*. **Nature**, London, v.254, p.423-434, 1975.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Plant-microbe treatment system for toxic waste. **Current Opinions in Biotechnology**, v.3, p.267-270, 1992.
- WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil. **Environmental & Science Technology**, v.24, p.1086-1089, 1990.
- WEISSENFELS, W.D.; KLEWER, H.-J.; LANGHOFF, J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil particles: Influence on biodegradability and biotoxicity. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.36, p.689-696, 1992.
- WESTERMEYER, W.E. Oil spill response capabilities in the United States. **Environmental Science & Technology**, v.25, p.196-200, 1991.
- WOLFE, D.A.; HAMEEDI, M.J.; GALT, J.A.; WATABAYASHI, G.; SHORT, J.; O'CLAIRE, C.; RICE, S. *et al.* The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. **Environmental Science & Technology**, v.28, p.561-567, 1994.
- ZAJIC, J.E.; SUPPLISSON, B.; VOLESKY, B. Bacterial degradation and emulsification of no 6 fuel oil. **Environmental Science & Technology**, v.8, p.664-668, 1974.
- ZEYER, J.; KUHN, M.P.; SCHWARZENBACH, R.P. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. **Applied & Environmental Microbiology**, v.52, p.944-947, 1986.
- ZOBELL, C.E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v.10, p.1-49, 1946.
- ZOBELL, C.; PROKOP, J.F. Microbial oxidation of mineral oils in Barataria Bay bottom deposits. **Zeitung für Allgemeine Mikrobiologie**, v.6, p.143-162, 1966.

# BIODETERIORAÇÃO DE MONUMENTOS HISTÓRICOS

Maria Aparecida de Resende

Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas  
do Universidade Federal de Minas Gerais

Caixa Postal 1621, CEP 31270-010  
Belo Horizonte, MG

## I. INTRODUÇÃO



Amostra de pedra-sabão  
CO92/5, na ombreira da janela  
da lateral direita da Igreja Bom  
Senhor Jesus de Matosinhos,  
Congonhas, apresentando pedra  
trincada, com ruptura e perda  
de pedaços.

Rochas e minerais sofrem processo natural de desgaste por condições ambientais que levam à perda substancial de material. Esse desgaste pode ser causado por fatores físicos, como chuvas e vento, químicos, como poluição atmosférica, e fatores biológicos, assim como pela associação dos três tipos. As chamadas “pedras artificiais”, como concreto, ladrilho e argamassa, também podem sofrer alterações por ação desses fatores.

Entre os agentes biológicos que participam da degradação das pedras estão as bactérias quimilitotróficas e quimiorganotróficas, cianobactérias, algas, líquens e os fungos. Entre os mecanismos típicos de biocorrosão está a excreção de ácidos inorgânicos, como o ácido nítrico e o ácido sulfúrico, produzidos pelas bactérias quimiolitotróficas e os ácidos orgânicos, liberados pelas bactérias quimiorganotróficas e pelos fungos, na superfície das rochas. Os filmes microbianos ou biofilmes, constituídos de algas, líquens, fungos e bactérias, que crescem praticamente em todas as pedras expostas a condições atmosféricas variadas, também podem modificar a composição química e mineralógica da pedra original.

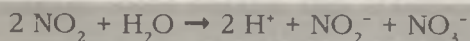
A pressão causada pela formação de sais ou de cristais de gelo e liquefação nas camadas superficiais das rochas, sendo este último um fenômeno típico de países temperados, está incluída entre os fatores físico-químicos que provocam danos nas construções em pedra.

## II. SITUAÇÃO ECOLÓGICA E POLUIÇÃO

O clima e as condições de poluição atmosférica também influenciam os processos biológicos de degradação das rochas. Assim é que a situação ecológica dos microrganismos e sua conexão relativa com o tipo de pedra (pedra-sabão, calcária ou arenito, ácida etc.) e muitos outros fatores ambientais têm um importante papel nos processos de intemperização das rochas. Além do mais, essa situação depende, em grande parte, da exposição da pedra a diferentes condições climáticas e de poluição. Ainda, de acordo com Krumbein (1988b), enquanto as rochas das áreas desérticas têm uma velocidade de decomposição de 10 mm a cada 100 anos, nas cidades o fenômeno apresenta velocidade quatro vezes maior.

A microflora de materiais inorgânicos representa um complexo ecossistema que se desenvolve de diversas maneiras, dependendo das condições geográficas e climáticas, da presença de partículas inorgânicas e/ou orgânicas do ar, assim como das propriedades físico-químicas do material em questão. Em muitos casos, a poluição do ar aumenta consideravelmente o crescimento dos biofilmes e, conseqüentemente, a biodeterioração, como no caso da amônia ou matéria orgânica fornecida pelo vento e chuva nas áreas de indústrias e de agricultura intensiva. A amônia também, assim como a matéria orgânica, pode ser originada de fertilizantes secos ou úmidos (pó de amônia ou adubo líquido). Algas e cianobactérias podem suprir as rochas com grandes quantidades de limo e amônia, via processos de deterioração quimiorganotróficos. Além disso, o limo bacteriano se comporta como adesivo e suporte para deposição de partículas de carvão e fuligem na superfície das rochas.

Sabe-se que a atmosfera antropogênicamente poluída tem contribuído para um aceleração da corrosão dos monumentos históricos de pedra nos últimos 100 anos. Devido ao uso intensivo de combustíveis derivados do petróleo, milhões de toneladas de gases poluentes são liberados na atmosfera, especialmente  $\text{SO}_2$  e  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}$  e  $\text{NO}_2$ ). Sabe-se, desde longa data, que o  $\text{SO}_2$ , sozinho ou combinado com a água, ataca e dissolve a superfície das pedras. Outro poluente bem conhecido é o  $\text{NO}_2$ . O monóxido de nitrogênio e o dióxido de nitrogênio são originados principalmente da emissão de gases dos automóveis (60%) e do solo. O  $\text{NO}_2$  reage com a água e forma ácido nitroso e ácido nítrico, conforme a equação:



### III. DETERIORAÇÃO DE MONUMENTOS CONSTRUÍDOS DE PEDRA

A decomposição das rochas apresenta dois aspectos principais: por um lado, é indispensável e, portanto, necessária para a formação do solo e, por outro lado, causa inestimável dano nas pedras usadas na construção dos monumentos e esculturas da nossa herança cultural.

A degradação biológica das rochas inclui e é estritamente associada a processos químicos e físicos. Os processos bioquímicos e biofísicos de degradação das pedras incluem a ação direta e indireta de organismos que modificam as propriedades e estabilidade das rochas e das construções de pedras.

A degradação das rochas e pedras utilizadas nas construções de monumentos históricos foi, durante muito tempo, considerada um processo estritamente físico-químico. Krumbein (1966, 1968, 1972, 1983) e Krumbein & Schönborn-Krumbein (1987) foram os primeiros pesquisadores a descrever o fenômeno da biodeterioração da pedra e eles o definiram como uma troca ou biotransferência de material e energia entre dois sistemas heterogêneos abertos: o substrato sólido (rocha, mineral, concreto etc.) e a atmosfera. Antes dessas publicações, o significado da influência microbiana nos processos de deterioração das pedras era praticamente ignorado e, na maioria das vezes, não era levado em consideração nos processos de análise e conservação dos materiais. Mais recentemente, a participação dos processos de biodeterioração nas alterações que ocorrem nas pedras tem sido ressaltada e descrita em muitos casos, conforme artigo de revisão de May *et al.* (1993). A separação entre deterioração físico-química (abiótica) e biológica (biótica) é praticamente impossível, uma vez que cada processo, químico ou físico, é influenciado ou controlado pela atividade microbiana. Os processos de biodeterioração e outros processos ambientais de deterioração estão intimamente relacionados, uma vez que a presença de um deles torna o outro mais efetivo.

### IV. MECANISMOS DE AÇÃO DOS MICRORGANISMOS NOS PROCESSOS DE BIODETERIORAÇÃO DAS PEDRAS

Os microrganismos estão fortemente envolvidos nos processos de degradação de pedras dos monumentos históricos. Entretanto, os mecanismos de deterioração e a interrelação entre organismos, assim como entre organismos e pedras, não estão ainda satisfatoriamente explicados. Sabe-se que a colonização e contaminação das rochas são basicamente

controladas pelos impactos ambientais, tais como tipo de pedra, condições climáticas e fatores edáficos (relativos ao solo). Poluentes antropogênicos orgânicos e inorgânicos do ar, especialmente hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, aceleram os processos quimiorganotróficos de biodeterioração em pedras expostas em monumentos históricos. A interação entre a poluição do ar e os microrganismos da pedra interfere significativamente no aumento da população microbiana e, conseqüentemente, influencia diretamente o processo de biodeterioração.

Microrganismos, tais como as algas, líquens, fungos, assim como bactérias quimilitotróficas e quimiorganotróficas, influenciam os processos de degradação das rochas, principalmente através de duas diferentes maneiras, de acordo com Silverman (1979):

1) A excreção de ácidos inorgânicos (acidólise) ou orgânicos (complexólise) causa lixiviação, com perda de material ligante da rocha, levando, como conseqüência, ao enfraquecimento da estrutura cristalina do mineral da rocha. A liberação biogênica de ácidos corrosivos é um dos mecanismos de destruição biogeotécnica mais conhecidos e estudados.

2) A excreção de substâncias poliméricas extracelulares que absorvem água (SPE) forma os chamados biofilmes, que levam, como conseqüência, a mudanças na porosidade e permeabilidade das rochas. A presença dos biofilmes na camada superficial das rochas, em associação com a liberação de substâncias surfactantes, modifica também a absorção e difusão da água nesses materiais. Em adição, a absorção de gases poluentes da atmosfera parece também aumentar na superfície coberta com o biofilme.

Resumindo, de acordo com Krumbein (1987), os processos microbianos mais importantes envolvidos no biotransporte e biotransferência de material mineral e, portanto, na biodeterioração de construções, monumentos ou objetos de arte em pedras são identificados como:

- 1) Produção de ácidos (prótons).
- 2) Produção de compostos complexos.
- 3) Produção de substâncias adesivas e surfactantes.
- 4) Produção de substâncias minerais tais como óxidos, fosfatos, carbonatos, oxalatos etc.
- 5) Produção de nichos ecológicos (perfurações, formação de crostas, alargamento de fissuras e criação de reservatórios de água).

A importância dos processos biológicos e outros fatores na deterioração das pedras usadas em construção de monumentos históricos tem sido repetidamente questionada. Porém, não existem mais dúvidas de que a composição da atmosfera, assim como a agressividade das solu-



ções formadas na superfície da pedra, são sempre determinadas pelos processos biológicos. O fenômeno biológico é, sem dúvida, o fator chave no processo de intemperização das rochas e, portanto, das pedras usadas nas construções dos monumentos.

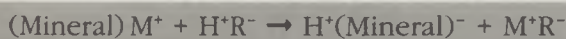
Qualquer organismo ou produto gerado por seres vivos é capaz de acelerar a destruição de material mineral e exemplos dessas atividades são numerosos. Segundo Krumbein (1988), os efeitos biogênicos nas construções de pedra podem variar conforme o agente:

1. Causados pelo homem (antropogênicos): guerra, vandalismo, negligência, poluentes.
2. Causados pelas plantas e animais: crescimento direto, influências indiretas como crescimento de raízes, produção de excreções diversas etc.
3. Causados pelos microrganismos e outros organismos: crescimento de líquens, musgos, algas, fungos, bactérias e actinomicetos, produção de metabólitos etc.
4. Causados por fatores biofísicos: transferência de prótons, transferência de elétrons, força de Van der Waals etc.

Berthelin (1983) divide o processo microbiano de degradação das rochas em dois mecanismos: de **solubilização** e **insolubilização**.

**Solubilização:** inclui os processos de acidólise, complexólise e alcalinólise, assim como os outros enzimáticos e não enzimáticos.

- Acidólise: é definida como o processo de ação do próton de complexação fraca de ácidos com metais das rochas. Como exemplo de ácidos podemos citar o carbônico, nítrico, fórmico, acético, láctico, glucônico, e as reações que ocorrem conforme esquema geral abaixo:



onde  $\text{R}^- = \text{NO}_3^-, \text{R}_1\text{COO}^-, \text{HCO}_3^-, \text{SO}_4^{2-}$ , entre outros.

- Complexólise: leva à constituição de complexos organo-metálicos ou quelatos. Cátions monovalentes são extraídos por prótons ( $\text{H}^+$ ) dos ácidos biogênicos e, dessa maneira, são facilmente lavados. O mesmo acontece com os cátions di e trivalentes, que após processo de redução podem ser incorporados em complexos-quelatos e são também lavados pela água.

- Alcalinólise: grande número de microrganismos toma parte na degradação de compostos nitrogenados. O produto dessas reações (amônia) aumenta o pH e induz a solubilização da sílica.

**Insolubilização (imobilização):** os microrganismos podem absorver elementos minerais, precipitá-los fora de suas células ou incorporá-los em seu interior. Portanto, agem como sequestradores de íons, imobilizando-os.

## V. ORGANISMOS ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS DE BIODETERIORAÇÃO DAS PEDRAS

Os principais organismos envolvidos na degradação das rochas podem ser agrupados da seguinte maneira:

### V. 1. Líquens

Os líquens formam uma associação simbiótica entre um fungo (micobionte) e uma alga ou uma cianobactéria (ficobionte). Os fungos recebem nutrientes orgânicos das algas fotossintéticas e, por outro lado, suprem as algas de substâncias minerais retiradas da pedra através da penetração mais profunda das hifas no material pétreo. Os líquens, juntamente com as algas e cianobactérias, são considerados organismos pioneiros na colonização das superfícies de rochas e pedras trabalhadas. Como são organismos fotolitotróficos, não dependem de suprimento exterior de substrato orgânico. Os líquens, especialmente, toleram condições extremas de umidade e temperatura. Os líquens e outros organismos "epilíticos" (que crescem na superfície das pedras) podem formar um tapete cobrindo a superfície das rochas e, dessa maneira, regular a estabilidade da umidade. Muitas vezes, os líquens podem se estabelecer apenas na superfície das pedras, mas em algumas circunstâncias a hifa do fungo micobionte pode penetrar na rocha e a deterioração da rocha pode dever-se a:

- a) expansão da hifa na matriz da pedra;
- b) sucessiva expansão e contração da colônia de líquen em diferentes situações de umidade e de seca;
- c) absorção de água em torno da colônia do líquen, que pode levar a danos por congelamento da mesma nos países de clima temperado e ao aumento da absorção de ácidos atmosféricos na pedra.

As crostas biogênicas mantêm um balanço entre a atmosfera e a litosfera, o que pode proteger a pedra contra fatores destrutivos físico-químicos. Entretanto, esses organismos podem tomar parte no processo de deterioração, através da produção de ácidos. Esses organismos também produzem ácidos orgânicos, que podem quelar metais e formar complexos solúveis na água. A água da chuva pode, dessa maneira, causar erosão na pedra.

O crescimento maciço de líquens, como ocorre em países de clima tropical, pode tornar escura a superfície de esculturas e monumentos de pedra e os nichos formados podem levar ao acúmulo de detritos carregados pelo vento, nutrientes e água, favorecendo o estabelecimento de musgos e plantas nesses locais. A colonização da pedra pelos líquens pode

ser facilitada pela presença de fezes de pássaros, que podem fornecer nutrientes extras.

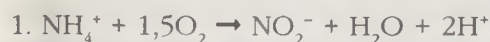
## V. 2. Fotolitotróficos

São as algas e cianobactérias, que usam a luz do sol como fonte de energia para o crescimento e liberam oxigênio durante o processo fotossintético. O requerimento de carbono é suprido pelo  $\text{CO}_2$  da atmosfera.

As algas podem ser constituídas de uma única célula ou apresentar estrutura filamentosa. Elas podem, muitas vezes, ser encontradas na superfície de pedras, onde existem luz e umidade e causar dano mecânico pela colonização e dilatação de rachaduras na rocha. Também produzem ácidos, que podem dissolver o carbonato de cálcio. Além do mais, esses organismos podem secretar outros produtos, tais como aminoácidos, açúcares, antibióticos e outras substâncias estimuladoras do crescimento, que criam condições de nutrição propícias ao crescimento de algumas bactérias quimiorganotróficas específicas na superfície das pedras. Biodeterioração estética ou produção de manchas é provavelmente o mais importante tipo de dano causado pelas algas.

## V. 3. Bactérias Quimiolitoautotróficas

As bactérias quimiolitoautotróficas usam doadores inorgânicos de hidrogênio, tais como  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , tiosulfato ou enxofre elementar e são capazes de produzir energia a partir da oxidação destes compostos. Essas bactérias utilizam também o  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono. Esse processo resulta na liberação de ácido nitroso (*Nitrosomonas*), ácido nítrico (*Nitrobacter*) ou ácido sulfúrico (*Thiobacillus*). Os habitats naturais dessas bactérias são o solo, adubo, dejetos, rios, lagos e água do mar. Esses microrganismos participam do ciclo do nitrogênio pela formação biológica do nitrato ou nitrito a partir de compostos contendo nitrogênio reduzido. Este processo, chamado nitrificação é realizado por dois grupos diferentes de bactérias, o primeiro, das *Nitrosomonas*, que oxida amônia a nitrito, e o segundo das *Nitrobacter*, que converte nitrito a nitrato, por oxidação, conforme as reações abaixo:



Essas reações destroem material alcalino e o carbonato de cálcio formando nitratos, que são solúveis na água, levando à perda de material da pedra.

#### V. 4. Bactérias Quimiorganotróficas

As bactérias quimiorganotróficas, assim como os fungos, obtêm energia através da oxidação de substratos orgânicos (doadores de hidrogênio). Em alguns casos essas bactérias são capazes de produzir energia, através da oxidação de cátions metálicos, tais como  $Fe^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ . Esses microrganismos também participam do processo de biodeterioração das pedras por processos semelhantes aos dos microrganismos quimioautototróficos.

#### V. 5. Fungos

Os microrganismos pertencentes ao Reino Fungi que colonizam as rochas e os monumentos de pedra têm sua origem no solo, na água do solo e no ar. Somente no ar eles são encontrados em número acima de 10.000 esporos por  $m^3$ . Sob condições favoráveis, esses microrganismos são capazes de crescer e influenciar fortemente o processo de biodeterioração das rochas. Entretanto, baixa disponibilidade de água e oxigênio, assim como baixos suprimentos de compostos orgânicos limitam enormemente seu número. Em pedras de monumentos fortemente intemperizadas o número de fungos filamentosos pode alcançar o mesmo encontrado em amostras de solo. Muitos autores têm relatado o encontro de grande quantidade de fungos na superfície das rochas e de monumentos e construções em pedra de números acima de  $10^4$  a  $10^6$  UFC (unidades formadoras de colônia) por grama de pedra.

A maioria dos gêneros de fungos encontrada nas rochas pertence à microbiota do solo e do ar. Os fungos isolados de diferentes locais, como rochas, monumentos e afrescos, pertencem a gêneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Aureobasidium* e *Torula*. Os fungos são considerados como o grupo de organismos que apresenta o maior potencial de destruição das pedras. A atividade dos fungos filamentosos representa o fator mais significativo na solubilização de rochas, minerais e silicatos, incluindo o quartzo.

Os fungos podem utilizar um largo espectro de nutrientes e até mesmo traços de matéria orgânica podem estimular seu crescimento. As camadas mais externas da superfície das rochas podem conter cerca de mais de 2% de material orgânico como pectina, celulose, lignina, amido e proteínas e os fungos são capazes de utilizar esses substratos como fonte de energia. As enzimas extracelulares podem decompor os mais complexos compostos orgânicos. Os fungos produzem e lançam no meio ambiente uma série de exoenzimas, como as pectinases, amilases, proteínases, ligninases etc., além de ácidos orgânicos e inorgânicos.

A produção de ácidos orgânicos pelos fungos filamentosos contribui consideravelmente para a degradação natural das rochas e minerais contendo silicatos, assim como as pedras dos monumentos. De acordo com Petersen *et al.* (1988), fungos isolados freqüentemente da superfície de monumentos de arenito apresentam capacidade acidolítica, e Kuroczkin *et al.* (1988) demonstraram que 30% de amostras de fungos isoladas desse mesmo tipo de pedra eram capazes de produzir ácido a partir de glicose e alguns polissacarídeos como o amido. O ácido glucônico e o oxálico foram os mais freqüentemente produzidos. O ácido oxálico apresenta maior poder de solubilização das rochas do que o ácido cítrico. Henderson & Duff (1963) observaram que a correlação entre um certo ácido e seu potencial de solubilização das rochas é difícil de ser avaliada, uma vez que um fungo pode produzir simultaneamente diferentes tipos de ácidos.

As hifas fúngicas podem penetrar nas rochas numa profundidade de até 1-4 mm e podem solubilizar minerais que contenham silicatos ou materiais calcários.

Os fungos não são suscetíveis aos extremos de temperatura e umidade e toleram larga faixa de pH, além de resistirem a baixos teores de umidade. O pigmento escuro melanina é produzido por muitos fungos e esse composto os protege contra a ação dos raios UV. Todas essas propriedades tornam os fungos os organismos dominantes nas superfícies das rochas.

## VI. CONTROLE DOS PROCESSOS DE BIODETERIORAÇÃO

Em casos extremos, o controle dos processos de biodeterioração vem a ser necessário.

A preservação dos monumentos históricos é muito importante, pois são heranças culturais da humanidade e neles estão representados o momento social, político e cultural em que seu idealizador viveu e os traços desse artista. Torna-se necessário, portanto, preservá-los.

A análise microbiológica das rochas tem de ser adaptada a cada tipo de pedra e aos diferentes sítios onde estão localizadas. Uma série de investigações deve ser realizada antes de se chegar à anamnese, ao diagnóstico e ao tratamento das rochas danificadas que podem conter pigmentos negros, brancos, verdes, vermelhos ou de outras cores.

Krumbein (1988) apresenta uma lista de substâncias mais comumente empregadas na preservação de monumentos e construções em pedra:

- 1) antibióticos;
- 2) enzimas;
- 3) biocidas (bactericidas, fungicidas, algicidas);

- 4) tensoativos e sabões;
- 5) taninos e fenóis (naturais e sintéticos);
- 6) gases (por exemplo, óxido de etileno);
- 7) irradiação (por exemplo, radiação UV).

A Tabela 1 apresenta uma lista de diferentes substâncias químicas usadas nas formulações dos biocidas.

Segundo Becker *et al.* (1994), medidas protetoras e de restauração de materiais pétreos danificados, no caso em que se ignoram ou se subestimam os efeitos microbianos, são de curta duração e podem mesmo levar a um aumento na degradação do material, assim como do processo de biodeterioração. Exemplo desse tipo de tratamento é aquele em que se usa jato de água sob alta pressão, que propicia um alívio temporário da infecção mas com o tempo provoca um aumento da microflora contaminante devido ao aumento da umidade.

Organossilanos têm sido usados como agentes hidrofóbicos e profiláticos na superfície de monumentos de pedra e o processo resulta na diminuição da umidade nessas estruturas. Com isso, o suprimento de nutrientes para os microrganismos é dificultado, assim como o transporte de sais solúveis na estrutura do material. Na prática, no entanto, essas medidas protetoras demonstraram não apresentar eficiência a longo prazo. Os fungos conseguem crescer utilizando esses compostos como fonte de carbono, o que leva à perda de sua propriedade hidrofóbica, além da possibilidade de ocorrer a formação do biofilme superficial.

Nas medidas de controle e proteção contra a ação microbiana é necessário, inicialmente, garantir as condições de umidade e temperatura adequadas da rocha. Após a eliminação do potencial de destruição da microflora, a aplicação de agentes protetores tem que levar em conta as condições dominantes do objeto. A escolha do agente protetor, como uso de consolidantes, substâncias hidrofóbicas, fixativos ou até mesmo a cobertura da superfície da pedra com lâminas, tem que ser realizada com muito cuidado. Os biocidas podem ser usados, a fim de aumentar a durabilidade do agente protetor. Diferentes produtos têm sido sugeridos, como os compostos quaternários de amônio, substâncias heterocíclicas e metalorganos. Mas, infelizmente, a eficiência dessas substâncias não tem sido comprovada em experimentos de laboratório. Devido à propriedade de adaptação metabólica e fisiológica dos microrganismos, assim como sua capacidade de integração em ecossistemas complexos e sua habilidade em se cobrir com camadas protetoras de biofilmes, os efeitos dos biocidas têm sido considerados de pouca eficácia.

Na escolha de um microbiocida deve ser levada em conta sua eficácia contra uma ampla gama de microrganismos específicos do material a ser

TABELA 1. Lista de substâncias químicas utilizadas na formulação de biocidas (Allsopp &amp; Seal, 1986).

---

**1. Compostos metálicos**

Naftenato e quinolinato de zinco e cobre  
Dimetilditiocarbamato de cobre e zinco  
Óxido de tributiltina, fluoreto, cloreto e naftenato  
Acetato fenilmercúrico  
10,10-Oxibisfenoxarsina  
Organobóricos

---

**2. Fenólicos**

Fenol e homólogos como ortofenil, cresol e timol  
Triclorofenol, pentaclorofenol, paracloro-metacresol,  
diclorodihidroxidifenilmetano  
Ácido paraidroxibenzóico, laurato de pentaclorofenil  
Paranitro fenol, salicilanilida

---

**3. Compostos quaternários de amônio**

Cloreto de diacildimetilamônio  
Cloreto de alquildimetilbenzilamônio

---

**4. Compostos de nitrogênio**

1,3,5-hexaidroxitriazina e derivados  
Salicilato de dodecilamina  
Oxazolidinas  
Imidazolinias

---

**5. Compostos sulfurados**

Sulfeto de bis (2-hidroxi-5-clorofenil)  
Hexaclorodimetilsulfona

---

**6. Compostos de nitrogênio e enxofre**

Dissulfeto de tetrametilourano  
Tioftalimida de N-triclorometil e derivados fluorados  
Sulfato de hidroxiquinoleína  
Isotiazolina

---

**7. Compostos inorgânicos**

Sais de elementos metálicos de cobre, zinco, cobre/cromo, potássio e mercúrio

---

protegido. Efeitos colaterais, como mudança da cor do objeto a ser protegido, corrosão ou cristalização interna, devem ser evitados. Além do mais, o biocida tem que ser ecologicamente sólido. O uso de metais pesados, como cobre, por exemplo, pode ser combinado com um composto orgânico, levando a um efeito sinérgico, com a vantagem de se usarem menores quantidades dos mesmos. Na prática, para se restaurar e conservar um monumento é necessário realizar o completo e cuidadoso diagnóstico da degradação do objeto cultural, levando em conta as influências biogênicas, os fatores climáticos e as condições de poluição atmosférica.

## VII. DEFINIÇÃO DOS TERMOS ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS DE DESTRUÇÃO DAS ROCHAS E PEDRAS USADAS EM CONSTRUÇÕES DE MONUMENTOS

**Abrasão:** é um caso especial de erosão, definida como fricção ou efeito mecânico de qualquer espécie sólida ou de superfície dura em outra superfície sólida ou dura, levando à erosão.

**Bioabrasão:** ação de organismos nas rochas com seus cascos, bicos e línguas, raízes, galhos e folhas.

**Alteração:** mudança na composição mineral de uma rocha por qualquer meio químico.

**Decomposição:** em geologia, o termo é sinônimo de intemperização química, enquanto em biologia é usado para descrever o processo de formação de minerais provenientes de compostos orgânicos por via respiratória ou fermentativa.

**Biodegradação:** é definida como a propriedade que os microrganismos, utilizados pelo homem, têm de transformar um material em uma forma mais útil ou aceitável. Biodegradação se refere somente a materiais que geralmente são de valor baixo ou mesmo negativo, como os dejetos orgânicos (casca de arroz, bagaço de cana, farelo de trigo, por exemplo) e se distingue do processo de deterioração, porque este último se aplica a materiais já processados. Além do mais, o processo de biodegradação é considerado positivo, quando comparado com o de biodeterioração.

**Biodeterioração:** é definida como qualquer troca indesejável nas propriedades de um material, causada por atividade vital de um organismo. Tem sido definida também como a deterioração de materiais de importância econômica pelos microrganismos. Deterioração implica uma perda de material e, de certa maneira, do ponto de vista humano, é uma ação negativa.



**Erosão:** remoção ou transporte de substâncias por ação mecânica ou física.

**Lixiviação e biolixiviação:** lixiviação é um termo derivado da mineração e processamento de material. Esse processo pode ser efetuado por ação de ácidos ou bases ou por métodos eletroquímicos, levando à perda de íons metálicos e resulta, conseqüentemente, em um enfraquecimento da estrutura cristalina da rocha. No caso da biolixiviação, o processo ocorre pela ação de ácidos, como por exemplo, o sulfúrico, por ação de quelantes ou ainda por contato direto da rocha com a superfície de microrganismos, tais como fungos, cianobactérias e bactérias quimiorganotróficas.

## VIII. MÉTODOS E TÉCNICAS USADAS NA ANÁLISE DO ESTADO E CONTROLE DA BIODETERIORAÇÃO DE MONUMENTOS DE PEDRAS

### VIII. 1. Coleta das Amostras

Após a seleção cuidadosa dos sítios caracterizados como os mais típicos na forma de intemperização, pequenos cubos de pedra, de aproximadamente 10 x 10 x 2 mm, são coletados, com auxílio de serra elétrica ou bisturi, previamente desinfetados com etanol a 70%. As amostras são acondicionadas em placas de Petri estéreis e transportadas para o laboratório em caixas de isopor contendo gelo.

Os parâmetros ambientais e o aspecto de degradação são imediatamente registrados e fotografados, assim como as condições de exposição do sítio escolhido no objeto em estudo.

### VIII. 2. Análises de Laboratório

A análise da microflora contaminante é realizada mediante o isolamento, a contagem e a identificação dos grupos microbianos, a investigação fisiológica dos mecanismos físico-químicos de deterioração e pela observação microscópica da formação e distribuição do biofilme na superfície da pedra.

#### VIII. 2. 1. Preparo das amostras e isolamentos dos microrganismos:

As amostras de pedra são pulverizadas em gral de porcelana e 1 g do material é adicionado a 10 ml de solução de tween 80 em água destilada estéril a 0,001%. A suspensão da pedra, depois de agitada em agitador

durante 1 hora, é semeada nos meios adequados de cultura para contagem e isolamento dos microrganismos. Os meios usados com maior frequência são os seguintes: de ágar Sabouraud e Czapek-Dox para fungos, de BR (Bunt & Rovira, 1955) para bactérias quimiorganotróficas e de GNCd (Küster & Williams, 1964) para actinomicetos. As bactérias nitrificantes são quantificadas pelo método do NMP (número mais provável) por g de pedra. As bactérias amônia-oxidantes são isoladas em meio de BNM (Krümel, 1978) enquanto as nitrito-oxidantes em meio de BNB (Bock & Engel, 1966). As algas e cianobactérias são quantificadas também pelo método do NMP e isoladas no meio BG 11 (Ripka *et al.*, 1979).

### VIII. 2. 2. Testes fisiológicos

a) Dosagem de proteína do biofilme: o teor de proteína do biofilme é usado como parâmetro da medida da biomassa. A dosagem de proteínas é determinada pela técnica de Lowry *et al.* (1951), a partir de 0,5 ml de suspensão da amostra (50 mg de pedra pulverizada em 0,45 ml de NaCl a 0,9%).

b) Medida da atividade desidrogenase do biofilme: essa medida é realizada por um método rápido que fornece a avaliação da atividade microbiana. As amostras de pedra são pulverizadas e suspensas em 1 ml de tampão Tris-HCl 0,1M contendo 0,2% de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC). As amostras, incubadas a 27°C por 24 horas, têm depois adicionados 4 ml de uma solução contendo acetona/tetrahydrocloreto de carbono (90:10, v/v). A mistura é agitada vigorosamente e colocada em repouso por 2 horas, no escuro. A suspensão é, então, filtrada em papel de filtro Schleicher & Schüll 595. O papel é lavado com a mesma solução e o volume do filtrado é completado para 5 ml. A dosagem do composto formado 1,3,5-trifenilformazana (TPF) é feita pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 546 nm e os dados obtidos são comparados com uma curva padrão e a atividade desidrogenase calculada em mg de TPF/kg de pedra.

c) Coloração do biofilme pelo método de PAS: fragmentos das amostras de pedras são tratados com ácido periódico a 75%, sob agitação, por 8 minutos. Após, as amostras são lavadas por 5 minutos em etanol 70% e, por mais 5 minutos, em água gelada. As amostras são então tratadas com reagente de Schiff, sob agitação, por 20 minutos e, em seguida, agitadas em solução de sulfeto de sódio a 0,6% em água/HCl, 95:5 (v/v). Finalmente as amostras de pedra são lavadas duas vezes em água gelada e estocadas em etanol 70% para posterior análise microscópica.

d) Pesquisa da produção de ácido pelos fungos: os fungos são cultivados em meio líquido de Czapek-Dox por 14 dias a 28°C. Depois as

culturas são filtradas e o pH do filtrado é medido em pHmetro. Os ácidos produzidos são identificados por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) e GLC (cromatografia-gás-líquida).

e) Investigação microscópica: a contaminação da parte interior das escamas de pedra contendo biofilme podem ser observadas ao microscópio eletrônico pela técnica da microscopia de varredura.

f) Medida da respiração *in situ*: a atividade microbiana pode ser medida através da respiração, diretamente, na superfície da pedra. Caixas hermeticamente fechadas, com soluções que podem absorver o CO<sub>2</sub> liberado durante a respiração são aderidas à superfície da pedra, contendo o crescimento microbiano. Posteriormente essas soluções são tituladas com uma base, como por exemplo o NaOH, e a quantidade de CO<sub>2</sub> formada é calculada e, quanto maior é o teor desse composto, maior é a contaminação microbiana desse local.

## **IX. EXEMPLO DE PESQUISA SOBRE DETERIORAÇÃO EM PEDRAS: DETERIORAÇÃO DE MONUMENTOS HISTÓRICOS DE PEDRA-SABÃO E QUARTZITO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

O projeto IDEAS (Investigação sobre degradação de materiais pétreos em monumentos históricos), envolvendo instituições brasileiras e alemãs, surgiu da necessidade de um maior aprofundamento das características e do estado de conservação do acervo em pedra, de Minas Gerais. Neste estado, as pedras foram largamente utilizadas pelos artistas e artífices setecentistas em suas criações. Considerando que o processo de desgaste e degradação vem se acentuando nos últimos anos, além da incipiência das pesquisas na área de preservação das pedras de nosso país, conclui-se, após avaliação dos estudos existentes, da necessidade de dar continuidade aos processos de pesquisa iniciados anteriormente.

A preservação de monumentos históricos é muito importante, pois constituem em herança cultural da humanidade e neles estão representados o momento social, político e cultural em que seu idealizador viveu e os traços desse artista. Torna-se necessário, portanto, preservá-los.

O projeto IDEAS teve como objetivos o registro e a avaliação do processo de biodeterioração nos monumentos históricos de pedra do estado de Minas Gerais, a fim de se elaborar um processo prático no auxílio da restauração e conservação, envolvendo o tratamento das pedras com biocidas.

## IX. 1. Objetos do Estudo

Os monumentos históricos, objeto das pesquisas, foram escolhidos com base nas diferentes condições climáticas a que se acham expostos. O Santuário Bom Jesus de Matosinhos, em Congonhas, situado numa área em fase inicial de industrialização, apresentando ainda alterações incipientes (Tabela 2); a Igreja São Francisco de Assis, em Ouro Preto, que vem há muito sofrendo os efeitos da poluição atmosférica, apresentando alterações em estágio bastante alterado; e o conjunto arquitetônico do Caraça, que, por situar-se em região pouco afetada pela degradação ambiental, serviu como controle para os estudos nos outros locais de escolha (Tabela 3).



Local de coleta da amostra de quartzito OP92/1, no cunhal do lado direito da fachada posterior da Igreja São Francisco de Assis, em Ouro Preto, apresentando cratera, com área de descamação e pontos de coloração verde-musgo.

Os resultados de pesquisa sobre deterioração de monumentos históricos são de grande importância na orientação de profissionais da área de preservação do patrimônio cultural, na medida em que permite estabelecer critérios e oferecer base científica para a conservação e restauração do material pétreo dos nossos monumentos históricos.

TABELA 2. Resultados de análise microbiológica e físico-química de amostras de pedra-sabão do Santuário do Senhor Bom Jesus de Matosinhos, em Congonhas, coletadas em fevereiro de 1992.

Amostra	pH (H <sub>2</sub> O)	Proteína mg/mL	TTC mg/Kg/ pedra	Bactéria quimorg anotrófica UFC/g	Nitobacter NMP/g	Nitroso- monas NMP/g	Fungos UFC/g	Algas NMP/g x10 <sup>6</sup>	Actinomi- cetos UFC/g
Co92/1	9,7	0,7	34	10700	17500	0	90	5,75	2900
Co92/2	8,0	2,6	196	17000	0	21500	7500	0,3	0
Co92/3	9,2	0,1	4,8	17000	7500	11500	170	0,137	3100
Co92/5	9,5	n.d.	6,4	3400	2000	0	1400	0	0
Co92/8	9,4	0,8	25	33000	46500	11500	0	5,75	20000
Co/92/9	9,2	1,6	176	72000	465000	1500	170	0,575	4100
Co92/10	9,1	0,3	10	36000	46500	11500	170	0,057	4800

TABELA 3. Produção de ácido por fungos isolados da Igreja São Francisco de Assis em Ouro Preto, Igreja Bom Jesus de Matosinhos em Congonhas e Nossa Senhora Mãe dos Homens no Caraça, em fevereiro de 1992\*.

Amostra	Fungo	pH	Amostra	Fungo	pH
OP92/1	<i>Aspergillus ochraceus</i>	6,97	OP92/7	<i>Aspergillus japonicus</i>	5,82
	<i>Penicillium expansum</i>	4,05		<i>Penicillium expansum</i>	4,68
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,46		<i>Aspergillus puniceus</i>	4,60
	<i>Penicillium</i> sp.	5,31		<i>Penicillium nigricans</i>	4,60
	<i>Phialophora richardsiae</i>	7,00		<i>Aureobasidium pullulans</i>	6,46
OP92/3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,99	OP92/8	<i>Penicillium</i> sp.	6,58
	<i>Curvularia palescens</i>	6,74		<i>Aspergillus</i> sp.	7,93
	<i>Absidia cylindrospora</i>	6,50		<i>Curvularia pallescens</i>	7,98
	<i>Penicillium expansum</i>	4,05		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,46
OP92/4	<i>Alternaria</i> sp.	6,60	CO92/1	<i>Chrysosporium</i> sp.	6,91
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	7,29		CO92/2	<i>Cladosporium sphaerospermium</i>
	<i>Periconia</i> sp.	6,90	<i>Penicillium</i> sp.		6,91
	<i>Penicillium mineoluteum</i>	5,6	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5,00	
	<i>Aspergillus flavipes</i>	6,46	CO92/3	<i>Phoma</i> sp.	7,33
	<i>Pyrenospora</i> sp.	5,43		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,30
	<i>Penicillium expansum</i>	6,25		<i>Mucor hiemalis</i>	3,99
	<i>Aspergillus</i> sp.	6,64	<i>Fusarium oxysporum</i>	4,78	
	<i>Curvularia palescens</i>	6,10	CO92/4	<i>Acremonium</i> sp.	4,78
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>		6,46	
OP92/6	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	6,71	CO92/5	<i>Cladosporium</i> sp.	6,66
	<i>Phialophora</i> sp.	7,17		<i>Haplosporangium</i> sp.	5,70
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,99	CO92/8	<i>Acremonium</i> sp.	4,33
	<i>Penicillium</i> sp.	6,44		<i>Cladosporium sphaerospermium</i>	6,53
	<i>Curvularia palescens</i>	7,98	CO92/9	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	6,43
	<i>Verticillium lecanii</i>	5,70		CO92/0	<i>Penicillium expansum</i>
	<i>Fusarium</i> sp.	7,23	<i>Mycelia sterilia</i>		5,20
	<i>Aspergillus sydowii</i>	7,04	CA92/1	<i>Pleiochaeta</i> sp.	6,00
	<i>Penicillium</i> sp.	6,16		<i>Aspergillus versicolor</i>	6,40
		<i>Paecilomyces lilacinus</i>	7,27		
OP92/7	<i>Penicillium</i> sp.	5,83	<i>Phialophora</i> sp.	6,13	
	<i>Cladosporium sphaerospermium</i>	6,77	<i>Penicillium puberulum</i>	6,62	
	<i>Mucor hiemalis</i>	4,87	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,46	
	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	6,86	Meio de Czapek-Dox	6,26	

OP92 = Amostras isoladas da Igreja São Francisco de Assis, em Ouro Preto

CO92 = Amostras isoladas da Igreja Bom Jesus de Matosinhos, em Congonhas

CA92 = Amostras isoladas da Igreja Nossa Senhora Mãe dos Homens, no Caraça

\* Culturas a 28°C por 14 dias, em meio líquido de Czapek-Dox contendo 3% de glicose

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLSOPP, D.; SEAL, K.J. **Introduction to Biodeterioration**. London: Edward Arnold, 1986. 136p.
- ARRIETA, L.; GREZ, R. Solubilization of iron-containing minerals by soil microorganisms. **Applied Microbiology**, v.22, p.487-490, 1971.
- ASCASO, C.; WIERZCHOS, J. New applications of sbmicroscopic techniques to biodeterioration produced by lichen thalli. **Microbiologia**, v.10, n.1/2, p.103-110, 1994.
- BECKER, T.W.; KRUMBEIN, W.E.; WARSCHIED, T.; RESENDE, M.A. Investigations into Microbiology. In: BIANCHI, H.K., ed. **IDEAS - Investigations into Devices against Environmental Attack on Stones**. Geethacht: GKSS Forsch. Geethacht GmH, Geethacht, 1994. p.147-190.
- BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. Microbial polyssacharides and corrosion. **International Biodeterioration**, v.27, p.95-107, 1991.
- BERTHELIN, J. **Microbial weatheing process**. In: KRUMBEIN, W.E.,ed. London: Blackwell, 1983 p.223-262.
- BOCK, E.; HENGEL, H. Untersuchungen über die postoxidative CO<sub>2</sub>-Fixierung bei Nitrobacter Winogradsky Buch. **Archives of Microbiology**, v.54, p.191-198, 1966.
- BOCK, E.; SAND, W. The microbiology of masonry biodeterioration. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.403-514, 1993.
- BOYLE, J.R., VOIGT, G.K.; SAWHNEY, B.L. Biotite flakes: alteration by chemical biological treatment. **Science**, v.155, p.193-195, 1967.
- BOYLE, J.R., VOIGT, G.K.; SAWHNEY, B.L. Chemical weathering of biotite by organic acids. **Soil Science**, v.117, p.42-45, 1974
- BRAAMS, J. Ecological studies on the fungal microflora inhabiting historical sandstone monuments. Oldemburgo, Universidade de Oldemburgo, 1991, 104p. Dissertação, Doutorado.
- BRAVERY, A.F. Schimmelpilzbefall in Gebäuden. **Holz-Zentralblatt**, v.109. p.587-588, 1983.
- BUNT, J.S.; ROVIRA, A.D. Microbiological studies of some subantarctic soils. **Journal of Soil Sciences**, v.6, p.119-128, 1955.
- DE LA TORRE, M. A.; GOMEZ-ALARCON, G. Manganese and iron oxidation by fungi isolated from building stone. **Microbial Ecology**, v.27, n.2, p.177-188, 1994.
- DEL MONTE, M.; SABBIONI, C. Chemical and biological weathering of an historical building: Reggio Emilia Cathedral. **The Science of the Total Environment**, v.50, p.165-168, 1986.
- DEL MONTE, M., SABBIONI, C.; ZAPPIA, G. The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. **The Science of the Total environment**, v.67, p.17-39, 1987.
- DOMASLOWSKI, W., STRZELCZYK, A. B. Evaluation of applicability of epoxy resins to conservation of stone historic monuments. In: INTERNATIONAL CONGRESS CASE STUDIES IN THE CONSERVATION OF STONE AND WALL PAINTINGS. **Proceedings**, Bolonha, 1986. p.126-132.
- DOMSCH, K.H. Das Pilzspektrum einer Bodenprobe. I. Nachweis der Homogenitat. **Archiv fur Mikrobiologie**, v.35, p.181-185, 1960.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press London, 1980. v.1.
- DUKES, W. H. Conservation of stone: causes of decay. **Architects Journal**, v.156, p.422-429 1972.
- ECKEHARDT, F.E.W. Microorganisms and weathering of a sandstone monument. p.675-686. In: KRUMBEIN, W.E., ed. **Environmental biogeochemistry and geomicrobiology. The terrestrial environment** Michigan: Ann Arbor, 1978. p.675-686.
- ECKEHARDT, F.E.W. Microbial degradation of silicates. The release of cations from aluminosilicate minerals by yeasts and filamentous fungi. In: OXLEY, T.A.; ALLSOPP, D.; BECKER, G. ed. **Biodeterioration**. London, Pitman, 1980. p.107-116.

- ECKEHARDT, F.E.W. **Solubilization, transport, and deposition of mineral cations by microorganisms - efficient rock weathering agents**. In: DREVER, J. I.ed. Dordrecht: Reidel, 1985a. p.161-173.
- ECKEHARDT, F.E.W. Mechanisms of the microbial degradation of minerals in sandstone monument, medieval frescoes, and plaster. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 5., Lausanne, 1985. Proceedings. p.643-652.
- ECKEHARDT, F.E.W. Influence of culture media employed in studying microbial weathering of buildings stones and monuments by heterotrophic bacteria and fungi. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 6., Torun, 1988. **Supplementary Acts**. Torun: Nicolaus Copernicus University, 1988. p.71-81.
- ECKEHARDT, F.E.W. Heterotrophic bacteria - potent allies of the filamentous fungi and yeasts on weathering building stones and monuments. In: SCIENCE, technology and european cultural heritage **Proceedings of the European Symposium**. Bolonha, 1991. p.515-519.
- FOGG, G.E. Extracellular products. In: LEWIN, R.A. ed. **Physiology and biochemistry of algae**. London: Academic Press, 1962. p.475-489.
- FOSTER, J.W. **Chemical activities of fungi**. New York, Academic Press, s.d.
- GOMEZ-ALARCON, G. & DE LA TORRE, M.A. Mechanisms of microbial corrosion on stone. **Microbiologia**, v.10, n.1/2, p.111-120, 1994.
- GORBUSHINA, A.A., KRUMBEIN, W.E., HAMMAN, C.H., PANINA, L., SOUKHARJEVSKI, S. & WOLLENZIEN, U. Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. **Geomicrobiology Journal**, v.11, n.3/4, p.205-221, 1993.
- HENDERSON, M.E.K. & DUFF, R.B. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks, and soils by fungal activity. **Journal of Soil Science**, v.14, p.236-246, 1963.
- HUECK VAN DER PLAS, E.H. The microbial deterioration of porous building materials. **International Biodeterioration Bulletin**, v.4, p.11-28, 1968.
- IONITA, I. Contributions to the study of the biodeterioration of the work of art and historic monuments. III. Species of fungi isolated from stone monuments. **Review Roumanian of Biology and Botany**, v.16, p.433-436, 1971.
- IONITA, I. Contributions to the study of the biodeterioration of the works of art and historical monuments. IV. Fungi involved in the deterioration of mural paintings from the monasteries of Moldavia. **Review Roumanian of Biology and Botany**, v.18, p.179-189, 1973.
- JACKS, G.V. Organic weathering. **Science Progress**, v.41, p.301-305, 1953.
- JONES, D.; WILSON, M.J. Biomineralization in crustose lichens. p.91-105. In: LEADBEATER, B.S.C.; RIDIND, R., ed. **Biomineralization in lower plants and animals**. Oxford: Clarendon Press, 1986.
- JONES, D., WILSON, M.J.; MCHARDY, W.J. Lichen weathering of rock-forming minerals: application of scanning electro microscopy and microprobe analysis. **Journal of Microscopy**, v.124, p.95-104, 1981.
- JORGENSEN, E.G. Antibiotic substances from cells and culture solutions of unicellular algae with special reference to some chlorophyll derivatives. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.530-544, 1962.
- KIEL, H.; SCHWARTZ, W. Leaching of a silicate and carbonate copper with heterotrophic fungi and bacteria, rproducing organic acids. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, v.20, p.627-636, 1980.
- KOESTLER, R.J., CHAROLA, A.E., WYPYSKI, M.; LEE, J.J. Microbiologically induced deterioration of dolomitic and calcitic stone as viewed by scanning electro microscopy. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 5, Lausanne, 1985. **Proceedings**. Lausanne, 1985, p.617-626.
- KOESTLER, R.J., SANTORO, E.D., DRUZIC, J., PREUSSER, F., KOEPP, L.; DERRICK, M. Status report: ongoing studies of the susceptibility to stone consolidants to microbiologically induced deterioration. In: HOUGHTON, D.R.; SMITH, R.N.; EGGINS, H.O., ed., **Biodeterioration**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 441-448.
- KRASILNIKOV, N.A. Role of microorganisms in the weathering of rocks. **Microbiology**, v.18, p.318-323, 1949

- KRUMBEIN, W.E. Zur Frage der Gesteinverwitterung (Über geochemische und mikrobiologische Bereiche der exogenen Dynamik). Oldenburg: Universidade de Oldenburg, 1966.
- KRUMBEIN, W.E. Zur Frage der biologischen Verwitterung: Einfluß der Mikroflora auf die Bausteinverwitterung und ihre Abhängigkeit von edaphischen Faktoren. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, 8, p.107-117, 1968.
- KRUMBEIN, W.E. Role des microorganismes dans la genese, diagenese et la deterioration des roches en place. **Revue de Ecologie et Biologie de Sole**, v.3, p.283-319, 1972.
- KRUMBEIN, W.E. Damage caused by cyanobacteria and fungi in plasters and casting covering medieval frescos North German rural churches. **GP News Letter**, v.4, p.27-29, 1983.
- KRUMBEIN, W.E. Denkmalpflege und Konservierung in Einblicke. **Forschung an der Universität Oldenburg**, v.5, p.4-9, 1987.
- KRUMBEIN, W.E. Microbial interactions with mineral materials. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N.; eggins, H.O.W. ed. **Biodeterioration**. 7.ed. London: Elsevier Applied Science, 1988a. p.78-100.
- KRUMBEIN, W.E. Biotransfer in monuments - a sociobiological study **Durability of Building Materials**, v.5, p.359-382, 1988b.
- KRUMBEIN, W.E.; DYER, B.D. The planet is alive. Weathering and biology, a multi-facetted problem. In: drever, J.J.; Reidel, D., ed. **The chemistry of weathering**. Dordrecht: J.J. Drever & D. Reidel, 1985. p.143-160.
- KRUMBEIN, W.E.; JENS, K. Biogenic rock varnishes of the Negev desert (Israel) an ecological study of iron and manganese transformation by cyanobacteria and fungi. **Oecologia**, v.50, p.25-38, 1981
- KRUMBEIN, W.E.; LANGE, C. Decay of plaster, painting and wall material of the interior of buildings via microbial activity. In: krumbein, W.E. ed. **Environmental biogeochemistry and geomicrobiology: the terrestrial environment**. Michigan: Ann. Arbor Science Publ., 1978. p.687-697.
- KRUMBEIN, W.E.; PETERSEN, K.; SCHELLNHUBER, H.J. On the geomicrobiology of yellow, orange, red brown and black films and crusters developing on several different types of stone and objects of art. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM THE OXALATE FILMS: origin and significance in the conservation of works of art, Milão, 1989. **Proceedings**, Milão, 1989. p.337-347.
- KRUMBEIN, W.E.; SCHÖNBORN-KRUMBEIN, C.E. Biogene Bauschäden-Anamnese, Diagnose und Therapie in Bautenschutz und Denkmalpflege. **Bautenschutz/Bausanierung**, v.10, p.14-23, 1987.
- KRUMBEIN, W.E.; URZI, C.E.; GEHRMANN, C. On the biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass. **Geomicrobiology Journal**, v.9, p.139-160, 1991
- KRÜMMEL, A. Dissertação de Doutorado, Universidade de Hamburgo, 1978.
- KUROCZIN, BODE, K., PETERSEN, K., KRUMBEIN, W.E. Some physiological characteristics of fungi isolated from sandstones. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 6, Torun, 1988. **Supplementary. Acts**. Torun: Ed. Nicolaus Copernicus Univ. 1988. p.21-25.
- KUTUZOVA, R.S. Possible ways of mineral weathering in alkaline soils. **Soviet Soil Science**, 5, p.111-116, 1973.
- KÜSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v.202, p.928-929, 1964.
- LEWIS, F.J.; MAY, E., BRAVERY, A.F. Metabolic activities of bacteria isolated from building stone and their relationship to stone decay. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N. EGGINS, W.O.W., ed. **Biodeterioration**, ed. London: Elsevier Applied Science. 1988. p.107-112.
- LEZNICKA, S., KUROCZKIN, KRUMBEIN, W.E., STRZELCZYK, A.B.; PETERSEN, K. Studies on the growth of selected fungal strains on limestones impregnated with siliconeresins (Steinfestiger H and Elastosil E-41). **International Biodeterioration**, v.28, p.91-111, 1991.
- LINDLEY, N.D., PEDLEY, J.F., KAY, S.P.; HEYDEMAN, M.T. The metabolism of yeasts and filamentous fungi which degrade hydrocarbon fuels. **International Biodeterioration**, v.22, p.281-287, 1986.
- LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.



- MARCHESINI, L.; BONORA, R. The use of silicon resin in the conservation and protection of of stone. In: LAZZARINI, L.; PIEPER, R., ed **The deterioration and conservation of stone. Studies and documents on the cultural heritage**.Veneza: Unesco, 1987. p.317-328.
- MASON-WILLIAMS, M.A. The growth of fungi in caves in Great Britain. **Studies in Speleology**, v.1, p.96-99, 1965.
- MAY, E., LEWIS, F.J., PEREIRA, S., TAYLER, S., SEAWARD, M.R.D.; ALLSOPP, D. Microbial deterioration of building stone - a review. **Biodeterioration Abstracts**, v.7, n.2, p.109-123, 1993.
- MILLER, J.D.A.; KING, R.A. Biodeterioration of metals. In: GILBERT, R.J.; LOVELOCK, D.W. **Microbial aspects of the deterioration of materials**. London: Academic Press, 1975. p.84-103.
- PALMER, R.J. Microbial communities involved in the weathering of three historic buildings in northern Germany. In: SCIENCE, technology and european cultural heritage **Proceedings of the European Symposium**, Bolonha, 1989, p.478-480.
- PARBERRY, D.G. Isolation techniques and identification of fungal biodeteriogens from soil. In: Walters; A.H., ed **Biodeterioration investigation techniques**. London: Applied Science, 1977. p 123-148.
- PETERSEN, K., KUROCZKIN, J., STRZELCZYK, A.B.; KRUMBEIN, W.E. Distribution and effects of fungi on and sandstones. In: houghton, D.R., SMITH, R.N.; EGGINS, H.O.W., EDS. **Biodeterioration**. 7.ed. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.123-128.
- POCHON, J.; JATON, C. The role of microbial agencies in the deterioration of stone. **Chemistry and Industry**, v.9, p.1587-1589, 1967.
- RESENDE, M.A.; LEITE, C.A.; WARSCHIED, T.; BECKER, T.W.; KRUMBEIN, W.E. In: LATORRE, W.C.; GAYLARDE, C., ed. Microbiological investigations on quartzite and soapstone of historical monuments in Minas Gerais, Brazil **Anais do First LABS Latin American Biodeterioration Symposium**. Campos do Jordão, 1992. p.17-22.
- RESENDE, M.A., REZENDE, G.C., VIANA, E.M., BECKER, T.W.; WARSCHIED, T. Acid production of fungi isolated from stones of historical monuments so State of Minas Gerais Brazil. In: LABS 2 -Second Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium, **Abstracts Book**. Gramado, 1995. p.28.
- RIPPKA, R.; DERULLES, J., WATRERBURY, J.B., HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignment, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v.111, p.1-61, 1979.
- ROSSI-MANARESI, R.; TUCCI, A. Pore structure and the disruptive or cementing effect of salt crystallization in various types of stone **Studies in Conservation**. v. 36, p.53-58, 1991
- SAIZ-GIMENEZ, C. Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. In: LLEWELLYN, G.C.; DASHEK, W.V.; OREAR, C.E., ed. **Fourth Meeting of the Pan American Biodeterioration Society**. New York: Plenum Press, 1991. 686p. p.587-604.
- SAVORY, J.G. Breakdown of timber by Ascomycetes and Fungi Imperfecti. **Annals of Applied Biology**, v.41, p.336-347, 1954.
- SAVULESCU, A.; IONITA, J. Contributions to the study of the biodeterioration of the works of art and historic monuments. I. Species of fungi isolated from frescoes **Review Roumanne of Biology and Botany**, v.16, p.201-206, 1971.
- SCHARTZ, A. Soil microorganisms and soil chelation. The pedogenic action of lichens and lichen acids. **Agricultural and Food Chemistry**, v.11, p.112-118, 1963.
- SCHARTZ, A., SCHARTZ, V.; MARTIN, J.J. Chelation as a biochemical weathering factor. **Geological Society of America Bulletin**, v.68, p.1792-1793.
- SILVERMAN, M.P. Biological and organic chemical decomposition of silicates. In: TRUDINGER, P.A.; SWAINE, D.J., ed. **Studies in environmental science**. New York: Elsevier, 1979. p.444-465.
- SILVERMAN, M.P.; EHRlich, H.L. Microbial formation and degradation of minerals. **Advances in Applied Microbiology**, v.6, p.152-206, 1964.
- SILVERMAN, M.P.; MUNOZ, E. F. Fungal attack on rock: solubilization and altered infrared spectra. **Science**, v.169, p.985-987, 1970.

- STEVENSON, F.J. Organic acids in soil. In: McLAREN, A.D.; PETERSON, G.H., ed. **Soil Biochemistry 1**. Marcel Dekker, 1967. p.119-146.
- STOTZKY, G. Techniques to study interactions between microorganisms and clay minerals in vivo and in vitro. **Bulletins from the Ecological Research Committee**, v.17, p.17-28, 1973.
- STRZELCZYK, A.B. Influence of antifungal vapors on spore germination of fungi isolated from deteriorated old books. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, p.901-906, 1968.
- STRZELCZYK, A.B. Microbial Biodeterioration: Stone. In: ROSE, A. H., ed. **Economic microbiology**. London: Academic Press, 1981. p.61-80.
- UPSHER, F.J. Microbial attack on materials. In: **Proceedings of Royal Australian Chemical Institute**. v.43, p.173-176, 1976.
- URZI, C.E., KRUMBEIN, W.E.; WARSCHIED, T. On the question of biogenic colour changes of mediterranean monuments (coating - crust - microstomatolite - patina - scialbatura-skin - rock varnish). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MONUMENTS IN THE MEDITERRANEAN BASIN, 2., Geneva. 1991. **Proceedings**, Geneva, 1991, p.397-420.
- VON PLEHWE-LEISEN, E., WENDLER, E., SNETHLAGE, R., KLEMM, D., CASTELLO BRANCO, E. SANTOS, A.F. Summary of the interdisciplinary results of the working groups. In: BIANCHI, H. K. **IDEAS - Investigations into Devices against Environmental Attack on Stones**. Geesthacht: GKSS Forsch Geesthacht GmbH.1994. p.17-42.
- WAINWRIGHT, M. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil - a review. **Transactions of the British Mycology Society**, v.90, p.159-170, 1988.
- WARSCHIED, T. Untersuchungen zur Biodeterioration von Sandstein unter Besondere Berücksichtigung der Chemoorganotrophen Bakterien. Oldenburg: Universidade de Oldenburg. 1990. Tese, Doutorado.
- WARSCHIED, T.; BECKER, T.W.; RESENDE, M.A. Biodeterioration of stone: a comparison between (sub-)tropical and moderate climate zones. In: LABS 2- Second Latin American biodegradation and Biodeterioration Symposium. **Abstracts Book**. Gramado, 1995, p.31
- WARSCHIED, T.; OELTING, M.; KRUMBEIN, W.E. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. **International Biodeterioration**, v.28, p.37-48.
- WARSCHIED, T.; PETERSEN, K., KRUMBEIN, W.E. Physiological characterization of chemoorganotrophic bacteria isolated from sandstone. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 6., Torun, 1988. **Supplementary, Acts**. Torun: Nicolaus Copernicus Univ. 1988, p.26-32.
- WARSCHIED, T.; PETERSEN, K.; KRUMBEIN, W.E. A rapid method to demonstrate and evaluate microbial activity on decaying sandstone. **Studies in Conservation**, v.35, p.137-147, 1990.
- WATCHMAN, A.L. Age and composition of oxalate-rich crusts in the northern territory, Australia. **Studies in Conservation**, v.36, p.24-32, 1991
- WAZNY, J. The influence of rock-destroying fungi on concrete. In: OXLEY, T.A., ALLSOPP, D.; BECKER, G. ed. **Biodeterioration**. London: Pitman, 1980. p.59-62.
- WEBLEY, D.M.; HENDERSON, M.E.L.; TAYLOR, I.F. The microbiology of rocks and weathered stones. **Journal of Soil Science**, v.14, p.102-112, 1963.
- WILLIAMS, M.E.; RUDOLPH, E.D. The role of lichens and associated fungi in the chemical weathering of rock. **Mycologia**, v.66, p.648-660, 1974.
- WITTENBURG, C. Trockene Schadgas und Partikeleposition auf verschiedenen Sandsteinvarietäten unter besonderer Berücksichtigung atmosphärischer Einflüsse. Schriftenreihe Angewandte analytische Chemie. n.22.Hamburg: Universidade de Hamburg, 1994. Tese, Doutorado.
- WOOD, P.A.; MACRAE, I.C. Microbial activity in sandstone deterioration. **International Biodeterioration Bulletin**, v.8, p.25-27, 1972.

# 16

## MICROORGANISMOS INDICADORES DE POLUIÇÃO AMBIENTAL

Tânia Maria Araujo Domingues Zucchi  
Lídia Terêsa de Abreu Pires

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo, Cidade Universitária  
Caixa Postal 66208, CEP 05508-900, São Paulo, SP

### I. INTRODUÇÃO

São muitos e contínuos os desafios que o ambiente promove à estabilidade da informação genética.

Desde a metade da década de 40 sabe-se que agentes químicos e físicos podem induzir mutações hereditárias, mas foi só nos anos 60 que se relacionou a ação letal das radiações e dos agentes químicos com danos no material genético. Foi também nessa década que começaram a aparecer os primeiros relatos dos efeitos deletérios, devido ao uso crescente de produtos químicos, especialmente pesticidas, relacionando-os ao câncer e à mutação (Waters *et al.*, 1994).

Atualmente, com todos os avanços tecnológicos, tem aumentado muito o número de poluentes ambientais que causam prejuízos à qualidade de vida, e isso, por sua vez, tem estimulado na mesma proporção a necessidade de se avaliar o potencial genotóxico de cada um deles. A consciência sobre a importância dos efeitos desses poluentes ambientais tem levado a um esforço na prevenção da exposição àqueles potencialmente tóxicos, cujos danos incluem uma extensa variedade de alterações genéticas.

Um primeiro passo no uso racional de agentes genotóxicos é a caracterização dos danos causados por eles, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Para isso, mais de 200 "short-term tests" foram desenvolvidos e têm sido utilizados para se determinar carcinogenicidade ou mutagenicidade induzidas por aditivos alimentares, pesticidas, drogas, cosméticos, poluentes etc. Esse será, então, o assunto principal deste capítulo.

## II. TIPOS DE DANOS CAUSADOS POR AGENTES GENOTÓXICOS

Dentre as alterações causadas pelos agentes genotóxicos, físicos ou químicos, estão a mutação, aumento da frequência de recombinação mitótica, amplificação gênica, quebras na dupla-fita de DNA, quebras em fita simples do DNA, ligações extras entre as bases de uma das cadeias de DNA (como dímeros de pirimidina), aberrações cromossômicas, alquilações, ligações cruzadas, desaminações etc. (Bohr *et al.*, 1987).

### II. 1. Mutação

A mutação é a fonte básica de toda variabilidade genética; ela fornece a matéria-prima para a evolução. Historicamente, o termo mutação refere-se a qualquer modificação súbita e hereditária no genótipo de um organismo, não explicável pela recombinação da informação genética preexistente. Hoje, o termo mutação é usado em um sentido mais restrito para se referir apenas às modificações nos genes individuais e que, segundo Radman *et al.* (1980), é a resposta celular aos estímulos do meio ambiente, caracterizando uma modificação adaptativa. Estruturalmente, mutação de ponto pode ser consequência da substituição de um dos pares de bases da cadeia polinucleotídica ou pode ser causada por adição ou perda de um ou de alguns pares de bases (Henriques & Querol, 1987; Gardner & Snustad, 1986).

Mutações podem ser espontâneas, resultantes de um baixo nível de erros metabólicos, isto é, de erros durante a replicação do DNA, ou podem ser causadas por agentes mutagênicos presentes no ambiente. As mutações espontâneas ocorrem raramente, embora as frequências observadas variem de gene para gene e de organismo para organismo. As medidas das frequências de mutação espontânea para vários genes de fago e de bactéria variam de  $10^{-8}$  a  $10^{-10}$  mutações detectáveis por par de nucleotídeo, por geração, aproximadamente. Para eucariotos, as estimativas das taxas de mutação variam de aproximadamente  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  mutações detectáveis por par de nucleotídeo, por geração. O tratamento com agentes mutagênicos pode aumentar a frequência de mutações em várias ordens de magnitude e estas são designadas de mutações induzidas.

Geralmente, as mutações causam alguma modificação fenotípica que torna sua presença reconhecida. Os efeitos das mutações no fenótipo variam desde pequenas alterações detectáveis apenas por técnicas genéticas ou bioquímicas, passando por modificações grosseiras na morfologia, até as letais. Elas podem ser recessivas ou dominantes. Em organismos haplóides, esses dois tipos de mutações podem ser reconhecidos por

seus efeitos no fenótipo do organismo, no qual elas se originaram. Nos organismos diplóides as mutações recessivas só serão reconhecidas quando estiverem presentes na condição homocigota. A maioria das mutações recessivas, em diplóides, não será reconhecida na época de sua ocorrência, uma vez que estão presentes no estado heterocigoto.

### Uma Base Molecular para as Mutações

A estrutura das bases no DNA não é estática, podendo os átomos de hidrogênio mover-se de uma posição para outra, tanto nas purinas como nas pirimidinas. Embora esses deslocamentos sejam raros, podem ser de considerável importância no metabolismo do DNA, uma vez que alteram o potencial de pareamento das bases. Assim, os átomos de hidrogênio (H) dos núcleos das purinas e pirimidinas, que estão normalmente na forma amino ( $\text{NH}_2$ ), em condições raras podem deslocar-se para a forma tautomérica imina ( $=\text{NH}$ ). O mesmo ocorre com o oxigênio localizado no átomo de  $\text{C}_6$  da guanina ou timina, que pode ter a sua forma usual ceto ( $\text{C}=\text{O}$ ) modificada para a configuração rara enol ( $=\text{C}-\text{OH}$ ).

Em suas formas de bases mais estáveis, o pareamento sempre é A-T e C-G. Mas, se a base estiver em sua forma rara no momento da replicação, pode ocorrer uma mutação, já que em suas formas raras formam-se os pares anormais A-C através de duas pontes de hidrogênio, e T-G, através de três pontes de hidrogênio.

Então, modificações tautoméricas nas bases do DNA resultam em mutações pela substituição de uma purina em uma fita polinucleotídica do DNA por outra purina, ou a substituição de uma pirimidina por outra pirimidina. Essas substituições de pares de bases são chamadas transições.

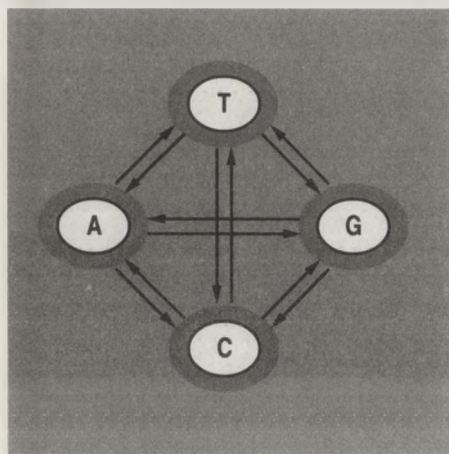


FIGURA 1. Diagrama ilustrando as possíveis substituições de bases do DNA.

As substituições de pares de bases, envolvendo a substituição de uma purina por outra pirimidina e vice-versa, são chamadas de transições (Fig. 1). Um terceiro tipo de mutação de ponto envolve a adição ou a perda de um ou de alguns pares de bases; estas são referidas coletivamente como mutações que modificam o quadro de leitura (mutação "frame-shift"), porque elas alteram a estrutura de leitura de todas as trincas de pares de bases no gene, situadas além da mutação (Fig. 2).

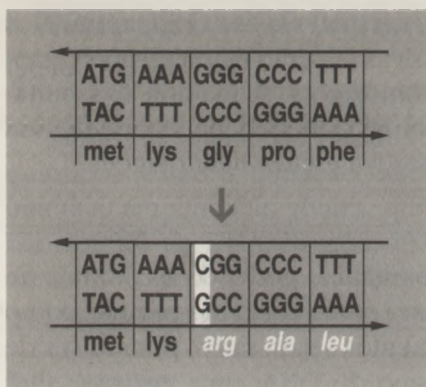


FIGURA 2. Diagrama de mutação que altera a estrutura de leitura.

Transições e transversões podem ocorrer também ao longo da duplicação semi-conservativa e durante o processo de reparação do DNA.

## II. 2. Recombinação Mitótica

Outra alteração do material genético é a indução de “crossing-over” mitótico. Este nada mais é do que a troca física de segmentos entre cromátides-irmãs, que pode levar à homozigose de genes recessivos, em diplóides anteriormente heterozigotos (Ferguson, 1990; Roeder & Stewart, 1988; Orr-Weaver & Szostak, 1985; Fabre & Roman, 1987). Isso está, direta ou indiretamente, ligado aos processos de transformação celular (Marx, 1982). De fato, uma grande proporção de cânceres humanos tem sido relacionada à exposição aos agentes tóxicos ambientais, que podem induzir o crossing-over mitótico (Moraga & Graf, 1989; Wang *et al.*, 1988; Roeder & Stewart, 1988; Kunz & Haynes, 1981; Cairns, 1981; Zimmerman *et al.*, 1966). É sabido que diferentes populações tendem a sofrer diferentes tipos de cânceres devido a seus hábitos alimentares, aos ambientes e aos diferentes “backgrounds” genéticos. A recombinação mitótica seria induzida por lesões no DNA, promovidas pelos agentes genotóxicos.

## II. 3. Dímeros e Hidratos de Pirimidina

Dímeros de pirimidina são as ligações timina-timina, citosina-timina ou citosina-citosina, na mesma fita de DNA. Esse tipo de dano bloqueia a alongação das fitas-filhas durante a replicação do DNA, além de alterar a estrutura do DNA (Fig. 3A e 3B).

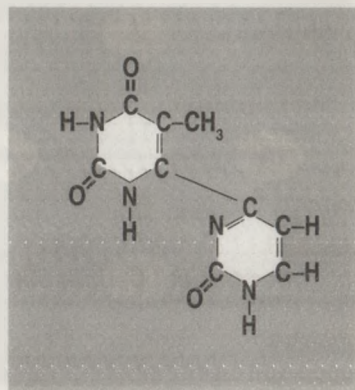


FIGURA 3A. Dímero de pirimidina com formação de aduto.

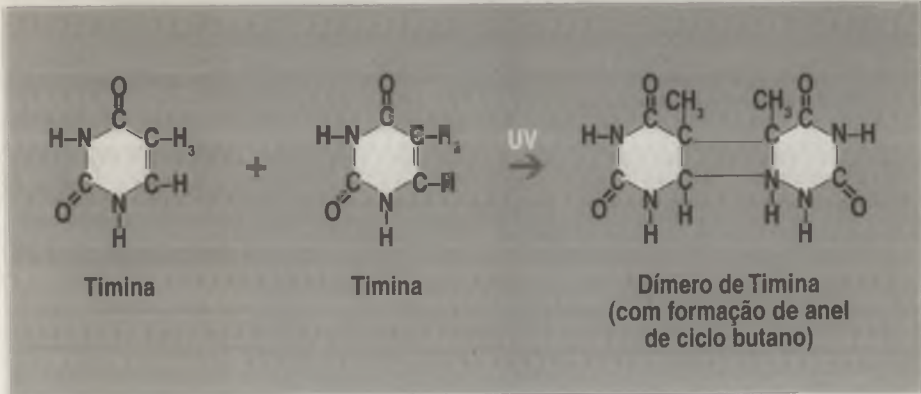


FIGURA 3B. Ligação cruzada de moléculas de Timina adjacentes formando os dímeros de pirimidina.

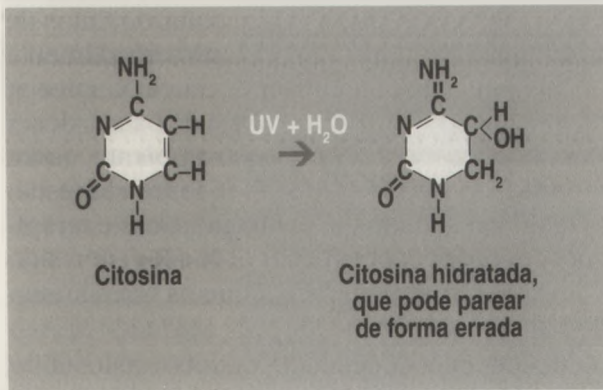


FIGURA 4. Formação de hidratos de pirimidina.

Hidratos de pirimidina se devem à entrada de um grupamento hidroxila e um hidrogênio, após o desaparecimento da ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 das pirimidinas. Estes também têm propriedades de pareamento alteradas (Fig. 4) (Scaria & Edenberg, 1988).

## II. 4. Quebras e Aberrações Cromossômicas

Quebras na dupla-fita de DNA são interrupções em ambas as fitas do DNA e podem resultar na formação de aberrações cromossômicas, que também estão intimamente relacionadas à carcinogênese. As aberrações cromossômicas seriam formadas pela união de uma extremidade quebrada de um cromossomo com outra extremidade quebrada qualquer, do mesmo ou de outro cromossomo. No processo pode haver perda ou adição de um segmento cromossômico (Nicotera *et al.*, 1982; Obe *et al.*, 1982).

## II. 5. Outros Danos

Na deleção, partes cromossômicas seriam perdidas de modo terminal ou intercalar. Nas duplicações, parte de um cromossomo seria duplicada e adicionada a esse mesmo ou a outro cromossomo. Inversões ocorreriam quando um fragmento de um cromossomo é separado, gira 180° e é reinserido de tal maneira que os genes fiquem em ordem inversa. Translocações ocorreriam, quando partes de cromossomos, que foram separadas, ligam-se a cromossomos não-homólogos.

## III. AGENTES GENOTÓXICOS

### III. 1. Agentes Físicos

A porção do espectro eletromagnético, que contém comprimentos de onda menores e de maior energia que a luz visível (aproximadamente 0,1 mm), pode ser subdividida em radiação ionizante (raios X, raios  $\gamma$ , raios cósmicos) e radiação não-ionizante (luz UV). Fontes de baixas doses de radiação ionizante são quase onipresentes em nosso ambiente, assim como as radiações não-ionizantes (Schiestel *et al.*, 1994). Entre elas estão as explosões nucleares, os acidentes radiativos, os diagnósticos e terapias, exposição ocupacional, etc. A radiação ionizante (R-X e R- $\gamma$ ) tem sido considerada como o mutagênico e o carcinogênico a que os seres humanos estão mais freqüentemente expostos.

#### III. 1. 1. Radiação não-ionizante

Os raios UV não possuem energia suficiente para penetrar nos tecidos mais profundos dos organismos multicelulares, não atingindo, portanto, suas células germinativas. Desse modo, a exposição à luz UV constitui um fator de risco somente para a pele, nesses organismos. No entanto, é um potente mutagênico para organismos unicelulares. Por possuírem baixa energia, também não causam ionização, mas são rapidamente absorvidos por certas moléculas, como purinas e pirimidinas do DNA, que se tornam mais reativas. A absorção máxima da luz UV pelo DNA ocorre em 254 nm, sugerindo que o processo de mutação induzida por UV é mediado pela absorção direta da luz UV pelas purinas e pirimidinas, levando à formação dos dímeros e os hidratos de pirimidinas. A dimerização da timina tem sido considerada como o principal efeito mutagênico da luz UV (Figs. 3A e 3B).

Além desses danos mais comumente induzidos, a luz ultra-violeta promove ainda vários outros efeitos nas células como morte, mutação, oxidação, não-disjunção mitótica, recombinação mitótica, ativação de



transposons e de vírus latentes etc. (Pires & Zucchi, 1994; Brunet & Giacomini, 1989; Käfer *et al.*, 1982). Atualmente, com o aumento do buraco de ozônio e a maior incidência de UVB sobre a Terra, espera-se ativação de transposons, cuja mobilização geraria uma aceleração no processo de produção de novos alelos, alguns dos quais afetariam o "fitness" do indivíduo e/ou de sua progênie (Walbot, 1992).

### III. 1. 2. Radiação ionizante

As radiações ionizantes, tais como os Raios X (de 0,1 a 1,0 nm aproximadamente), têm muita energia e são úteis para o diagnóstico médico, já que podem penetrar nos tecidos vivos. Durante esse processo, esses raios colidem com átomos, liberam elétrons e causam a formação de radicais livres positivamente carregados e íons. Esses íons, por sua vez, colidem com outras moléculas, provocando a liberação de outros elétrons. O resultado é a formação de uma "trilha" de íons ao longo do caminho de cada raio de alta energia, ao atravessar o tecido vivo. Nessa passagem (Hutchinson, 1985) ela provoca vários tipos de lesões no DNA, podendo a sua ação ser direta ou indireta (Sasaki & Matsubara, 1977). A maior parte de seus efeitos sobre o DNA se dá de maneira indireta. Dentre os efeitos diretos da radiação ionizante sobre o genoma, estão a indução de recombinação mitótica, quebras na dupla fita de DNA etc. (Obe *et al.*, 1977). Os efeitos indiretos se devem à ação dos radicais formados livres que, sendo altamente reativos, são responsáveis pela maior parte dos danos. Quebras na dupla fita de DNA são o principal tipo de lesão molecular, induzida tanto pela radiação ionizante como pelos radicais livres do oxigênio, que podem culminar na formação de aberrações cromossômicas (Nicotera *et al.*, 1985; Lesko *et al.*, 1980). Mesmo doses tão pequenas quanto 1 cGy de exposição ocupacional à radiação ionizante oferecem riscos, pois essas doses causam aumento na frequência de recombinação mitótica (Schiestl *et al.*, 1994). Há uma relação linear entre a taxa de dano e a dose de radiação ionizante e mesmo níveis muito baixos de irradiação por longos períodos (irradiação crônica) são tão efetivos na indução de mutações quanto a mesma dose total, administrada num curto período (irradiação aguda).

A tensão de oxigênio e a temperatura alteram significativamente a frequência de mutações induzidas pelas radiações ionizantes. Quanto maior a tensão de  $O_2$ , maior a indução de mutação. Os agentes ambientais que protegem as células germinativas dos danos das radiações ionizantes, freqüentemente o fazem através da diminuição da concentração de  $O_2$ . Substâncias químicas que têm essa mesma gama de efeitos são chamadas substâncias radiomiméticas. Como exemplo podemos citar os antibióticos bleomicina e estreptomicina (Mirzayans *et al.*, 1988).

### III. 2. Agentes Químicos

Agentes químicos têm grande participação na vida moderna. Infelizmente, muitos deles acarretam efeitos deletérios ao genoma, como recombinação mitótica, não-disjunção mitótica, aneuploidia, mutação etc. (Käfer *et al.*, 1982).

Dentre os agentes químicos genotóxicos classificados como mutagênicos ambientais estão certos pesticidas e estes merecem atenção especial. Como eles persistem no solo, nos vegetais, nos tecidos de animais e contaminam suprimentos de água (Hardaway & Yalkowsky, 1991; Alva & Singh, 1990; Miles, 1990), passam a fazer parte do próprio ambiente, constituindo-se numa fonte contínua de envenenamento para o homem e produzindo os mais variados efeitos genotóxicos (Hardaway & Yalkowsky, 1991; Wild, 1975; Georgian, 1975).

Os conservantes de alimentos são outros agentes químicos que fazem parte da vida moderna, alguns dos quais são carcinogênicos. Assim, como parece impossível viver longe de qualquer desses agentes potencialmente genotóxicos, é imperativo o conhecimento de seu real efeito sobre os seres vivos, para que possamos tomar atitudes mais racionais em relação à preservação do ambiente e manutenção de vida saudável.

Os agentes químicos genotóxicos, em sua grande maioria, o são por serem mutagênicos. Conhecem-se centenas de agentes químicos. Têm desde o mais leve até o mais forte efeito genotóxico. Geralmente, os agentes químicos genotóxicos são divididos em classes, conforme o tipo de efeito que produzem.

O uso desordenado de muitos desses agentes químicos tem causado problemas, os quais estão longe de suas soluções definitivas. Por exemplo, existem populações de camundongos em muitas cidades, que se tornaram resistentes ao anticoagulante, que vinha sendo usado tradicionalmente como veneno para roedores. Populações de baratas tornaram-se insensíveis ao clordane, o veneno de uso comum na década de 50 para controlá-las. Populações de moscas domésticas freqüentemente apresentam altos níveis de resistência a inseticidas semelhantes ao DDT. Cada vez mais microrganismos patogênicos estão se tornando resistentes aos antibióticos desenvolvidos para controlá-los, tais como a penicilina e a estreptomicina. Nos últimos 20 anos, tanto a quantidade como a qualidade do espermatozóide de mamíferos vêm diminuindo drasticamente (2,1% ao ano), além do aumento na incidência de câncer nos testículos e de anormalidades na uretra e nos testículos. Tais efeitos têm sido atribuídos às drogas ditas estrogênicas ou antiandrogênicas, as quais atualmente fazem parte do meio ambiente. Dentre as drogas que possuem tais propriedades estão: ftalatos (os quais são adicionados aos plás-

ticos para aumentar a flexibilidade), cosméticos, pesticidas organoclorados etc. Tais drogas estão de tal maneira entranhadas no ambiente, que rios têm sido considerados estrogênicos, capazes, inclusive, de causar feminilização de peixes (Lutz, 1996).

Esses pesticidas e antibióticos produziram um ambiente novo para os organismos que, por sua vez, responderam, evoluindo para formas resistentes a esses produtos químicos. Ocorreram mutações, que produziram resistência a esses pesticidas e antibióticos, e os organismos mutantes tiveram uma grande vantagem seletiva no ambiente onde esses agentes estavam presentes. Os organismos sensíveis foram eliminados e os mutantes se multiplicaram, produzindo novas populações resistentes. O estresse ambiental não dirigiu ou causou as modificações genéticas; simplesmente selecionou as raras mutações preexistentes, que resultaram em um fenótipo bem mais adaptado ao novo ambiente.

### III. 2. 1. Análogos de bases

Estas substâncias têm estrutura suficientemente similar às bases normais, tanto que são metabolizadas e incorporadas ao DNA, durante a replicação. Mas são suficientemente diferentes para aumentar a frequência de pareamento errado e, portanto, de mutação. Dois exemplos de bases análogas são o 5-bromouracil e a 2-aminopurina. O 5-bromouracil pode parear-se à adenina ou à guanina, conforme sua forma tautomérica e, por isso, é capaz de induzir transições bidirecionalmente (Fig. 5). O

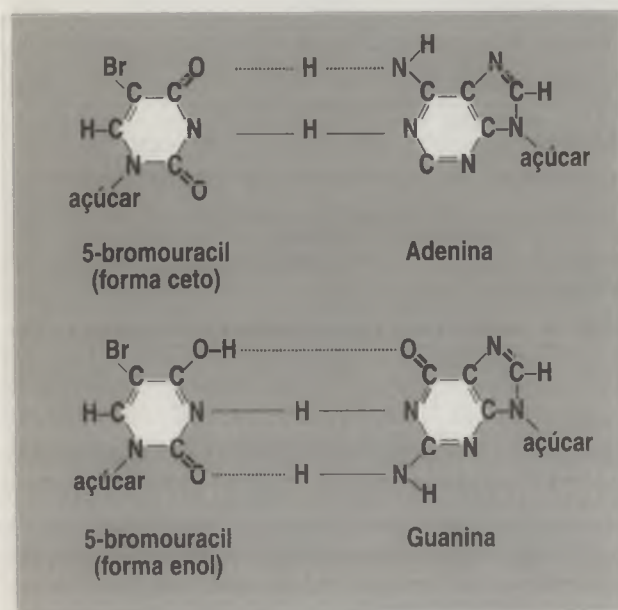


FIGURA 5. Exemplos de pareamento de análogos de bases.

composto 2-aminopurina, análogo da adenina, durante a replicação, pode parear-se com a timina, por duas pontes de hidrogênio, ou pode parear-se erroneamente com a citosina, por meio de uma única ponte de hidrogênio.

### III. 2. 2. Ácido Nitroso

É um mutagênico muito potente, que atua na fase replicativa e não-replicativa do DNA, promovendo desaminação oxidativa das bases adenina, guanina e citosina, que contêm grupamentos amina exocíclicos. A partir da adenina forma-se hipoxantina, da citosina forma-se uracila e da guanina forma-se xantina (Fig. 6). Essas formas desaminadas têm propriedades de pareamento alteradas.

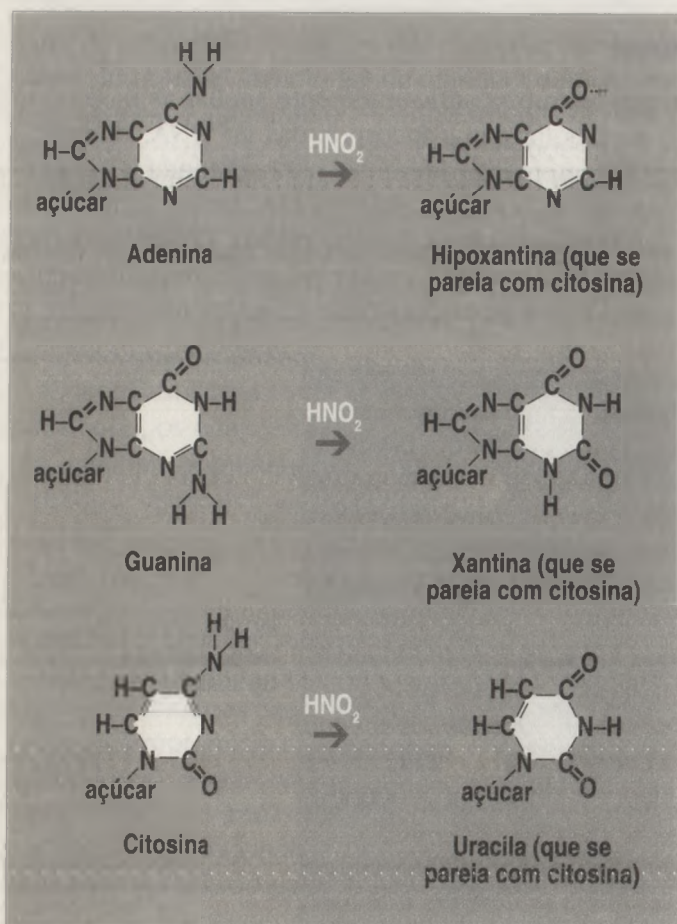


FIGURA 6. Esquema de possíveis desaminações.

### III. 2. 3. Acridinas

São corantes, como proflavina, acridina laranja, ICR-170, ICR-191. São mutagênicos muito poderosos, que induzem mutações que modificam a estrutura de leitura. ICRs são compostos de acridina com várias cadeias laterais, freqüentemente de agentes alquilantes. Acridinas positivamente carregadas se intercalam entre os pares de bases, aumentando a rigidez do DNA e alterando a conformação da dupla-hélice. Quando as moléculas de DNA, contendo acridinas intercaladas, se replicam, ocorrem adições e deleções de um ou mais pares de bases. Isso resulta em mudança de estrutura de leitura na porção do gene, que se segue à mutação.

### III. 2. 4. Agentes alquilantes e hidroxilantes

Agentes alquilantes são compostos eletrofilicos capazes de interagir covalentemente com os centros nucleofílicos no DNA (Henriques & Querol, 1987). Agentes alquilantes, como uma classe, apresentam pouca especificidade em sua genotoxicidade. Induzem todos os tipos de mutações e aberrações cromossômicas. Os compostos alquilantes, que possuem apenas um sítio reativo, são chamados monofuncionais e os que apresentam dois sítios reativos, bifuncionais.

Como exemplos citamos as mostardas, nitrogenada e sulfurada, metanossulfonato de metila e de etila (MMS e EMS), a nitrosoguanidina (NTG) e muitos outros. O principal mecanismo de mutagênese pelos agentes alquilantes envolve a transferência de grupamentos de metila ou etila para as bases, de forma que o pareamento de bases normal é alterado e ocorrem as transições (Walker *et al.*, 1985). Por exemplo, acredita-se que etilação na posição N7 seja um dos efeitos do EMS e que a 7-etilguanina pareia-se com a timina (Fig. 7). Alguns agentes alquilantes, particularmente os bifuncionais (aqueles com 2 grupos álcali reativos), promovem ligações cruzadas nas moléculas de DNA, induzindo as quebras cromossômicas e os vários tipos de aberrações relacionados com as quebras.

Dos agentes alquilantes, que podem produzir ligações cruzadas entre as fitas de DNA, o mais definitivo é a luz UV, seguida de psoralen. Uma molécula de psoralen liga-se a uma base de DNA, formando um monoducto. Numa reação subsequente, o monoducto pode reagir com a cadeia complementar do DNA, formando um diducto, que constitui na ligação cruzada entre as cadeias. Ligações cruzadas também podem ser causadas por mostarda sulfurada e actinomicina C. Esse é o tipo de lesão que observamos na pele, quando da exposição ao sol, após contato com algumas frutas, como limão e figo (Fig. 7).

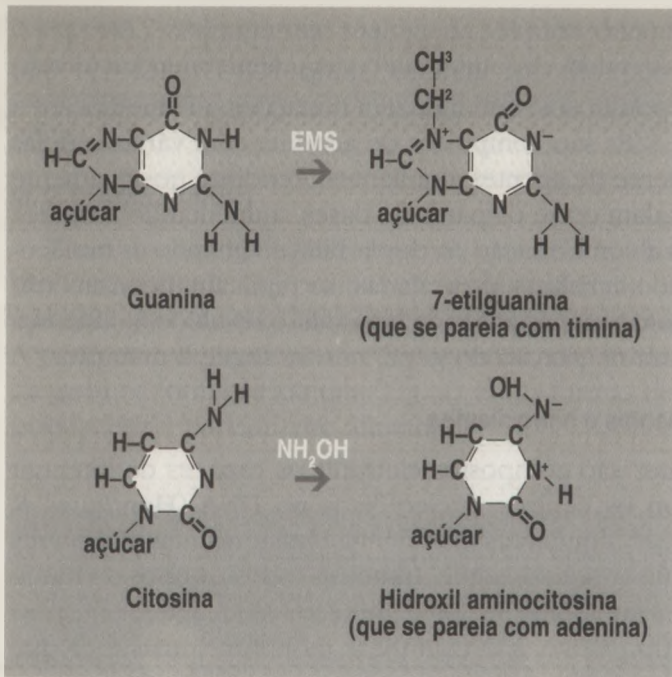


FIGURA 7. Esquema do efeito proposto para agentes alquilantes e hidroxialquilantes.

O agente hidroxilante hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) tem um efeito mutagênico específico. Ele induz apenas transições  $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$ , através da hidroxilação do grupamento amino da citosina. A hidroxilaminocitosina resultante pareia-se com a adenina, produzindo a transição observada.

#### IV. MECANISMOS DE REPARO DO DNA

Além dos danos que surgem por exposição a agentes genotóxicos físicos e/ou químicos, a deterioração espontânea do DNA é grande, ocorrendo perdas de milhares de bases por dia por célula e também desaminações de centenas de resíduos.

Para manutenção da fidelidade estrutural e informacional de seu material genético, os organismos desenvolveram mecanismos complexos de reparo do DNA (Bernstein *et al.*, 1987).

O conceito de reparo do DNA foi formulado na década de 60 e permanece o mesmo até hoje e, segundo esse conceito, o reparo do DNA seria o responsável pela restauração da seqüência nucleotídica normal e estereoquímica do DNA após o dano. Todas as células e organismos possuiriam esses sistemas de reparo, promovendo correções de quaisquer injúrias que surgissem no genoma (Friedberg, 1988).

Os mecanismos de reparo mais simples são aqueles que revertem o dano diretamente, sem causar qualquer outra alteração no DNA; é o caso da fotorreativação e da reação da metil-transferase. Tipo mais complexo de reparo é aquele iniciado pelas DNA-glicosilases, que requer reações subseqüentes para completar o reparo. O mecanismo mais complexo é o reparo por excisão, necessitando, pelo menos, quatro passos enzimáticos. Há também os mecanismos celulares para tolerar danos no DNA, isto é, que ajudam as células a sobreviver com as lesões não removidas. É o caso do reparo pós-replicacional ou reparo recombinacional; os substratos para esse tipo de reparo são os "gaps" formados na fita copiada de fita danificada (Fig. 8). O tipo de reparo a atuar em um determinado dano vai depender justamente do tipo desse dano (Friedberg, 1988).

O genoma de mamíferos não é reparado com igual eficiência em toda a sua extensão, mas regiões ativamente transcritas, ou seqüências essenciais, são prontamente reparadas (Menichini *et al.*, 1991). A máxima eficiência de reparo estaria em concordância com o estado de hipometilação do DNA (Ho *et al.*, 1989). Inúmeras doenças humanas foram relacionadas aos defeitos do reparo do DNA: xeroderma pigmentoso, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, síndrome de Cockayne, ataxia telangiectasia, risco aumentado de câncer etc. (Bohr *et al.*, 1989). Também são os mecanismos de reparo do DNA, que agem preventivamente contra a transformação maligna e contra a deterioração do DNA e também providenciam a proteção necessária contra radiações e mutagênicos químicos.

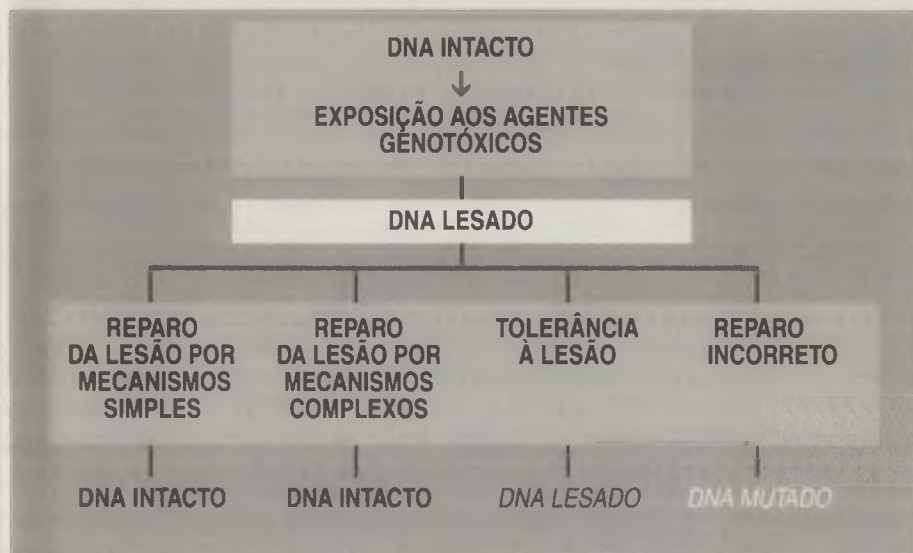


FIGURA 8. Mecanismos de reparo do DNA.

Como as atividades de reparo estão distribuídas universalmente nas células vivas, havendo, inclusive, grande similaridade entre elas em *E. coli* e em mamíferos, presume-se que seu aparecimento se deu muito cedo, durante a evolução.

#### IV. 1. Fotorreativação

É um tipo de reparo relativamente simples, com uma enzima e nenhum passo metabólico. Repara o DNA diretamente, sem síntese de novas pontes fosfodiésteres. A enzima envolvida é a fotoliase, codificada pelo gene *phr* em *E. coli*. Há indicações de dois genes *phr* em *E. coli*, que são os *phr1* e *phr2*. É provável que o *phr1* seja o gene estrutural e que o *phr2* seja o gene regulatório, já que ainda não se isolaram duas fotoliasas diferentes (Yasui *et al.*, 1989).

A fotoliase é uma flavoproteína, que se liga especificamente a dímeros de pirimidina formados no DNA pela exposição à luz ultra-violeta germicida (340-390 nm), catalizando a conversão direta de cada dímero em suas pirimidinas constituintes. Ela age rompendo a ligação ciclobutano entre as duas pirimidinas (Fig. 3B). O passo de ligação da fotoliase com o dímero pode ocorrer no escuro, mas a conversão requer a absorção de um fóton de luz visível (300-400 nm) (Pirsel *et al.*, 1989).

A representação esquemática da fotorreativação está na Fig. 9.

#### IV. 2. Reparação (ou Resposta) Adaptativa

A incubação de células procariotas ou eucariotas com concentrações reduzidas de certos agentes químicos pode torná-las mais resistentes a tratamentos posteriores com concentrações mais elevadas desses mesmos agentes. Isso é explicado pelo acúmulo intracelular de uma ou mais enzimas capazes de eliminar as lesões provocadas pelo tratamento, diminuindo, assim, seus efeitos letais ou mutagênicos (Bohr *et al.*, 1989; Lindahl, 1982).

Em *E. coli* e em algumas outras espécies bacterianas, pelo menos duas enzimas acumulam-se após tratamento indutor, ambas capazes de promover a eliminação de lesões no DNA provocadas por agentes alquilantes e, desse modo, reduzir a inativação celular e a mutagênese produzidas por tais agentes. Uma dessas enzimas é a metiltransferase, que remove grupamentos alquil inseridos na posição O6 da guanina. Tal grupamento alquil é transferido para uma cisteína, provavelmente da própria enzima, o que justificaria a inativação desta durante o processo. Essa enzima é o produto do gene *ada*. A proteína Ada, quando recebe o grupo metil, se tornaria um ativador da transcrição do próprio gene



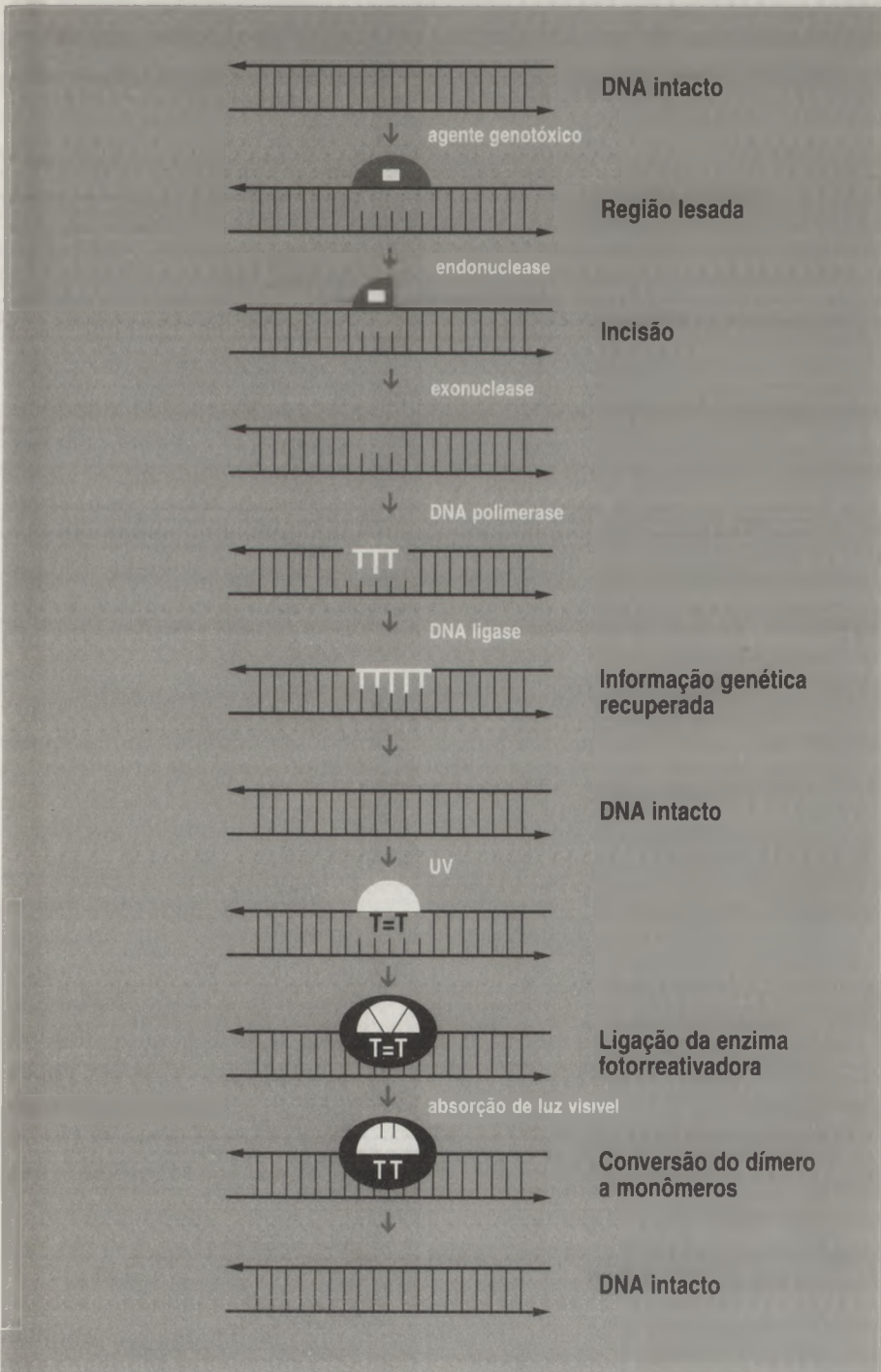


FIGURA 9. Representação esquemática da fotoreativação.

*ada*. Em células de *E. coli* não-adaptadas existem entre 20-60 moléculas da enzima, cuja concentração pode ser multiplicada por 100 ou 200 em consequência do tratamento indutor.

Outra enzima que se acumula em consequência da resposta adaptativa é a 3-metiladenina glicosilase II, que possui diversas formas de atuação, entre as quais a capacidade de promover a eliminação de certas bases nitrogenadas metiladas, como a 3-metiladenina, da cadeia polinucleotídica. Essa enzima é o produto do gene *alkA* e, em células não-adaptadas, atua juntamente com a 3-metiladenina glicosilase I, codificada pelo gene *tag*. Antes do tratamento indutor, a maior parte das bases metiladas é removida pela glicosilase I (num tipo de reparo por excisão, discutido adiante), mas a quantidade desta não se altera durante a adaptação. Em células adaptadas, a quantidade de glicosilase II multiplica-se por 20.

Outros genes também participam da resposta adaptativa, em *E. coli*. O gene *ada* exerce um papel regulador e o gene *alkB* também tem participação. A resposta adaptativa tem sido descrita após tratamento com diversos agentes químicos e também após tratamento com raios X. Mecanismos dessa natureza são provavelmente revestidos de significação biológica, traduzindo respostas celulares a modificações das condições ambientais e agressões contra seus patrimônios genéticos, promovidos por diversos agentes químicos e físicos. Na Fig. 10 apresentamos um esquema experimental para observação da reparação adaptativa.

### IV. 3. "Mismatch Repair"

Um "mismatch" pode ser definido como qualquer não complementaridade de bases, num DNA dupla-fita. Mutantes de *E. coli*, aparentemente deficientes em "mismatch repair" (*uvrD* e *uvrE*), têm fenótipo mutador. "Mismatch repair" parece ocorrer preferencialmente sobre fitas não-metiladas, numa situação que, em *E. coli*, ocorre presumivelmente na região da forquilha de replicação. Seria a metilação do DNA, então, que dirigiria o maquinário de reparo, para que este aja seletivamente sobre a fita recém-sintetizada. "Mismatch repair" atuaria, então, sobre os erros de pareamento que ocorrem durante a replicação, e também sobre algumas lesões induzidas quimicamente.

### IV. 4. Reparo por Excisão

Inicialmente, foi chamado de "dark repair", por ocorrer na ausência de luz. Provavelmente é o mais importante mecanismo de eliminação de lesões no DNA.

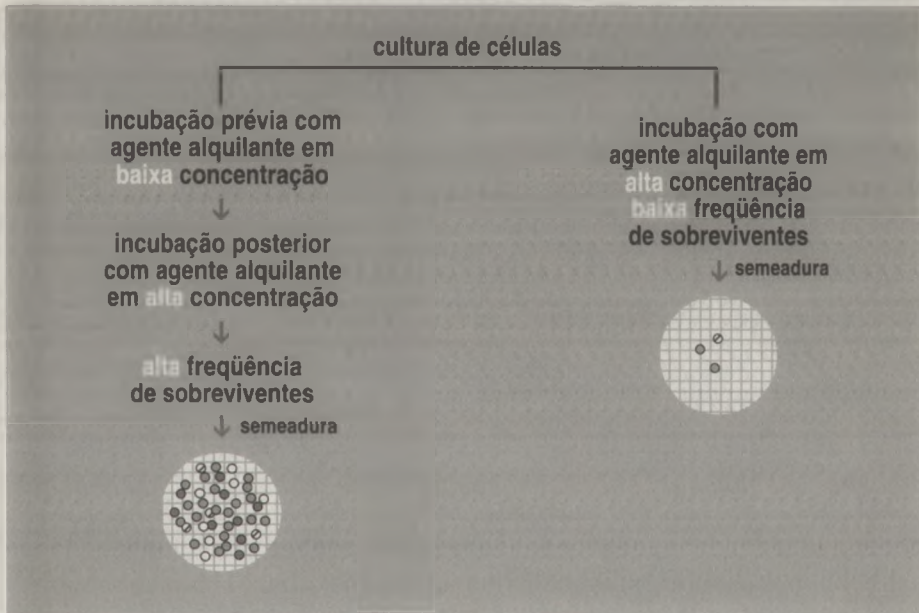


FIGURA 10. Esquema da resposta adaptativa.

É um mecanismo multienzimático, que, resumidamente, reconhece distorções na dupla-hélice, causadas por uma lesão, retira o oligonucleotídeo contendo a lesão e preenche a região vazia ("gap"), usando a fita oposta como molde (Fig. 11).

Tem sido dividido, didaticamente, em reparo por excisão "short patch", em que a restauração se estende por uns 4 nucleotídeos, e reparo por excisão "long-patch", que age sobre lesões maiores, que causam grandes distorções helicoidais. Os passos desse tipo de reparo são:

### A. Incisão

Pode resultar na ação seqüencial de uma glicosilase específica e de endonucleases apurínicas e/ou apirimidínicas (endonucleases AP). As glicosilases catalisam a clivagem da ligação entre as bases mal pareadas e o açúcar, resultando em sítios apurínicos ou apirimidínicos (sítios AP). Então, as nucleases AP cortam a fita, fazendo a clivagem das ligações fosfodiéster, especificamente nesses sítios. Em *E. coli*, a maior parte da atividade endonucleotídica AP é dependente do produto do gene *xthA*. É possível que, ao menos em certas situações, após a atuação da glicosilase, uma outra enzima, uma insertase, introduza uma base nitrogenada no sítio AP gerado, reparando a lesão sem modificação do conteúdo informacional (Lambert *et al.*, 1988).

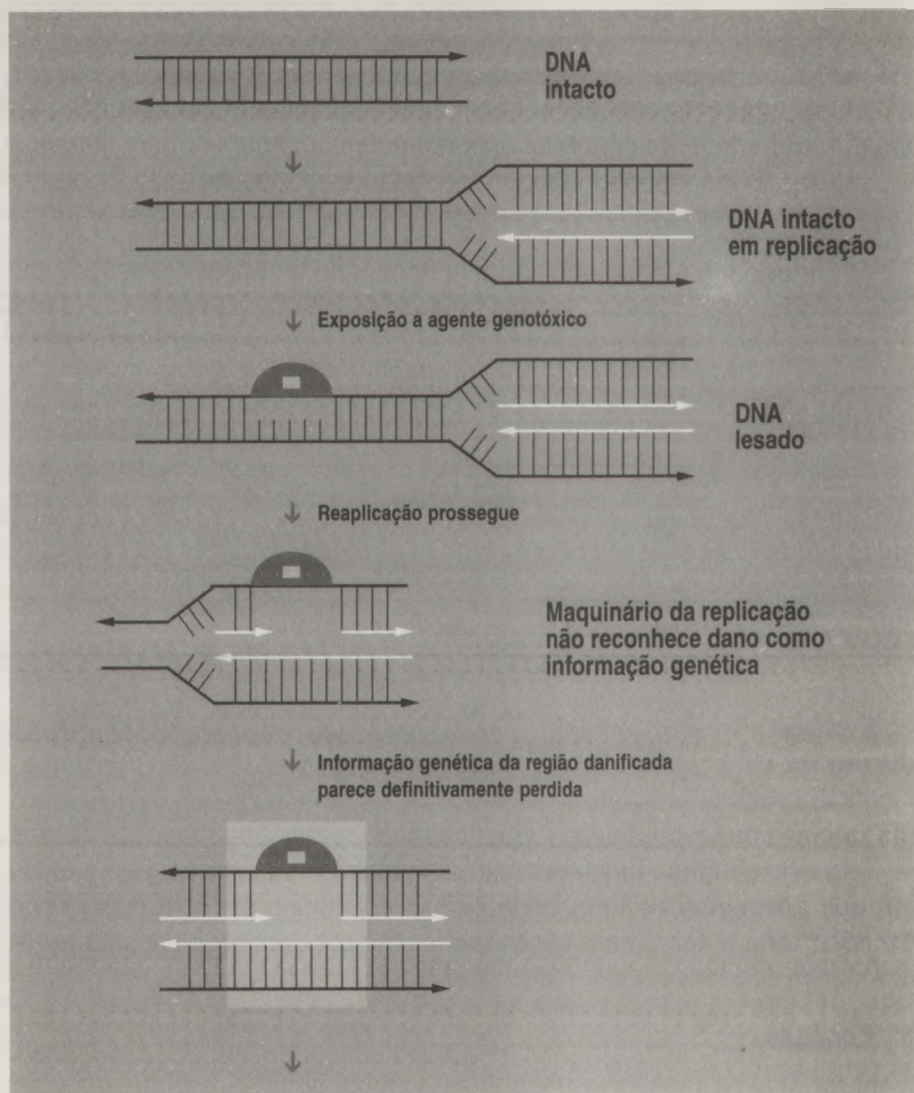


FIGURA 11. Esquema de reparo por excisão.

Células de mamíferos contêm N-glicosilases e endonucleases AP, que parecem atuar por mecanismos análogos aos observados em *E. coli*; da mesma forma, uma insertase para purinas já foi encontrada. Também pode ser iniciada por uma endonuclease. Em *E. coli*, endonuclease é composta pelas subunidades UvrA, B e C, as quais são produtos dos genes *uvrA*, *uvrB* e *uvrC*. A proteína UvrA é que reconhece as lesões e se liga a esses sítios danificados; posteriormente, proteínas UvrB e C ligam-se a UvrA e catalisam a clivagem. A região

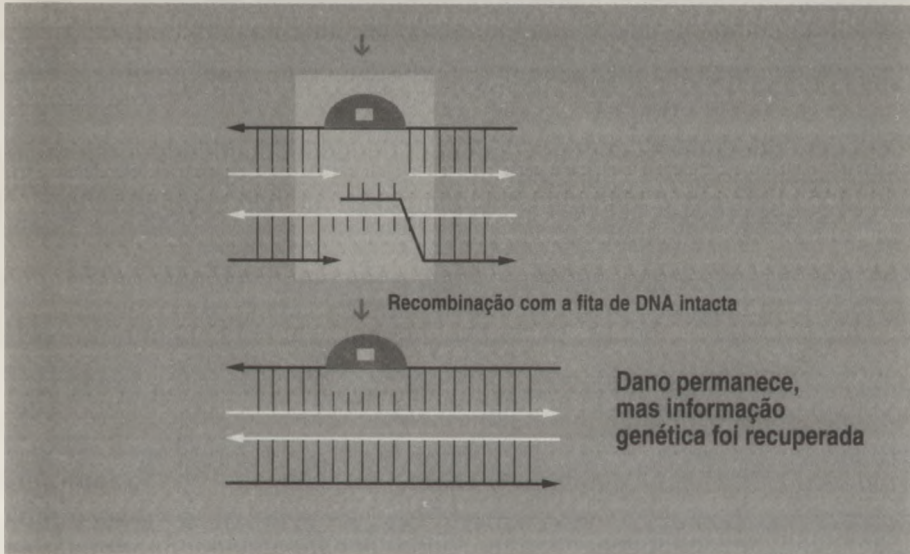


FIGURA 12. Esquema do reparo recombinacional ou pós replicação.

da hélice desestabilizada pela proteína UvrA pode determinar o tamanho da região subseqüentemente excisada. Essas proteínas são expressas constitutivamente, mas a síntese de UvrA pode ser induzida por exposição à luz ultra-violeta.

### B. Excisão e Ressíntese

O passo seguinte à incisão é a excisão das bases danificadas e de alguns outros nucleotídeos adjacentes. Quatro exonucleases têm sido implicadas na excisão de dímeros de pirimidina: DNA polimerase I, DNA polimerase III, exonuclease VII e exonuclease V.

Em *E. coli*, após a incisão, o produto do gene *uvrD* (helicase II) e DNA polimerase I são requeridos para liberar o DNA excisado e induzir o "turn-over" das proteínas UvrA, B e C. Os novos nucleotídeos inseridos o são mediante complementação da seqüência de bases existente na hélice oposta, pela ação de uma polimerase.

Em *E. coli* foram isoladas e caracterizadas 3 polimerases, todas dotadas de atividade exonucleotídica, designadas como DNA polimerase I, DNA polimerase II e DNA polimerase III, codificadas, respectivamente pelos genes *polA*, *polB* e *polC*. Estas enzimas podem degradar o DNA no sentido oposto ao da polimerização, o que lhes permite atuar também na eliminação de nucleotídeos inseridos incorretamente durante a duplicação semi-conservativa, desempenhando, portanto, um papel de revisão editorial.

### C. Ligação

A última etapa do processo de reparo por excisão é a união do fragmento recém-sintetizado à extremidade livre da cadeia pré-existente, mediante o estabelecimento de uma ligação fosfodiéster entre o radical 3'-OH do fragmento e o grupamento fosfato da posição 5' da fita. Em *E. coli*, essa etapa é mediada pela ligase, codificada pelo gene *ligA*.

## IV. 5. Reparo Pós-Replicacional ou Reparo Recombinacional

A existência, na célula, de dois ou mais exemplares de determinada seqüência informacional pode favorecer a manutenção da viabilidade após tratamentos físicos ou químicos, através da recombinação com segmentos não-lesados. Quando o dano não sofre fotorreativação nem é excisado do DNA, a presença deles altera o progresso normal da forquilha de replicação (Fig. 12). A síntese de uma das novas fitas é interrompida para se iniciar num ponto além do dímero. Como resultado, surgem, na fita-filha, regiões vazias. Então, a seqüência informacional parece, definitivamente, perdida: uma fita tem o dímero e a outra tem a região vazia. A informação perdida precisa ser recuperada para haver reparo correto. A seqüência de bases necessária se encontra na outra fita, que também se replicou na mesma forquilha. Por meio de recombinação entre essas fitas a seqüência apropriada pode ser recuperada. Após a recombinação, as descontinuidades resultantes podem ser eliminadas por reparo, usando como molde as regiões não-danificadas (Ganesan *et al.*, 1982).

Esse tipo é importante no reparo de quebras na dupla-fita e também no reparo de ligações cruzadas no DNA. É dependente do produto do gene *recA*, entre outros.

## IV. 6. Reparo SOS

Um conjunto de funções celulares é desreprimido, quando surgem lesões no DNA. São chamadas de funções SOS, cuja expressão é dependente da existência de dois alelos selvagens dos genes *recA* e *lexA*; todas essas funções estão relacionadas à promoção de sobrevivência da célula.

Dentre as funções SOS, que são desreprimidas, incluem-se a inibição da divisão celular, inibição da degradação do DNA pós-irradiação, mutagênese bacteriana induzida, mutagênese e reativação induzidas de fagos, indução de profagos, reativação da célula hospedeira, interrupção da respiração celular, aumento de resistência a radiações, filamentação, síntese aumentada da proteína RecA, excisão de longos fragmentos de DNA, reparação de duplas quebras no DNA.

Indução deste sistema só ocorre quando os "gaps" no DNA são persistentes e refratários a qualquer tipo de reparo. É um tipo de reparo propenso a erros, que parece ser requerido para mutagênese por danos causados por UV e por vários agentes químicos. E essas respostas ajudariam a célula a sobreviver com as lesões não removidas. Quando há ação de SOS não há um reparo propriamente dito, o que ocorre é sobrevivência precária da célula.

Numa célula não-induzida, o produto do gene *lexA* age como repressor para grande número de genes de *E. coli*, inclusive *recA* e o próprio *lexA*; um dano no DNA geraria um sinal que ativaria a função proteolítica da proteína RecA, que agiria sobre a proteína LexA, a qual é clivada; o "pool" de LexA diminuiria e vários genes da função SOS começariam a se expressar. Quando o sinal indutor é eliminado, as moléculas de RecA voltam ao estado proteoliticamente inativo; há aumento no "pool" de LexA e repressão dos genes SOS (Fig. 13).

A indução das funções SOS seria requerida no processo que leva à iniciação da replicação pela forquilha de replicação, bloqueada no dímero de pirimidina. Sem RecA, a retomada da replicação não poderia ocorrer e isso levaria a dano irreversível no DNA. Genes do reparo do DNA regulados pelo circuito SOS incluem: *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *recN*, *ruv*, *umuD*, *umuC* e *recA*.

## Principais Funções SOS

### A. Reativação e mutagênese induzidas no fago $\lambda$

Ocorre quando o fago lesado infecta bactéria previamente irradiada. Há um aumento significativo da capacidade de multiplicação viral e isto constitui o que chamamos de indução de reativação do fago ou reativação Weigle. Essa reativação é acompanhada de elevada mutagênese entre os bacteriófagos produzidos. O fenômeno foi designado de mutagênese induzida do fago ou mutagênese Weigle (Fig. 14) (vide Leitão & Gomes, 1987).

### B. Mutagênese bacteriana

Quando o DNA do fago fX174 é irradiado com UV e é adicionado a extratos celulares de culturas de *E. coli*, não irradiadas e irradiadas, verifica-se que somente nas células não irradiadas, a síntese semi-conservativa do DNA é interrompida, quando a polimerase encontra uma lesão. Nas irradiadas a síntese prossegue normalmente sugerindo a existência de uma polimerase que consegue duplicar o DNA, ultrapassando lesões e não obedecendo rigorosamente às informações contidas na outra fita do DNA. Isso representa um requisito para o reparo

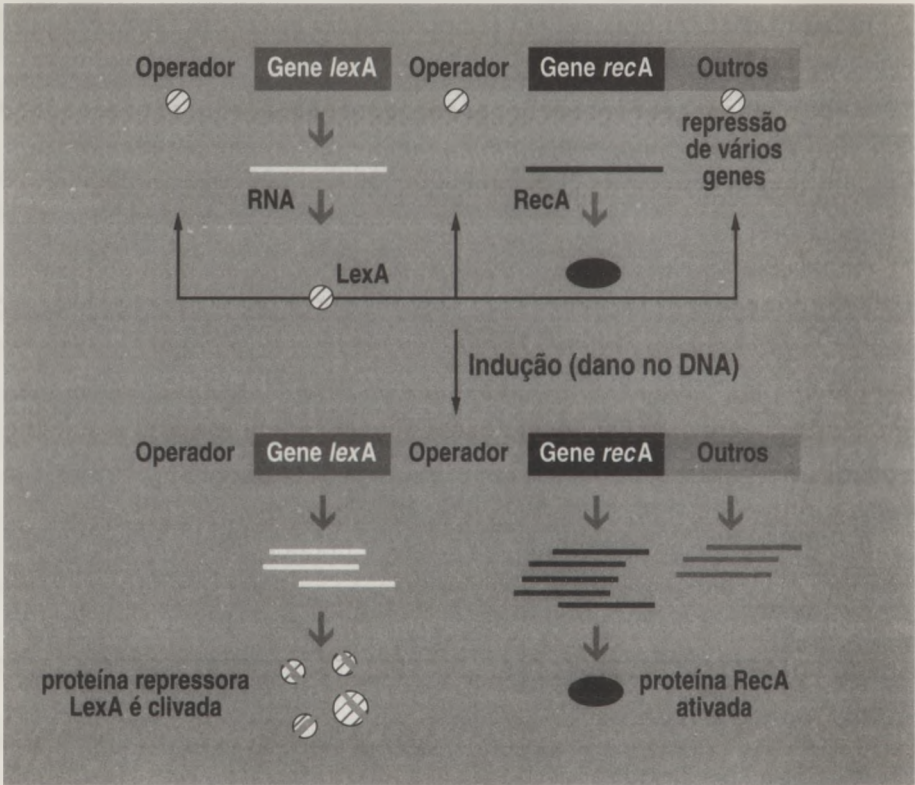


FIGURA 13. Esquema de indução das funções SOS.

propenso a erros. Esse tipo de mutagênese tem sido chamado de mutagênese indireta e, essa polimerase, de mutapolimerase.

### C. Indução lisogênica

O DNA de fagos temperados pode incorporar-se a cromossomo bacteriano, sob a forma de profago, mantendo-se lá, graças à atuação de um repressor de natureza protéica, codificado pelo próprio fago. A inativação desse repressor leva à indução lisogênica. A inativação do repressor pode ser desencadeada por tratamento com agentes físicos e químicos. Por isso, é comum uma produção de fagos, após a exposição a um agente que lesa o DNA, como por exemplo, a luz UV.

### D. Filamentação

A filamentação consiste no aumento progressivo das dimensões celulares sem que ocorra a septação. Se o fenômeno atingir uma amplitude excessiva, pode levar à inativação celular; do contrário, o filamento



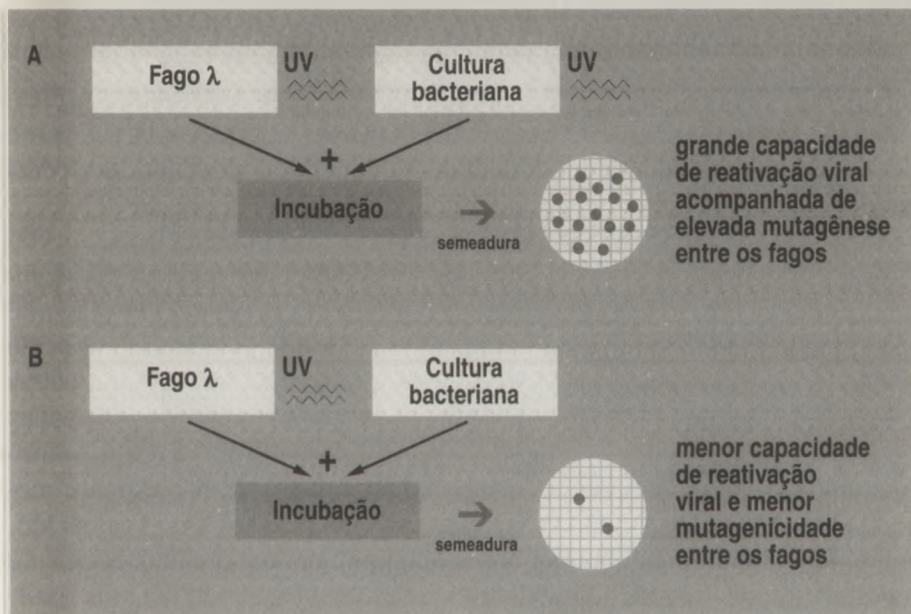


FIGURA 14. Esquema experimental para observação de reativação e mutagênese do fago, induzidas.

pode sofrer septação e dar origem a duas ou mais células viáveis. Em *E. coli* há filamentação, após exposição a agentes físicos e químicos. É provável que a filamentação, desde que não excessiva, propicie melhores condições para manutenção da viabilidade celular, após a produção de lesões no DNA.

### E. Bloqueio da respiração celular

Este mecanismo provavelmente fornece melhores condições para a célula sobreviver, após a exposição à radiação.

### F. Degradação do DNA pós-irradiação

Esta degradação é intensa e, às vezes, pode levar à inativação celular. Um certo nível de degradação parece favorecer a manutenção da viabilidade celular.

### G. Radiorresistência induzida

Esta consiste em uma maior sobrevivência das células às radiações, se houver uma exposição prévia das mesmas a doses reduzidas de radiação. O acúmulo de enzimas ligadas ao reparo criaria melhores condições para a sobrevivência a uma segunda irradiação.

## V. TESTES PARA DETECÇÃO DE AGENTES GENOTÓXICOS

Grande parte dos milhares de agentes químicos atualmente utilizados pelo homem é suspeita de possuir efeitos genotóxicos, isto é, pode ser capaz de induzir alguma alteração no material genético dos seres vivos.

A avaliação do potencial mutagênico e/ou carcinogênico de um determinado agente genotóxico pode ser feita de diversas formas, mas sempre através da exposição de um alvo biológico (um ser vivo) ao agente em estudo. Uma das formas de avaliação seria a observação e a coleta de dados clínicos ou epidemiológicos, após a exposição acidental a certas drogas ou agentes físicos, como nos casos de vazamentos em usinas nucleares, explosão de bombas atômicas, utilização de agentes químicos em guerras etc. Porém, a interpretação desses dados é difícil e melhor seria se o efeito genotóxico pudesse ser previamente conhecido, para se tentar impedir ou, ao menos, minimizar as conseqüências de seus efeitos desastrosos para o meio ambiente. Para isso, há uma enorme variedade de testes, através dos quais se tenta investigar os mais variados efeitos dos agentes físicos e/ou químicos. Contudo, o número de substâncias testadas até hoje não é tão grande, quando comparado ao número de substâncias com as quais os seres humanos estão em contato diário. Tais testes, além de sua aplicação na identificação de substâncias potencialmente genotóxicas, também têm aplicação no desenvolvimento de agentes químicos não-mutagênicos e no monitoramento de populações humanas contaminadas (ou supostamente contaminadas), através da análise de seus fluidos corporais.

Na análise do potencial genotóxico de um agente físico e/ou químico, recomenda-se a utilização de uma bateria de testes, que deve incluir teste para mutação bacteriana, teste para recombinação mitótica em fungo, teste para dano cromossômico *in vitro* e teste em célula eucariótica, *in vivo* ou em animais de laboratório. Recomenda-se o uso de vários testes, porque alguns mutagênicos e carcinogênicos são detectados em alguns testes e não em outros (Watanabe-Akanuma & Ohta, 1994; Moraga & Graf, 1989; Dean *et al.*, 1985).

Apesar do assunto deste capítulo ser sobre microrganismos como indicadores de poluentes ambientais, não podemos deixar de citar aqui outros testes, que utilizam outros organismos, numa tentativa de fornecer uma visão mais ampla do que seria uma bateria de testes para substâncias potencialmente genotóxicas.

O uso de animais de laboratório, como ratos, camundongos, coelhos etc. é um procedimento recomendável, porém não deve ser rotina, re-

servando-os para o último estágio de uma bateria de testes e somente quando for realmente necessário. Isso porque: a) são testes de difícil execução; b) são demorados (em média 3 anos), pois a ocorrência de efeitos genéticos detectáveis pode exigir muitas gerações ou pode demorar anos, como é o caso de tumores; c) são caros (estima-se que cada teste consuma US\$ 300,000); d) são limitados em sensibilidade, já que um número relativamente pequeno de animais pode ser testado. Para uma substância que produza câncer em 1% dos animais tratados, cerca de 10.000 animais deverão ser analisados para se obter resultados estatisticamente significativos. Ainda deve-se tomar cuidados importantes como: o emprego de diferentes espécies de animais, a utilização de dose única e doses fracionadas, usar várias concentrações da substância em teste, a administração por várias vias etc. (Rodrigues *et al.*, 1994).

Portanto, a utilização de outros tipos de testes, além dos que usam animais de laboratório, fez-se imperiosa. Investimentos nessa área justificam-se plenamente quando, em um país como os Estados Unidos, por exemplo, gasta-se 25% do total empregado em cuidados médicos somente em tratamentos de doenças genéticas humanas (Waters *et al.*, 1994).

Nas últimas décadas, outros testes, ainda utilizando animais, têm sido desenvolvidos. É o caso da análise citogenética de cromossomos obtidos de medula óssea, de células germinativas ou de linfócitos de animais de laboratório, tratados com a droga em estudo, através do qual se mede a incidência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos. Esses testes, porém, são de execução relativamente complexa, seus custos elevados e a interpretação dos resultados ainda é controversa. Também testes em vegetais e insetos têm sido usados na caracterização de atividades mutagênicas, com sucesso.

Células em cultura, das mais variadas origens, também têm sido utilizadas com a mesma finalidade. Esses testes têm se mostrado confiáveis, rápidos e pouco onerosos. Suas vantagens estão no rápido crescimento celular, na grande extensão da população tratada, na simplicidade das técnicas empregadas e no custo relativamente baixo.

Microrganismos têm sido utilizados, com sucesso, na detecção de efeitos carcinogênicos em eucariotos superiores, porque a química do DNA é a mesma em todas as formas de vida, assim como a química da mutagênese e do reparo celular (McCann *et al.*, 1975). Às vezes, é necessário mimetizar os processos metabólicos encontrados *in vivo*. Esse processo é conhecido como ativação metabólica. Isso porque alguns carcinogênicos importantes, como a aflatoxina B<sub>1</sub>, 2-aminofluoreno, 3-metilcolantreno, por exemplo, somente o são, após sua metabolização. Para isso, costuma ser adicionado ao meio de cultura extrato de fígado de

rato, que contém as enzimas necessárias para as modificações estruturais nas moléculas de muitas substâncias.

Muitos desses testes têm sido incluídos em pacotes de testes toxicológicos requeridos ou recomendados para regulamentação de produtos químicos.

## V. 1. Descrição dos testes para agentes genotóxicos

### V. 1. 1. Testes que Utilizam Microrganismos Procarióticos

Testes com microrganismos são especialmente úteis, porque as células crescem rapidamente, a população tratada é muito grande, dados positivos são bem distintos dos do controle e os ensaios tecnicamente simples e baratos. Existem numerosos testes que usam microrganismos, e um número enorme de agentes químicos têm sido testados. O uso de linhagens deficientes no reparo do DNA aumenta a sensibilidade do método, o que tem tornado os resultados mais consistentes (Darroudi & Natarajan, 1989; Schiestl, 1989; Hottstein *et al.*, 1979).

#### A. Teste de Ames

Tem sido o teste inicial na discriminação de mutagênicos e não-mutagênicos (Kier *et al.*, 1986). Na verdade, é o método de avaliação de mutação gênica mais conhecido e aceito internacionalmente. É o mais usado em toxicologia genética e combina um teste de mutagenicidade (reversão da *Salmonella typhimurium his*) com um sistema de bioativação exógena, como o sobrenadante hepático pós-mitocondrial ou "S9". O teste recebeu esse nome porque foi desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores. Consiste simplesmente na verificação do número de **revertentes** produzidos, em uma cultura bacteriana, pela incubação das células de *Salmonella* deficientes em histidina com o composto em estudo (Palajda & Rosenkranz, 1985). Pode-se usar linhagem deficiente em reparo por excisão (*uvrB*), o que aumenta a sensibilidade do método. Diversas linhagens podem ser empregadas para realização do teste e várias linhagens foram construídas especialmente para esse fim. Cada uma delas contém uma mutação em um dos vários genes que controlam a síntese de histidina. Algumas revertem preferencialmente por mutação "frameshift", outras por substituição das bases nitrogenadas (transição ou transversão). É procedimento comum que se teste o agente em quatro linhagens diferentes, com e sem adição de ativadores metabólicos. Na Tabela 1 estão algumas das linhagens comumente utilizadas e o tipo de reversão que sofrem preferencialmente.

TABELA I. Linhagens comumente utilizadas no Teste de Ames.

LINHAGENS	TIPOS DE MUTAÇÕES
TA97	"frameshift" ou deslocamento no quadro de leitura
TA98	"frameshift" ou deslocamento no quadro de leitura
TA100	substituição de pares de bases
TA102	substituição de pares de bases

Ainda, linhagens de *Salmonella* portadoras de outras mutações como *gal* ou *rfa* têm sido preferidas, por apresentarem modificações na camada lipopolissacarídica da membrana celular da bactéria, o que confere uma permeabilidade maior aos agentes testados. Anteriormente ao uso dessas linhagens, ocorriam falsos-negativos nesse tipo de teste, devido ao fato da substância genotóxica não ser capaz de penetrar na célula. As linhagens TA100 e TA98, possuindo um fator de transferência de resistência, pKM101, apresentam também reparo propenso a erros bem desenvolvido, o que aumenta ainda mais a sensibilidade dessas linhagens aos agentes genotóxicos.

Recentemente, genes de enzimas responsáveis por metabolização de drogas em mamíferos foram introduzidos em *Salmonella*. Com o uso dessas novas linhagens detectou-se a mutagenicidade de aminas aromáticas, sem adição de S9.

O teste de Ames é sensível, pois microgramas e até mesmo nanogramas de agentes mutagênicos podem ser detectados; é rápido, demorando cerca de 3 dias para ser concluído; os resultados são claros e é bem acurado (90% de seus resultados têm concordado com os de testes de carcinogenicidade em roedores) (Verhagen *et al.*, 1994). Tem sido utilizado para testar agentes químicos potencialmente perigosos para os seres humanos, como agentes químicos ambientais, aos quais as pessoas estão continuamente expostas; também é utilizado para monitorar fluidos humanos (Hollstein *et al.*, 1979; Ames *et al.*, 1975).

O teste tem detectado quase todos os agentes químicos orgânicos conhecidos que são carcinogênicos. Alguns deles já detectados por esse teste são: condensado de cigarro, tinturas para cabelo, Fyrol, toxafeno (pesticida), quercitina (flavinoide natural), quimioterápicos, tranquilizantes fenotiazínicos fotoativados, resinas aromáticas (epóxido), partículas do ar de cidades poluídas, extratos de alimentos etc. Alguns exemplos de mutagênicos detectados em fluidos humanos são: mutagênicos na urina de fumantes, mutagênicos em fluidos de camundongos tratados com sacari-

na, mutagênicos em fluidos de ratos tratados com aflatoxina, mutagênicos em fezes humanas, suco gástrico e leite. Porém, algumas substâncias reconhecidamente carcinogênicas não são detectadas. Dentre estas estão o benzeno, dietilestilbestrol, uretano, alguns carcinogênicos clorados, como dieldrin e tetracloreto de carbono, e compostos metálicos.

Este teste pode ser realizado, segundo metodologias ligeiramente distintas, mas em todos os casos diferentes doses do composto são combinadas diretamente (cada dose em uma placa de Petri) com a linhagem testadora (aproximadamente  $10^9$  bactérias/placa) e com as enzimas para ativação metabólica (S9). Um traço de histidina, que não é suficiente para permitir formação de colônias, mas que permite crescimento suficiente para fixação da mutação, deve ser adicionado ao meio de cultura. Devido à composição do meio, só crescerão colônias prototróficas para histidina, provenientes de mutação espontânea ou induzida pela droga em estudo. É necessário que se empreguem controles adequados, sendo um positivo e outro negativo (Fig. 15).

Um teste de Ames é considerado positivo, se for obtida uma curva dose-efeito, ou seja, se ocorrer um número maior de mutantes, em função do aumento da concentração da substância (numa modalidade quantitativa do teste). Isso para duas concentrações diferentes, no mínimo. Também será positivo, se o número de **revertantes** induzidos pela droga em

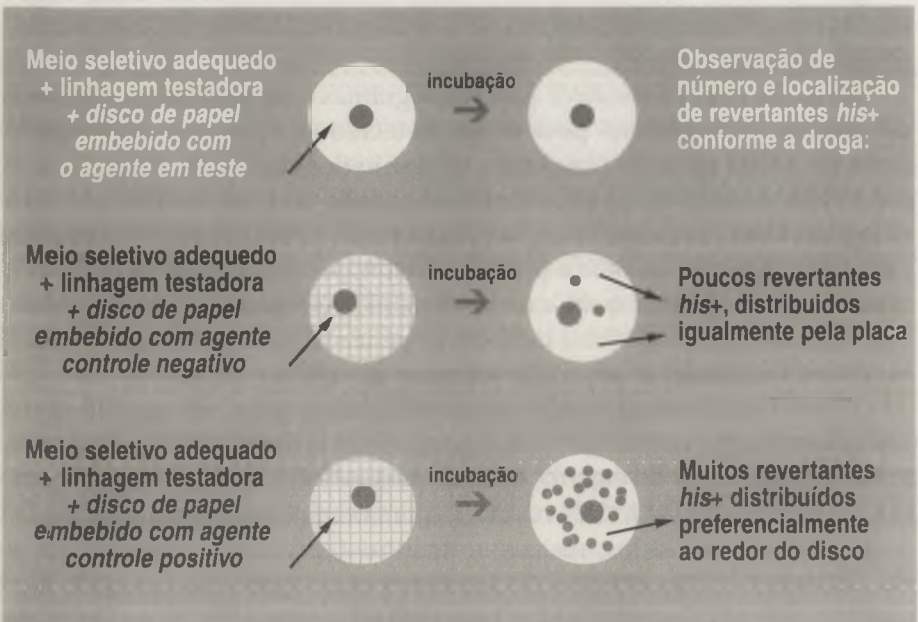


FIGURA 15. Esquema do teste de AMES.

teste for igual ou superior ao dobro do número de **revertantes** espontâneos.

Substâncias dotadas de elevada atividade tóxica podem levar a resultados de difícil interpretação, devido à inativação de um elevado número de células. Geralmente, a ocorrência de falsos-negativos se deve à falta de ativação metabólica, ou à incapacidade de a droga penetrar nas células. Já falsos-positivos são explicados por metabolização da droga por enzimas bacterianas não existentes em células eucarióticas.

### Modificações do teste de Ames

Numerosas pequenas variações, dentro dessa metodologia básica, têm sido empregadas, numa tentativa de otimização dos resultados, conforme o agente em teste (Josephy *et al.*, 1995; Rexroat *et al.*, 1995). Por exemplo, a droga em estudo pode ser aplicada num pequeno disco de papel de filtro, o qual é colocado na superfície de uma placa de Petri, com meio seletivo sem histidina, e com cultura bacteriana já inoculada. A placa é, então, incubada a 37°C, por 48 horas, para posterior observação de acúmulo (ou não) de colônias, que reverteram para *his*<sup>+</sup>, preferencialmente ao redor do disco de papel, conforme a mutagenicidade da droga (Fig. 16). Com essas modificações, transforma-se em um teste

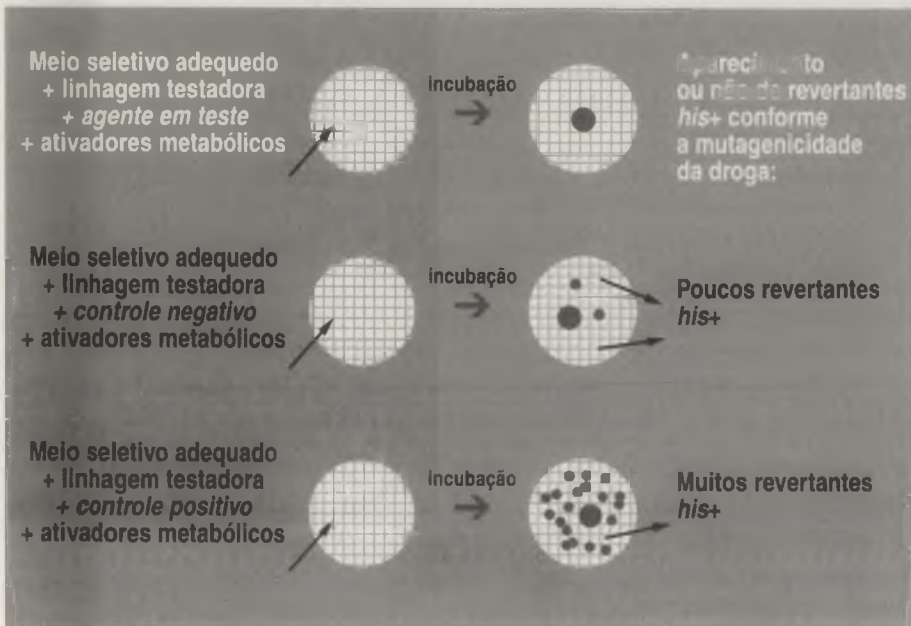


FIGURA 16. Modificação da metodologia básica.

qualitativo, geralmente aplicado quando há necessidade de se analisar um número elevado de compostos químicos ou durante as fases preliminares do estudo de determinado produto.

Outro tipo de teste de Ames qualitativo consiste na utilização de uma única placa de Petri, com um gradiente de concentração da substância a analisar (Rexroat *et al.*, 1995). Cultura de *S. typhimurium* é estriada nessa placa; a distribuição de colônias ao longo da estria, nas diferentes concentrações da droga, indica a ocorrência ou não de mutagênese. Para a preparação do gradiente, basta misturar a droga com meio sólido fundido (45°C) e deixar que solidifique com a placa levemente inclinada. Se outra camada de meio sólido fundido, sem a droga, for vertida em seguida sobre essa mesma placa na posição horizontal, formar-se-á um gradiente de concentração por difusão, de tal forma que a concentração da droga na superfície do agar variará entre um valor máximo e um mínimo (Fig. 17). Cerca de 4.000 compostos químicos foram testados por esse método.

Outras pequenas modificações técnicas podem permitir que o teste seja utilizado de forma quantitativa, isto é, na determinação da dose ativa ou inativa da substância em estudo. Para isso basta que se usem diferentes placas com concentrações conhecidas do agente em teste. Tam-

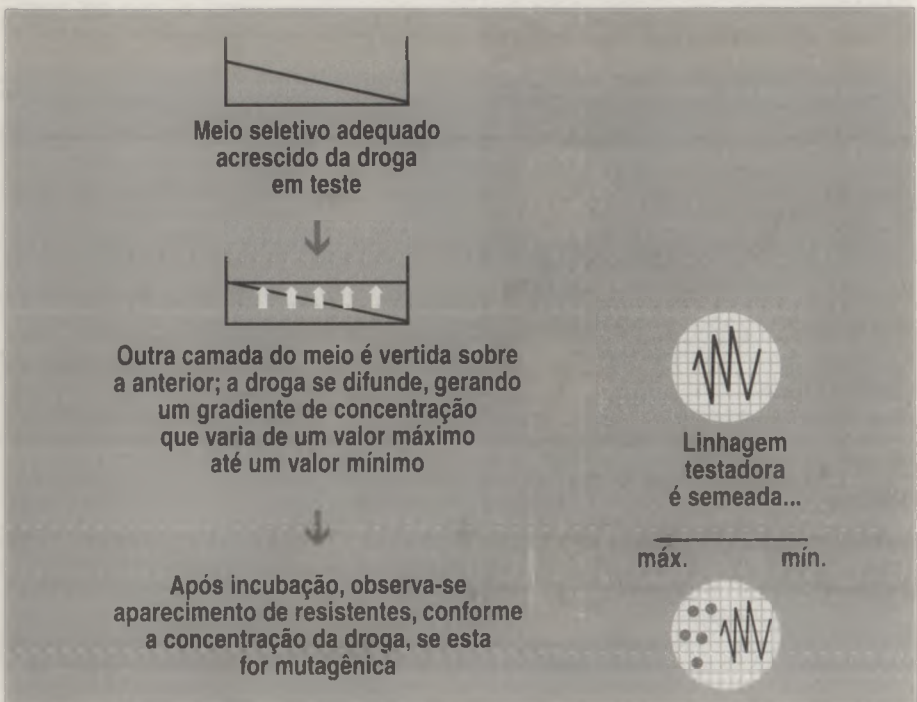


FIGURA 17. Esquema do Teste de Ames em placa gradiente.



bém as bactérias podem ser incubadas por 20-25 minutos a 37°C, em meio líquido sem histidina, com diferentes concentrações conhecidas da droga, seguindo-se o plaqueamento em meio sólido, sem histidina. Após 48 horas, procede-se à contagem dos **revertantes his<sup>+</sup>**. Essa última metodologia permite o estudo da mutagenicidade de substâncias químicas que não se difundem facilmente, através de meio sólido.

Outra modificação introduzida no teste de Ames consiste no tratamento das bactérias com a droga em estudo, em meio líquido sem histidina, seguido da lavagem das células. Só depois aquelas são semeadas em meio sólido sem histidina. Esta modificação se presta especialmente para testes de mutagenicidade de substâncias proteínáceas, que apresentam, freqüentemente, resultados falso-positivos (Verhagen *et al.*, 1994).

Visando agilizar o processo de teste de mutagenicidade bacteriana, outros testes foram desenvolvidos, como o Espiral *Salmonella* e o Simulteste. O teste Espiral é usado para eliminar a necessidade de diluição em série e múltiplas placas para obter dados de dose-resposta. Em um teste de Espiral, a bactéria, o composto e a fração S9 são dispensados na superfície do agar por um plaqueador espiral. O plaqueador pode dispensar uma diluição fixa ou variável de uma placa de agar, eliminando a necessidade do agar de superfície. Cada placa espiral pode gerar informação dose-resposta sobre uma variação de concentração de 15:1. Extratos, compostos puros e misturas de complexos ambientais podem ser avaliados no teste da espiral.

O Simulteste é um ensaio, no qual uma mistura do composto a ser testado, a fração S9 e múltiplas linhagens de bactérias são semeadas sobre uma placa, simultaneamente. A combinação das linhagens de bactérias pode detectar sucessivamente atividade mutagênica, entretanto não se pode distinguir entre mutações de substituição ou "frameshift". Resultados positivos são confirmados por uma repetição do Simulteste e a atividade não mutagênica é confirmada com um teste, usando linhagens individuais. Extratos e misturas complexas podem ser avaliados no Simulteste, mas o teste de compostos voláteis não foi relatado ainda.

Tanto o teste Espiral como o Simulteste e o teste em gradiente de placa são usados para uma seleção preliminar na detecção da mutagenicidade de produtos intermediários, quando do desenvolvimento de novos agente químicos.

### V. 1. 2. Testes que usam *E. coli* ou *B. subtilis*

Seguem o mesmo procedimento do teste de Ames e também detectam reversão de mutação. A mais utilizada é a reversão do requerimento para triptofano. Têm resposta similar à do teste de Ames. Outras reversões também são utilizadas, assim como linhagens deficientes em reparo

do DNA, para o aumento da sensibilidade do método (Hollstein *et al.*, 1979). As linhagens mais comumente usadas são:

- a) *E. coli* B/rWP-2: portadora de auxotrofia para triptofano, detecta substituição de pares de bases, possui baixa frequência de revertantes espontâneos e, por isso, é especialmente útil na detecção de mutagênicos fracos. Em um teste comparativo, apresentou comportamento similar ao da linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*.
- b) *E. coli* K12 343/113 (I): portadora de 3 requisitos nutricionais (galactose, ácido nicotínico e arginina); também contém um profago. Um multiensaio proposto detectaria: 1) reversão dos três *loci* citados, ou por substituição de pares de bases ou por mutação "frameshift"; 2) indução de mutação para resistência ao 6-metiltryptofano; 3) perda da capacidade de fermentar galactose; 4) indução de profago.
- c) *E. coli* K-12 *lac*: vários mutagênicos revertem a capacidade dessa linhagem de fermentar a lactose por mutação "frameshift". Detecta compostos, como a cafeína, que não são detectados pelo teste de Ames.
- d) *B. subtilis* TKJ5211: deficiente em reparo por excisão; auxotrófico para metionina e histidina. Em 17 carcinogênicos testados 13 foram detectados e todos os não-carcinogênicos testados foram negativos.

### V. 1. 3. Teste de flutuação

Usado para detecção de mutagênicos fracos. Esse teste foi desenvolvido originalmente por Luria & Delbruck (1943) e usa como indicador a reversão de auxotrofia, quando os microrganismos são tratados com concentrações muito baixas do agente químico em teste (Holtstein *et al.*, 1979). Pode ser usado para qualquer auxotrofia de bactérias, ou fungos. Ultimamente, esse teste vem sendo muito aplicado para agentes químicos ambientais, que são tóxicos ou que nos ensaios de mutagenicidade mostram-se fracos ou negativos (diclorvos, mitomicina C, NiCl<sub>2</sub> etc.).

Deve-se tratar a linhagem auxotrófica com o agente em teste, com ou sem ativação metabólica, diluir as células tratadas a concentrações muito baixas, distribuir em 100 tubos contendo meio com quantias limitantes dos nutrientes requeridos, incubar por 3-4 dias e, finalmente, contar o número de tubos com população celular bem desenvolvida. Geralmente, usa as mesmas linhagens descritas para outros testes.

### V. 1. 4. Testes de indução de mutação

Detectam mutações que ocorram numa região maior do genoma em vez das mutações pontuais de reversão e, talvez por isso, detectem mutagênicos não detectáveis por ensaios de reversão. Entre esses citamos:

a) **Salmonella typhimurium**: 1) um dos testes usando esta bactéria verifica a indução de resistência a um análogo da prolina, o ácido carboxílico azetidina; este é um teste que não tem sido tão útil quanto o ensaio de reversão; 2) outro teste, nesta mesma bactéria, verifica a indução de resistência a 8-azaguanina; se a linhagem testadora contiver o plasmídeo pKM101, a resposta do teste é similar ao do teste de Ames; 3) um outro teste mede a frequência de indução de resistência à arabinose; esse teste tem detectado vários mutagênicos (MNNG, mitomicina C, ICR 191 etc.).

b) **B. subtilis**: usado no teste da indução de mutação de esporulação — mutantes que não esporulam, por mutação em qualquer dos mais de 25 operons relacionados, são facilmente identificados entre as colônias normais, pois não apresentam o pigmento marrom. Pode ser mais trabalhoso, porque o mutante deve ser identificado entre muitas colônias selvagens, na placa de teste. Tem detectado mutagênicos, como a aflatoxina B<sub>1</sub>, mitomicina C etc.

Esses testes citados acima detectam mutação ou reversão de mutação, porém, são eventos raros e específicos e nem todos os mutagênicos induzem todos os tipos de alterações genéticas. Assim, há o risco de alguns mutagênicos serem classificados como não-mutagênicos. Para eliminação de qualquer dúvida, nas baterias de testes devem ser incluídos testes que não detectem a reversão de uma mutação específica, mesmo usando-se bactérias.

### V. 1. 5. Testes de inibição diferencial de crescimento

Feitos pela comparação da inibição do crescimento entre bactérias normais e bactérias deficientes em alguma via do reparo do DNA, ambas sob tratamento com a droga em estudo. Estes são testes não específicos, pois detectam qualquer alteração que possa ser reparada pelos sistemas celulares de reparo do DNA. Geralmente, usa-se diversas linhagens com diferentes deficiências nas vias de reparo do DNA, e os mutantes *polA* (*E. coli*), *recA* (*B. subtilis*) e *uvrB* (*S. typhimurium*) têm sido especialmente usados (Leifer *et al.*, 1981; Hollstein *et al.*, 1979).

Podem ser feitos em cultura em suspensão ou em placas de Petri, ou em um "spot test", onde o agente químico é colocado num disco de papel, no centro da placa.

a) Teste *polA* de *E. coli* K12: é o mais extensamente usado. Compara inibição do crescimento de *E. coli* selvagem com um mutante deficiente em DNA polimerase I. Originalmente foi desenvolvido como um "spot test". Numerosos carcinogênicos e mutagênicos foram detectados, mas outros não. Recentemente foi modificado, de modo a ser realizado

em cultura em suspensão. Com isso houve uma melhoria na habilidade do mutante *polA* em detectar pró-carcinogênicos.

b) Ensaio *recA* de *B. subtilis* M45: usualmente é conduzido como um "spot test". Não tem sido associado a sistema de ativação metabólica e, mesmo assim, tem detectado inúmeros carcinogênicos, como EMS, mitomicina C, MNNG, corantes, pesticidas, aflatoxinas, compostos metálicos etc.

c) Testes em *E. coli* deficiente em recombinação (*recA*, *recB*, *recC*): a linhagem mais sensível tem sido JC5519 *recB recC*, que tem-se mostrado eficiente na detecção de inúmeras classes de mutagênicos, com exceção das aminas aromáticas, que invariavelmente têm dado resultados negativos nesse tipo de teste.

### V. 1. 6. Testes de indução lisogênica (Indutestes)

A indução de profago em bactérias lisogênicas constitui uma das funções SOS, logo serve como indicador da produção de lesões no DNA, podendo ser empregada para a avaliação de atividade mutagênica e/ou oncogênica.

Para realização do teste, células lisogênicas de *E. coli*, portadoras do profago, são incubadas com células não-lisogênicas indicadoras e com diferentes concentrações de uma droga. Para cada concentração, o número de células induzidas (ou a porcentagem de células induzidas em relação ao número total de células) é determinado.

Qualquer cepa lisogênica pode ser empregada neste teste. Inicialmente, era feito com a linhagem lisogênica K12 de *E. coli*; porém, recentemente foram introduzidas nessa linhagem mutação que confere maior permeabilidade (mutação *envA*) e mutação que confere deficiência em reparo do DNA (mutação *uvrB*). Assim, essa linhagem passou a ser referida como GY5031 e tem apresentado resultados mais claros. A adição de ativadores metabólicos pode ser necessária.

Esse mesmo teste pode ser aplicado para se detectar mutação; a mesma linhagem (GY5031) é plaqueada sobre células lisogênicas indicadoras. Quando ocorrer mutação na região operadora do fago, ele se torna insensível ao repressor, resultando na formação de centros infectivos, mesmo sobre células lisogênicas.

Variações qualitativa e quantitativa também são possíveis neste método. Para uma análise qualitativa usa-se um pequeno disco de papel, embebido na droga em teste, o qual é colocado sobre placas de Petri inoculadas com cultura lisogênica e com cultura sensível ao fago (cultura indicadora). O aparecimento de centros de lise ao redor do disco indicará a existência de ação mutagênica e/ou carcinogênica. No teste quan-

tativo, a droga em teste será colocada diretamente na placa, em concentrações definidas, juntamente com a cultura lisogênica e a cultura indicadora; após 18 horas a 37°C os centros infecciosos são contados.

Uma forma quantitativa do método inclui a pré-incubação em meio líquido contendo a droga em estudo e, após 25 minutos nesse meio, semeia-se em meio sólido e incuba-se por 18 horas a 37°C, após os quais os centros de lise são contados. Essa variação costuma ser usada para drogas de difícil difusão através de meios sólidos. Muitos agentes químicos foram testados por esse método aflatoxina: B<sub>1</sub>, EMS, MMS, mitomicina C etc.

### V. 1. 7. Teste de filamentação bacteriana ou cromoteste

Também avalia a ativação de uma das funções SOS, a filamentação bacteriana. Esse teste dosa a enzima  $\beta$ -galactosidase, que é normalmente produzida no interior das células, mas cuja produção é desreprimida quando as funções SOS são induzidas, levando a um acúmulo desta no interior das células. Então, através de dosagem espectrofotométrica, é possível avaliar a amplitude da desrepressão causada pelo tratamento com o agente em estudo. A enzima fosfatase alcalina também pode ser dosada para os mesmos fins. Também nesse método mutações que aumentem a permeabilidade e que determinem deficiências no reparo por excisão são desejáveis. A ativação metabólica também pode ser utilizada.

Para um teste qualitativo usa-se acrescentar uma pequena quantidade de 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-galactosídeo na placa de Petri com cultura bacteriana; a droga em teste é colocada no centro da placa. A hidrólise desse galactosídeo pela  $\beta$ -galactosidase gera cor azul. Então, o surgimento de um anel azul na zona de inibição da formação de colônias indica tratar-se de um composto capaz de induzir as funções SOS, ou seja, de ser potencialmente mutagênico e/ou carcinogênico (Fig. 18). Outras variações para esse teste qualitativo vêm sendo desenvolvidas e empregadas.

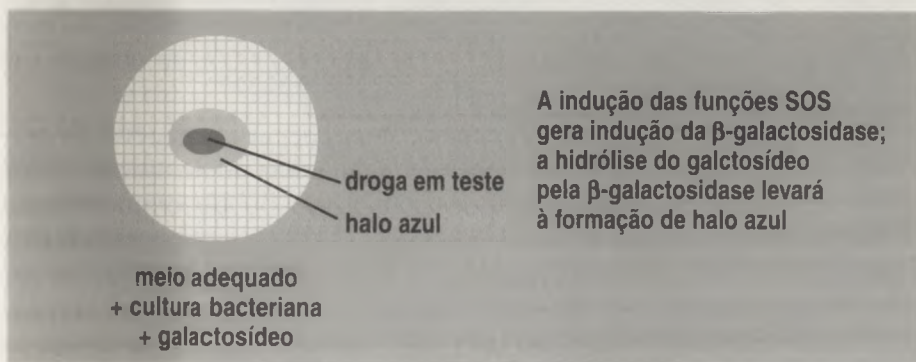


FIGURA 18 Esquema qualitativo do teste de filamentação bacteriana.

Para análise quantitativa, utilizam-se diferentes concentrações da droga, para tratamento em meio líquido, por aproximadamente 2 horas a 37°C. Após, determina-se as atividades enzimáticas, por dosagem espectrofotométrica. Os substratos empregados para as dosagens enzimáticas são o-nitrofenil-b-D-galactopiranosídeo (ONPG), para dosagem da  $\beta$ -galactosidase, e o *p*-nitrofenilfosfatodissódico (PNNP), para a dosagem da fosfatase alcalina. As atividades enzimáticas são avaliadas por leituras da absorvância em 420 nm. Controles positivo e negativo são necessários.

## V. 2. Testes que Utilizam Microrganismos Eucarióticos

São os mais simples e rápidos, dentre os métodos para avaliação de efeitos mutagênicos, que não podem ser detectados em procariotos. Três são os fungos que têm sido mais extensamente utilizados: *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*. Esses testes detectam efeitos que não são detectados em bactérias, como crossing-over, conversão gênica, aneuploidias, não-disjunção mitótica etc. (Hollstein *et al.*, 1979). Agentes que produzem mutações, freqüentemente, induzem eventos recombinacionais. Entretanto, muitos compostos que apresentam resposta negativa para atividade mutagênica em testes bacterianos se revelaram potentes agentes recombinagênicos em fungos. A detecção de recombinação mitótica é importante, porque tais eventos têm sido relacionados à carcinogênese, por levarem à homozigotização de alelos recessivos, previamente em heterozigose. Admite-se que as mutações tumorigênicas sejam, em sua maioria, recessivas e, conseqüentemente, não se expressem, quando presentes em uma única cópia em células diplóides normais, mas passariam a se expressar, quando em homozigose.

Os principais eventos detectados nesses testes são:

1) **Crossing-over mitótico:** ocorre durante a divisão de células diplóides e resulta em células filhas não-idênticas que, além de serem fenotipicamente distintas, são homozigotas no sítio da recombinação. As modificações fenotípicas facilmente observadas são cor de colônia ou perda de um requisito nutricional.

2) **Conversão gênica:** é um processo de transferência unilateral de pequenos segmentos de DNA, com cerca de 1.000 nucleotídeos, entre regiões homólogas de cromátides não-irmãs ou de cromossomos homólogos. Ocorre em diplóides heteroalélicos e os convertantes têm o genótipo selvagem restaurado em um e não nos dois alelos recessivos contidos no intervalo cromossômico envolvido na recombinação. A informação genética é transferida aparentemente de modo unidirecional.

3) **Não-disjunção mitótica:** quando os cromossomos homólogos falham na sua separação durante a mitose, originam duas células-filhas distintas entre si, sendo uma trissômica e a outra monossômica, para aquele cromossomo. A célula monossômica expressará fenotipicamente qualquer alelo recessivo, para o qual era heterozigota na célula original. Isto pode ser prontamente detectado quando são usadas linhagens apropriadas.

A principal limitação desses testes está na relativa ineficiência dos fungos em detectar pró-carcinogênicos, mesmo quando sistemas metabólicos externos são adicionados. Isso se deve à permeabilidade limitada das células-alvo, apesar de alguns carcinogênicos aromáticos grandes, como aflatoxina, poderem ser detectados.

## V. 2. 1. Testes em leveduras

*Saccharomyces* e, em menor extensão, *Schizosaccharomyces* são as leveduras mais usadas em ensaios de mutagênicos. Podem ser usadas na detecção de vários danos no DNA, como mutação de ponto, crossing-over mitótico e conversão gênica.

A levedura *S. cerevisiae* é um Ascomiceto unicelular e uninuclear, com ciclo celular completo e típico de eucarioto. Efeitos genotóxicos podem ser analisados em culturas haplóides e diplóides. Tem sido um dos organismos mais empregados na pesquisa da mutagênese induzida, inclusive por fatores ambientais.

Diversas linhagens diplóides de *S. cerevisiae* têm sido utilizadas para determinação de recombinação mitótica, o que é feito através da utilização de meios seletivos adequados. A linhagem D7 tem sido, sem dúvida, a mais utilizada para esse fim; ela possui o seguinte genótipo:

*ade2-40 cyh2 trp5-12 ilv1-92 // ade2-119 CYH2 trp5-27 ilv1-92*

### A. Detecção de crossing-over mitótico

O alelo *ade2-40* causa requerimento absoluto para adenina e a formação de colônias vermelhas em meio com baixa concentração de adenina. O outro alelo, *ade2-119*, causa uma leve dependência à adenina, isto é, na ausência desta substância há um certo crescimento limitado, com formação de colônias cor-de-rosa. O diplóide forma colônias brancas, já que as deficiências se complementam. Recombinação mitótica, nesta linhagem, entre o locus ADE2 e o centrômero, leva à formação de núcleos homozigotos, para este alelo (*ade2-40* ou *ade2-119*), resultando em colônias diplóides brancas com os dois tipos de setores, vermelho e cor-de-rosa. A ocorrência desse tipo de colônia, após tratamento

com a droga em teste, pode ser considerada como prova da indução de permuta mitótica (Fig. 19).

### B. Detecção de conversão gênica mitótica

A análise do *locus* TRP5 nos dá informações sobre ocorrência de conversão gênica mitótica. Os alelos *trp5-12* e *trp5-27* não se complementam, logo, esse diplóide apresenta requerimento para triptofano, assim como um desses haplóides ou os diplóides homocigotos para qualquer desses alelos. A transferência (por mecanismo de recombinação) da região intacta de um alelo mutante, para substituir a seqüência nucleotídica defectiva de outro alelo mutante, leva à restauração do genótipo selvagem. Assim, somente colônias que sofreram conversão gênica crescerão na ausência do fator de crescimento requerido originalmente (triptofano) e poderão ser selecionadas em MM.

### C. Detecção de reversão de mutação

Ainda essa linhagem D7 pode ser usada na detecção de reversão de mutação, pois ela é homocigota para um defeito no *locus* ILV1, sendo incapaz de crescer na ausência de isoleucina. Mutação reversa nesse *locus* restauraria essa capacidade, o que poderia ser observado em meio seletivo adequado.

### D. Modalidades qualitativa e quantitativa

Como ocorre para outros testes, os que utilizam levedura também podem ser aplicados de maneira qualitativa ou quantitativa.

Um teste qualitativo rápido consistiria na verificação da homocigotização do gene *cyh2*, o qual está em heterocigose na linhagem D7 e que confere resistência à ciclo-heximida. Tal homocigotização seria causada por eventos de recombinação mitótica. O teste consiste de: 1) uma

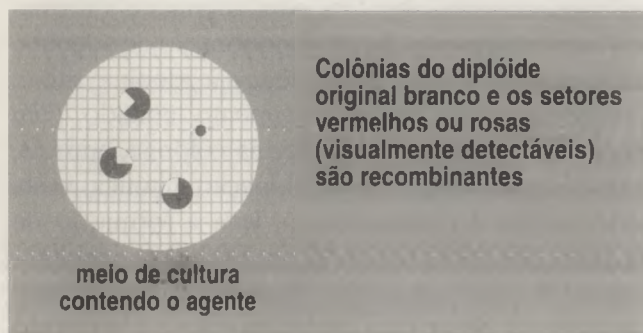


FIGURA 19. Esquema de detecção visual de crossing-over mitótico em *S. cerevisiae*.



alíquota da cultura D7, espalhada sobre uma placa de Petri com meio sólido; 2) retirada de um pequeno bloco de agar do centro da placa; 3) adição da droga a ser testada no pocinho central; 4) incubação por 18 horas a 37°C. A toxicidade da droga é indicada pelo surgimento de uma zona de inibição de formação de colônias, em torno da cavidade central. Em seguida, essa placa é replicada para meio contendo cicloheximida (5 mg/ml) e esta é incubada a 30°C. A resposta positiva é indicada pelo aparecimento de colônias resistentes à cicloheximida, após 5 dias de incubação (Fig. 20).

Outros testes qualitativos, usando os demais marcadores desta linhagem podem ser feitos. Um, bastante usado, se utiliza do marcador *ilv*, observando-se simplesmente a reversão à *ILV<sup>+</sup>*, na presença da droga em teste.

Para teste quantitativo, usa-se o tratamento com diferentes concentrações da droga em estudo (geralmente, procura-se utilizar concentrações da droga que não provoquem inativação celular muito acentuada), em meio líquido, por 30 minutos a 2 horas. Depois disso, separa-se as células da droga e estas são incubadas em meios adequados para determinação de crossing-over mitótico no locus ADE2 ou de conver-

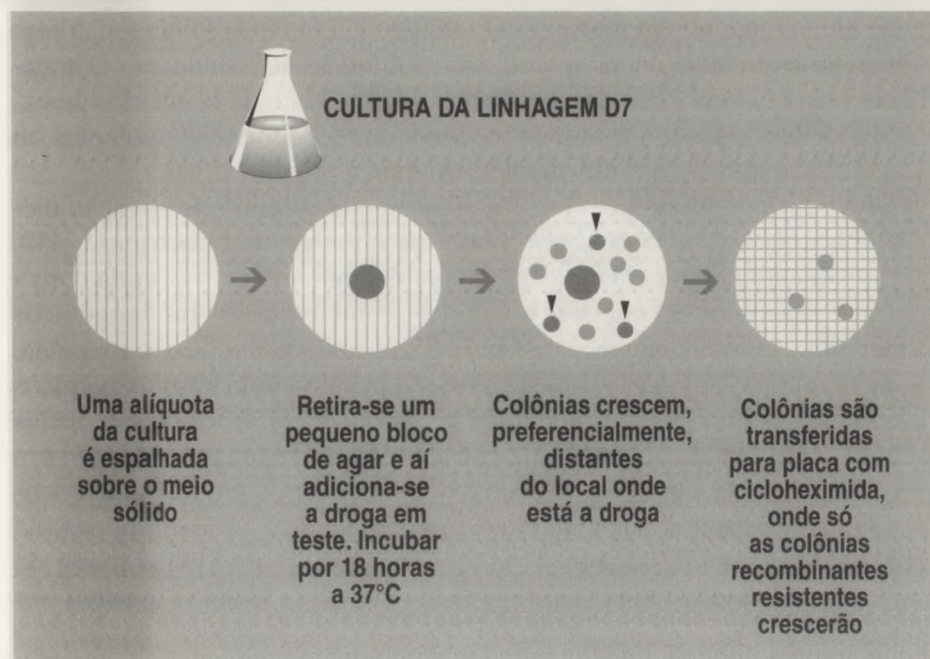


FIGURA 20. Esquema de detecção de recombinação mitótica (homotização de *cyh2*) em *S. cerevisiae*.

são gênica mitótica nos *loci* TRP5 ou, ainda, para reversão de mutação no locus ILV. Após 5 dias a 30°C, conta-se o número de colônias crescidas; assim, estabelece-se uma curva de sobrevivência e de frequência de recombinantes.

A levedura *S. cerevisiae* também pode ser utilizada para determinação da ação de agentes químicos e físicos sobre a mitocôndria. Geralmente, o tratamento com agentes genotóxicos interfere com a duplicação do DNA e leva à indução de mutantes citoplasmáticos "petites" (*rho*), defectivos no processo respiratório. Usa-se cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol, após tratamento com agente potencialmente mutagênico, o qual é um indicador do potencial de óxido-redução. Assim, células normais tornam-se vermelhas no estado reduzido, após terem recebido os elétrons provenientes do processo respiratório, e as células "petites", deficientes no processo respiratório, permanecem brancas.

Esse teste pode ser feito, em seguida, para fins quantitativos descritos anteriormente, bastando para tanto que se acrescente o trifeniltetrazol imediatamente após a contagem das colônias crescidas em meio seletivo adequado.

Para fins quantitativos, as frequências de mutações e recombinações são expressas em relação ao número de células sobreviventes após o tratamento. O teste será considerado positivo, quando as frequências de recombinantes ou mutantes revertidos ou mutantes "petites" forem significativamente maiores que as frequências espontâneas. O tratamento estatístico é desejável e deve ser feito sobre os resultados de experimentos repetidos e não sobre um grande número de mutantes ou recombinantes de um único experimento.

A levedura *S. cerevisiae* possui um sistema endógeno de ativação metabólica, constituído pelo complexo enzimático do citocromo P-450. O nível de concentração celular desse sistema enzimático varia com a linhagem e também com a fase do ciclo celular. Muitos carcinogênicos não detectados em testes bacterianos, mesmo com ativação exógena, mostraram-se genotóxicos neste sistema; porém, muitos carcinogênicos continuam a mostrar-se negativos nestes testes. Em todo caso, testes feitos com levedura, para mutação e recombinação mitótica, servem principalmente para complementar ensaios com bactérias. Recomenda-se que o tratamento seja feito em *S. cerevisiae* em fase exponencial de crescimento, pois nessa fase há detecção de uma gama maior de mutagênicos e também mutagênicos de ação indireta podem ser ativados.

Outras linhagens de *S. cerevisiae* são também usadas, como D3, D4, D5, D81.

A linhagem D3 tem sido usada para detecção de crossing-over mitótico, através da observação da homozigotização do locus *ade2*. Recombinantes homozigotos para esse locus formam colônias vermelhas, ao invés de brancas. Essa linhagem tem sido ótima para detecção de carcinogênicos (aflatoxina, esterigmatocistina, pesticidas, compostos metálicos), mas não para detecção de pró-carcinogênicos e aminas aromáticas.

A linhagem D4 tem sido usada na detecção de conversão gênica, através da observação da perda dos requerimentos para adenina ou triptofano. Tem sido usada também para testes de mutagênicos ambientais, como pesticidas, herbicidas etc.

*S. pombe* P1 tem sido usada na detecção de indução de mutação em *loci* da adenina, resultando em mudança de cor na colônia, de vermelho para branco (mutações nos *loci ade* 1, 2, 3, 4, 5 e 9 bloqueiam o acúmulo de pigmento vermelho).

## V. 2. 2. Testes em *Neurospora*

Esse organismo existe predominantemente como haplóide, mas pode funcionar geneticamente como diplóide pela formação de heterocário (dois núcleos no mesmo citoplasma); tem sido usado na detecção de mutação de ponto e pequenas deleções; se a cromatina está separada no heterocário, a recombinação mitótica e a não-disjunção não são estudadas neste organismo. *Neurospora*, em sua forma vegetativa, contém certas enzimas de ativação metabólica, podendo detectar alguns pró-carcinogênicos.

a) *Ensaio de indução de mutação*: mutação nos *loci ad3A* e *ad3B*, em heterozigotos, causa acúmulo de pigmento púrpura e a mutação é detectada pela mudança na cor da colônia para púrpura. O método é simples, mas requer grandes volumes de meio. O uso de linhagens deficientes em reparo (*uvs1* e *uvs2*), nos heterocários *ad3A* e *ad3B*, aumenta a sensibilidade do ensaio para certos mutagênicos. Alguns carcinogênicos, como EMS, MMS, MNNG e aflatoxina B<sub>1</sub> só foram detectados nos testes com heterocário *uvs* e outros, como 2-amino-purina e actinomicina D, foram detectados nos dois tipos de heterocários.

b) *Ensaio de mutação reversa*: duas linhagens vêm sendo usadas para esse fim, sendo ambas deficientes de adenina: a N3, que detecta substituição de pares de bases e a N24, sensível a mutagênicos que deslocam o quadro de leitura (mutação "frameshift"). Podem ser usados métodos de "spot test", placa ou suspensão, de modo semelhante ao que já foi discutido no teste de Ames. A maioria dos agentes testados mostrou-se positivo em ambos os ensaios.

### V. 2. 3. Testes em *Aspergillus*

*A. nidulans*, na sua forma haplóide e diplóide, tem sido muito usado para testar mutagênicos, ambientais ou não (Käfer *et al.*, 1986), isso porque ele possui um sistema genético bem conhecido, disponibilidade de muitos marcadores genéticos, os quais permitem a manipulação de seu genoma com uma precisão impossível em outros eucariotos (Timberlake & Marshall, 1988; Bertoldi & Griselli, 1980). A adição de ativadores metabólicos é descrita, mas não é usual, apesar de *A. nidulans* não possuir todas as vias complexas presentes em eucariotos superiores. Têm sido preferidos métodos baseados na seleção visual, como cor de conídios e morfologia, ou aqueles baseados na resistência ou reversão de alguma auxotrofia para prototrofia. Devido ao grande número de mutantes já isolados neste organismo, o número de sistemas teoricamente possíveis é vasto.

Em sua forma haplóide, o *A. nidulans* tem sido usado para detecção de mutação ou reversão de mutação, em diversos marcadores genéticos. Três marcadores descritos têm sido usados com frequência para este fim. Um deles é chamado teste do supressor da metionina, que verifica reversão do fenótipo *met* para *met*<sup>+</sup>, por mutação em qualquer locus. O segundo é o sistema 2-tioxantina, que caracteriza mutantes pela cor com que crescem em meio adicionado de 2-tioxantina, de tal forma que colônias verdes são mutantes e as amarelas são selvagens. O terceiro é o sistema arginina, que verifica mutação ou reversão do gene da arginina (Scott *et al.*, 1982).

Já em sua forma diplóide, *A. nidulans* tem sido usado para observação da alteração da recombinação mitótica. O tratamento é aplicado em linhagens diplóides heterozigotas e, conforme a droga em estudo, é possível a observação dos seguintes efeitos: a) crossing-over mitótico, que produz diplóides recombinantes ou a homozigotização de um ou mais marcadores; estes são evidenciados pela presença de "spots" ou setores na colônia de diplóide, crescida em meio sólido; b) não-disjunção mitótica, que produz tipos 2n+1, os quais têm taxa de crescimento reduzida. A haploidização, que faz a forma instável diplóide (2n) retornar para a forma estável (n) pela perda de cromossomos por aneuploidias sucessivas, gera indivíduos haplóides, que podem ter genótipos ou recombinantes ou dos paternos; entre eles a mutação dominante é detectada antes mesmo da haploidização. Translocações e deleções também podem ser detectadas (Käfer *et al.*, 1982).

Ainda em *A. nidulans* há os testes para detecção de aneuploidias. Os aneuplóides (2n-1) são instáveis e produzem setores haplóides ou diplóides (por perda cromossômica ou mal-segregação). Aneuplóides são hiperhaplóides (n+1), já que os n-1 não sobrevivem (Käfer *et al.*, 1986).

#### V. 2. 4. Testes em *Aspergillus* haplóide

A maioria das investigações de mutagênese induzida, em *Aspergillus nidulans*, envolve um dos sistemas que detalhamos a seguir:

a) *O sistema Metionina*: este sistema seleciona colônias de *A. nidulans* que crescem em meio sem metionina, após tratamento de linhagem auxotrófica para metionina com o agente em estudo. Na verdade, a restauração da habilidade em sintetizar metionina surge por mutação em qualquer locus que resulte na supressão da mutação *meth* original; reversão verdadeira não foi encontrada.

Qualquer linhagem deficiente em metionina pode ser usada neste sistema; porém, na maioria das investigações, tem sido usada a linhagem haplóide Glasgow *bioA<sub>1</sub>*, *methG<sub>1</sub>*. A mutação *bioA<sub>1</sub>* causa um aumento na permeabilidade da parede celular aos agentes externos, o que é um fator interessante para a eficiência do teste.

b) *O sistema 2-Tioxantina*: linhagem de *A. nidulans* selvagem cresce normalmente com conídios verdes, mas produz conídios amarelos em meio contendo 2-tioxantina, um análogo de bases púricas. Sabe-se que a 2-tioxantina entra na célula, é convertida em ácido 2-tioúrico pela enzima xantina desidrogenase (XDH) e essa conversão é que leva à produção de um pigmento amarelo. Mutantes que produzem conídios verdes em meio contendo 2-tioxantina podem ser observados e caracterizados; tais mutantes ou são deficientes em XDH ou têm um defeito no sistema de entrada da 2-tioxantina na célula. Desde que *Aspergillus* é incapaz de crescer sem uma fonte utilizável de nitrogênio, mutantes defectivos em XDH são distinguíveis daqueles defectivos na entrada de 2-tioxantina na célula, através da inabilidade dos primeiros em crescer em hipoxantina como única fonte de nitrogênio.

Esse sistema pode usar qualquer linhagem verde, sem translocação, porém, a linhagem haplóide Glasgow *bioA<sub>1</sub>*, *methA<sub>1</sub>* tem sido a mais empregada.

c) *O sistema arginina*: utiliza uma linhagem requerente em arginina, a BIN-252, obtida através de tratamento de linhagem selvagem com luz UV. A natureza exata do tipo de reversão não está descrita.

*Protocolo Sugerido*: conídios de 4-5 colônias da linhagem escolhida, crescidas em 5-6 dias a 37°C em MC, são suspensos em água com Tween 80 (um surfactante usado para obtenção de suspensão homogênea de conídios homogênea), agitados por 15 minutos para liberar os conídios das cadeias e, em seguida, filtrados; depois são ressuspensos em tampão de fosfato de sódio e potássio com Tween 80. A remoção das substâncias inibitórias da germinação dos conídios de *A. nidulans*

é essencial para uma maior uniformidade dos resultados. Estas podem ser removidas simplesmente pela incubação sob agitação, em tampão, por algumas horas.

Para qualquer dos sistemas escolhidos é necessário que se faça um estudo da viabilidade e da freqüência de mutações numa população de células. Para tanto, basta semear conídios em meio seletivo apropriado. A escolha da dose deve ser feita através de um estudo piloto. Controles positivo e negativo são necessários. Sugere-se que a 8-metoxipsoralen, com e sem UV, seja usados como controle positivo e negativo, respectivamente, já que essa substância é mutagênica apenas na presença de UV. Também como controle negativo pode ser usado o próprio solvente e, como controle positivo, qualquer substância reconhecidamente mutagênica.

A linhagem haplóide 35 também tem sido usada para detecção de mutação de ponto. Ela possui como marcador a resistência a 8-azaguanina. Também há relatos do uso da reversão de mutações *pro*, *nic*, *bio*, *ribo* etc.

### V. 2. 5. Testes em *Aspergillus* diplóide

Já em sua forma diplóide, *A. nidulans* tem sido usado para observação da segregação mitótica, isto é, de eventos que podem permitir expressão de genes recessivos.

a) *Conversão gênica*: três linhagens diplóides foram construídas para detecção de conversão gênica mitótica (Fig. 21). Esses três diplóides têm a mesma constituição básica, mas são diferentes quanto às distâncias intragênicas dos marcadores *pabaA*. Após tratamento com o agente em estudo, a observação de colônias verdes prototróficas, em MM, é principalmente derivada de evento de conversão gênica na re-

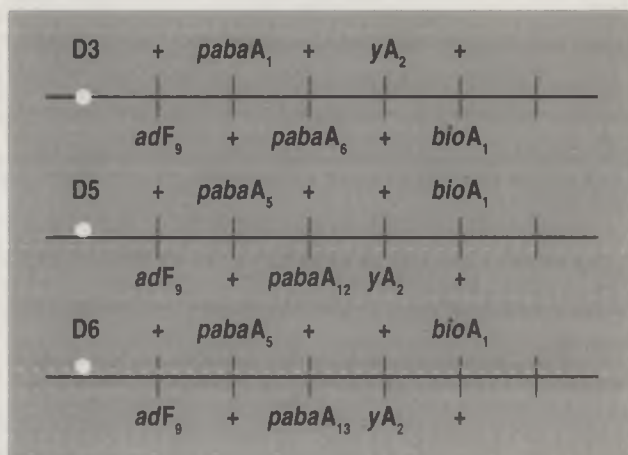


FIGURA 21. Diplóides de *A. nidulans* utilizados na detecção de conversão gênica.

gião *pabaA*. Interferência com outros eventos genéticos praticamente não existe, devido às suas baixas frequências.

b) *Crossing-over e não-disjunção mitóticos*: Uma linhagem diplóide (Fig. 22) foi construída para detecção destes eventos genéticos. O sistema seletivo é baseado na resistência recessiva à pimaricina. Conídios de D7 tratados com agente recombinagênico crescerão em meio com pimaricina, onde o diplóide original não cresce. Crossing-over no braço esquerdo do cromossomo I leva à homozigose para resistência à pimaricina, resultando em diplóides verdes resistentes à pimaricina. Crossing-over mitótico pode ser detectado visualmente, em colônias crescendo em meio sólido, através da identificação visual dos setores segregantes. A evidência mais conclusiva para a ocorrência do crossing-over mitótico é a ocorrência dos "twin spots" ou "twin sectors", isto é, ambos os produtos de um único evento de permuta mitótica. Outra evidência de sua ocorrência seria a seleção de recombinantes homozigotos para marcadores de resistência ou supressores recessivos.

Para detecção de homozigose, qualquer linhagem diplóide heterozigota para qualquer marcador pode ser usada; diplóides portadores de deficiências no reparo do DNA têm mostrado resultados mais conclusivos. Diplóides heterozigotos para marcadores como *ribo*, *paba*, *bio*, *pyro*, *s* e *nic* têm sido usados, com sucesso, para detecção de recombinação induzida por pesticidas, UV, raios X. Desse modo detectou-se, inclusive, genotoxicidade do carcinogênico etionina, o qual apresentou mutagenicidade negativa em diversos testes (Pires & Zucchi, 1994). Quanto à não-disjunção, se esta ocorrer no cromossomo I, ela pode gerar duas constituições nucleares diferentes: monossômica ( $2n-1$ ) e trissômica ( $2n+1$ ). Ambos podem gerar colônias amarelas, resistentes à pimaricina, sendo deste modo selecionados. A não-disjunção também pode ser detectada em inúmeras outras linhagens. Por exemplo, conídios de uma linhagem trissômica, se plaqueados em baixa densidade, permitem a visualização, em vários pontos da colônia, de seto-

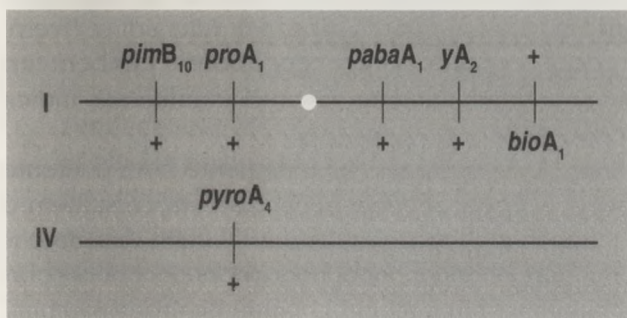


FIGURA 22. Linhagem D7 diplóide de *A. nidulans* usada na detecção de crossing-over mitótico.

res de crescimento mais vigoroso, devido à perda do cromossomo extra. Tal perda também pode ser detectada bioquimicamente, se a linhagem utilizada possuir marcadores apropriados. Por exemplo, uma linhagem trissômica para os seguintes marcadores:

*riboA yA/riboA yA /++*

produz:

*riboA yA/riboA yA* e *riboA yA/++*

Também as linhagens heterozigotas P e P1 têm sido usadas. Elas não crescem em meio contendo *p*-fluorofenilalanina (*p*FA), a menos que ocorra crossing-over mitótico ou não-disjunção em determinada região do genoma. Marcadores para cor de conídio permitem a distinção de colônias que surgiram por não-disjunção das que surgiram por recombinação.

*Protocolo Recomendado:* o protocolo geralmente adotado consiste na adição do agente químico ao meio de cultura sólido. A identificação dos recombinantes pode ser visual ou pode haver análise bioquímica dos setores purificados.

Para uma análise mais acurada sobre o tipo de efeito primário de um agente químico, o tratamento é feito em meio líquido; posterior semeadura em meio sólido é feita de modo que os conídios fiquem bem separados em meio não-seletivo. Depois da incubação as colônias que surgirem são inspecionadas e classificadas fenotipicamente.

Vários carcinogênicos foram detectados em testes para não disjunção, inclusive a griseofulvina, que apresenta resultados negativos na maioria dos testes de mutagenicidade, mas é conhecida por causar anormalidades em espermatozóides.

Também em *A. nidulans* há os testes para detecção de aneuploidias. Aneuplóides podem originar-se de diplóides que perderam cromossomos ( $2n-1$ ). No entanto, esse é um fenômeno bastante raro; aneuplóides do tipo  $2n+1$ ,  $2n+2$  ou  $2n+3$  são os mais comuns. Aneuplóides de haplóides são sempre do tipo  $n+1$ , porquanto os do tipo  $n-1$  não sobrevivem. Aneuplóides crescem e conidiam menos que os euplóides e também são instáveis. Assim, setoramento anormalmente instável geralmente indica ocorrência de aneuplóides.

Nos testes para detecção de aneuplóides há tratamento com o agente em estudo e observação da ocorrência de segregantes com crescimento anormalmente instável, que podem ser identificados como dissômicos ou trissômicos, através de suas características fenotípicas. A análise bioquímica da segregação dos marcadores confirma perda de cromossomos.



### V. 3. Testes que Utilizam Células de Mamíferos em Cultura

São essenciais numa bateria de testes, para complementar aqueles que usam microrganismos, porém não devem ser os únicos. Detectam alguns carcinogênicos e mutagênicos, que não são detectados eficientemente por outros sistemas.

#### V. 3. 1. Testes de mutagênese

Várias linhagens celulares podem ser usadas, como células embrionárias de roedores, células de ovário de hamster (CHO), fibroblastos humanos. Todas devem possuir um marcador para ser observado após tratamento das células com a droga em teste. Os *loci* mais utilizados são *HGPRT* e *TK*; resistência à ouabaína e reversão à prototrofia também são bem utilizados (Holstein *et al.*, 1979).

##### A. Testes nos *loci HGPRT* (hipoxantina guanina-fosforibosil-transferase) e *TK* ( timidina quinase).

Células mutantes resistentes a análogos de purina (8-azaguanina e 6-tioguanina) são usados nos testes para o locus *HGPRT*, e análogos de pirimidina são usados nos testes para o locus *TK*. Esses análogos podem ser fosforilados pelas enzimas *HGPRT* e *TK*, e os metabólitos são letais para a célula. A linhagem celular mais empregada para testes de mutação nesses *loci* são as células de linfoma de camundongo L5178Y. Os *loci HGPRT* e *OUA<sup>R</sup>* têm sido usados para testes em células de embrião de hamster sírio e têm detectado alguns carcinogênicos. Esses mesmos *loci* têm sido usados já por vários anos em células V79 de hamster chinês. Os mutantes são bem característicos; V79 não parece apresentar sistema de ativação metabólica (S9), o qual deve ser acrescentado ao sistema. Com isso há a possibilidade de detecção de inúmeros carcinogênicos.

*HGPRT* também tem sido usado em células de ovário de hamster (CHO). É um sistema bem promissor e várias indústrias e laboratórios têm adotado o protocolo, que está bem padronizado. Adição de sistemas de ativação metabólica tem sido feita com resultados positivos, permitindo a detecção de inúmeros mutagênicos e carcinogênicos. Existe uma correlação de 95% com os testes de carcinogenicidade em animais.

As células de linfoma L5178Y também não possuem enzimas de ativação metabólica em grau significante; por isso, deve ser adicionado. Estas células têm sido trabalhadas nos *loci TK*, *HGPRT* e *OUA<sup>R</sup>*. É um sistema que vem sendo muito empregado em vários laboratórios para a detecção de mutagênicos químicos.

Fibroblastos humanos (locus *HGPRT*) também têm sido usados, o que é importante para avaliar especificamente os riscos de humanos. Porém, há vários empecilhos, pois a população é muito heterogênea, o tempo de vida muito limitado etc.

### **B. Testes no locus de resistência à ouabaina (*OUA<sup>R</sup>*)**

Ouabaína é um veneno que inibe a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependente de ATPase. Mutação no locus da ATPase pode alterar a sensibilidade dessa enzima à ouabaína. As linhagens celulares mais utilizadas neste tipo de teste são V7, CHO e L5178Y.

### **C. Outros**

Auxotróficos para aminoácidos têm sido isolados das células de linfoma de camundongos L5178Y; reversão à prototrofia pode então ser detectada.

Mutantes temperatura-sensíveis têm sido usados, principalmente em células CHO. Clones resistentes são selecionados pela semeadura das células em temperaturas não-permissíveis.

## **V. 3. 2. Testes que medem reparo e inibição da replicação**

Estes testes medem a habilidade dos agentes químicos interagirem com o DNA e induzirem as vias de reparo; pode-se medir quebra de DNA, síntese reparativa de DNA etc. Detectam eventos não-específicos.

Atividades de reparo do DNA são induzidas quando os mutagênicos químicos interagem com o DNA. Esses testes detectam a habilidade dos agentes químicos interagirem com DNA pela medida de quanto o reparo de DNA é induzido. Assim, células deficientes em reparo podem ser mais sensíveis aos efeitos letais de alguns mutagênicos químicos. São testes complementares aos de mutagênese (Hollstein *et al.*, 1979).

### **A. Medida da Síntese "Unscheduled" de DNA (UDS)**

As células são expostas ao agente em estudo na presença de nucleotídeos marcados. Mede-se, então, por auto-radiografia a incorporação desses nucleotídeos na fita de DNA. Inúmeras células, como hepatócitos de rato, fibroblastos humanos, células L de camundongo, células HeLa, células CHO, linfócitos humanos, fibroblastos de pacientes com XP etc. têm sido usadas para testar muitos carcinogênicos.

### **B. Testes para fragmentação do DNA**

Esses detectam quebras no DNA, são rápidos e podem ser usados com muitos tipos celulares *in vitro* ou *in vivo*. Podem ser feitos por

muitas técnicas, como a da eluição alcalina (fragmentos são eluídos mais rapidamente que DNA intacto), sedimentação em gradiente de sacarose etc. Geralmente apresentam resultados bem satisfatórios.

### **C. Testes que detectam inibição da replicação**

Estes têm utilidade incerta para detecção de mutagênicos, pois a correlação entre mutagenicidade e inibição da replicação não está clara. Porém, parece que os mutagênicos inibem a síntese de DNA por muitas horas, após sua remoção do meio, o que não ocorre quando da inibição por inibidores metabólicos. Levando isso em conta, esse teste tem-se mostrado sensível e tem detectado carcinogênicos. Células são marcadas com  $^{14}\text{C}$ -timidina, depois tratadas com agente químico em teste; o agente químico é então removido, e as células são "pulse-labeled" com  $^3\text{H}$ -timidina. Observa-se a razão  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  de células-controle e células tratadas.

### **V. 3. 3. Transformação *in vitro***

Apesar da difícil execução, é valiosa parte numa bateria de testes. Requer habilidade técnica, tanto na cultura quanto na interpretação dos clones transformantes. Inúmeras linhagens podem ser usadas, como células de embrião de hamster sírio, linhagem C3H10T/1/2 de camundongo, fibroblastos de camundongo Balb 3T3 etc. Como detectam muitos carcinogênicos, que são negativos em outros testes, mostrou-se uma técnica promissora (Hollstein *et al.*, 1979).

### **V. 4. Testes de carcinogenicidade *in vivo***

São muito importantes, porque nenhum teste pode reproduzir a complexidade do animal vivo e seu principal valor é indicar se o agente em teste pode alcançar o tecido germinativo. Há também aqueles que medem efeitos genotóxicos em tecidos somáticos. Geralmente, examina-se somente um tecido. Muitos carcinogênicos não são detectados por esses testes. Isso ocorre, porque os agentes químicos, as enzimas de ativação metabólica, assim como as enzimas do reparo do DNA, distribuem-se desigualmente pelos tecidos. Requerem ainda um grande número de animais e um longo período de experimentação.

Há testes que detectam mutações após tratamento de machos, que são cruzados com fêmeas homozigotas recessivas para cor dos olhos, comprimento das orelhas etc. Podem ser usados para avaliação do risco de efeitos hereditários das radiações e de agentes químicos. Não podem testar grande número de agentes químicos, por motivos práticos (10.000-50.000

filhos devem ser observados, o que leva aproximadamente 8 meses). Alguns carcinogênicos testados foram positivos e outros negativos.

## V. 5. Testes Citogenéticos em Mamíferos, *in vivo*

Medem a indução de aberração cromossômica em células germinativas ou somáticas, quando o tratamento com a droga em estudo é administrada ao animal vivo. Foram incluídos na bateria de testes devido à correlação existente entre eventos citogenéticos e mutação; agentes mutagênicos também induzem anormalidades cromossômicas. Existem vários métodos citogenéticos apresentando as mesmas desvantagens dos testes de carcinogenicidade *in vivo* (Matsuda *et al.*, 1989; Hollstein, 1979).

### V. 5. 1. Teste de detecção de micronúcleos

Testa a habilidade de determinado produto induzir micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPC) na medula óssea de animais tratados. Micronúcleos constituem corpos extranucleares no citoplasma celular, os quais representam cromatina deixada para trás, durante a anáfase e que permaneceu independente do núcleo.

O teste tem sido utilizado na análise genotóxica de fármacos e outros produtos químicos, naturais ou sintéticos. Geralmente, usa-se várias dosagens, além dos controles positivo e negativo, administrados via oral, ainda que outras formas de aplicação também sejam empregadas. Quando dá resultados positivos, é sugerido que se faça o teste de aberrações cromossômicas.

O teste dos micronúcleos também tem sido usado na monitoração de populações humanas, como por exemplo, japoneses sobreviventes da bomba atômica, pessoas que trabalham com energia nuclear, produtos químicos etc. ou pessoas que vivem em ambientes muito poluídos (Fig. 23). Micronúcleos são difíceis de ser contados em células nucleadas, por isso conta-se em eritrócitos (eritroblasto expelle o núcleo, mas retém o micronúcleo). Conta-se os micronúcleos somente nos eritrócitos jovens (24-30 horas após exposição) para se ter certeza de se contar somente micronúcleos induzidos pelo tratamento. O sucesso obtido com este método está em torno de 43%, enquanto o sucesso do teste de Ames é de 65%. Dá resultados falso-positivos em 19% dos casos, de modo similar ao teste de Ames (Fenech & Rinaldi, 1995).

### V. 5. 2. Testes de aberração cromossômica

São baseados na análise cromossômica na metáfase. Têm a vantagem de que vários tecidos podem ser analisados, se bem que medula óssea é o mais prático; timo, fígado, espermatogônia também têm sido estudados.

Compostos que requerem ativação metabólica para serem detectados em bactérias dão resultados positivos neste teste. A droga pode ser administrada por várias vias; depois, segue-se o sacrifício do animal. Há técnicas que utilizam cultura de uma amostra do sangue periférico; depois, linfócitos metafásicos serão analisados. Essa técnica também tem sido usada para monitorar populações expostas a substâncias mutagênicas ou à quimioterapia, como o teste do micronúcleo (Fig. 23). A análise de linfócitos apresenta certas vantagens, pois são em grande número, circulam por vários tecidos e podem ser estimulados por mitógenos.

É o único "short-term test" usado em humanos, *in vivo*.

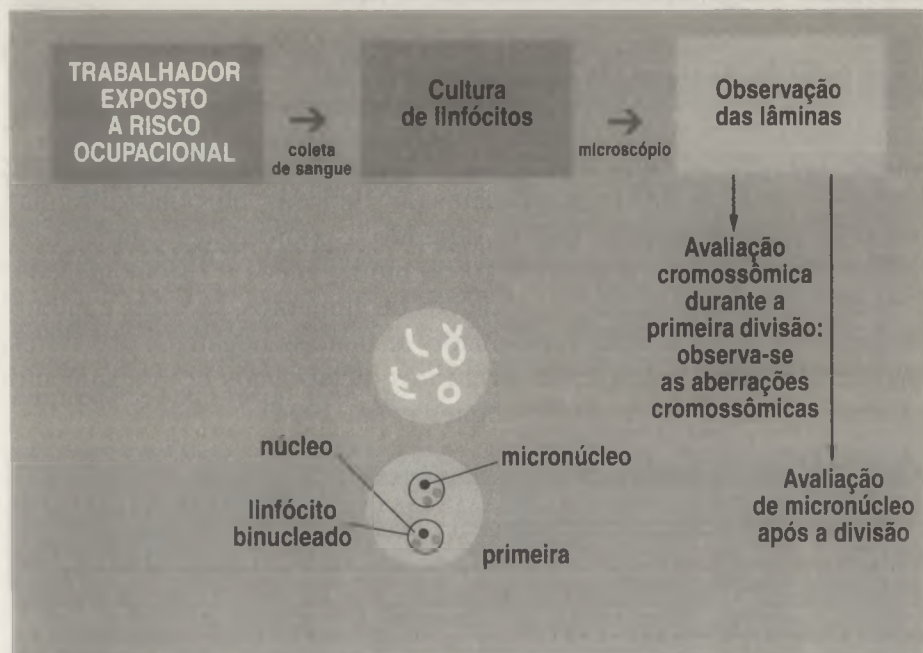


FIGURA 23. Esquema de testes de avaliação de risco ocupacional.

### V. 5. 3. Permuta entre cromátides-irmãs

SCE é o resultado de uma permuta entre os produtos da replicação do DNA e o molde, que pode ser visualizado, em cromossomos metafásicos, como uma permuta simétrica entre cromátides-irmãs, num locus homólogo. O mecanismo molecular é desconhecido, porém, sabe-se que há estreita correlação com a mutagenicidade.

Usa-se múltiplas injeções de BrdUrd, ou infusão contínua, ou ainda tablete subcutâneo no animal em teste. A medula óssea é o tecido de escolha para análise, mas também o fígado e os rins têm sido usados. De

modo geral, detecta aqueles carcinogênicos, que precisam de ativação metabólica no teste *in vitro*.

Pode-se usar a seguinte metodologia: tratam-se animais com o agente químico; a seguir, faz-se uma cultura de sangue com BrdUrd e analisa-se os linfócitos. Carcinogênicos têm sido facilmente detectados, porém, mesmo aqui, a ativação metabólica se faz necessária. Observou-se aumento de SCEs em seres humanos tratados com adriamicina (conhecido clastogênico), utilizando esse método. Tem-se encontrado uma correlação linear entre SCE *in vivo* e mutação em células CHO.

## **V. 6. Testes Citogenéticos em Mamíferos *in vitro***

### **V. 6. 1. Detecção de aberração cromossômica *in vitro***

Inicialmente, o agente clastogênico induz quebra cromossômica; o estabelecimento de uma aberração vai depender da síntese do DNA. Usam-se cultura de linhagens celulares de roedores, fibroblastos humanos e linfócitos humanos. Tem-se sugerido a padronização da técnica, pois é um sucesso na determinação de mutagênicos e carcinogênicos. Detectou-se clastogenicidade de aditivos de alimentos, sacarina e nitrato de sódio, os quais haviam apresentado resultados negativos nos testes em bactérias. Com a adição de ativadores metabólicos houve aumento na sensibilidade do método (Rodrigues *et al.*, 1994).

### **V. 6. 2. Detecção de permuta de cromátides-irmãs (SCE) *in vitro***

Faz-se células crescerem na presença de BrdUrd (análogo da timidina) por dois ciclos de replicação. Faz-se, então, uma preparação da metáfase dessas células. Cora-se com Giemsa e observa-se as cromátides coradas diferencialmente, sendo uma clara e a outra escura. Muitos mutagênicos e/ou carcinogênicos induzem SCEs, como proflavina, agentes alquilantes, radiação, mitomicina C. Pode-se usar células CHO, linfócitos ou qualquer célula, que dê preparações metafásicas boas. A ativação metabólica aumenta a sensibilidade, possibilitando a detecção de pró-carcinogênicos (Nicotera *et al.*, 1985).

## **V. 7. Testes Usando Insetos**

### **V. 7. 1. Testes usando *Drosophila***

A *Drosophila* possui vários marcadores genéticos e enzimas capazes de ativar mutagênicos. Vários efeitos genéticos podem ser detectados, porém

curvas dose-resposta são difíceis de ser obtidas. O teste mais usado é o do marcador recessivo letal ligado ao sexo (SLRL), o qual detecta mutações letais presentes no cromossomo X. Este é também o teste mais aceito, pois detecta os efeitos de pequenas doses, porém consome muito tempo e dinheiro. Usam-se linhagens defectivas em recombinação e reparo para aumentar sua eficiência.

Machos adultos são tratados com o agente químico em teste; depois, são cruzados com fêmeas não tratadas. A primeira geração de filhas é cruzada com machos normais não tratados. Se um dos cromossomos X das filhas carrega uma mutação letal, herdada do pai tratado, esse cromossomo será passado à progênie masculina e os ovos não eclodirão (Fig. 24).

É um teste usado extensivamente, entretanto, aminas aromáticas e hidrocarbonetos policíclicos, que são importantes carcinogênicos, não foram detectados.

Recentemente, ensaios de mutagenicidade em células somáticas de *Drosophila* têm ganho interesse. São importantes na complementação e verificação de "screening" microbiano. O teste da mutação e recombinação somática (SMART) em células da asa da drosófila usa marcadores heteroalélicos para detecção desses eventos. Tem se mostrado eficiente para tratamentos agudos e crônicos; é sensível, consome pouco tempo e é de baixo custo. É indicado para "screening" inicial. Já está validado e já foi empregado para testar mais de 200 agentes químicos (Graf *et al.*, 1989).

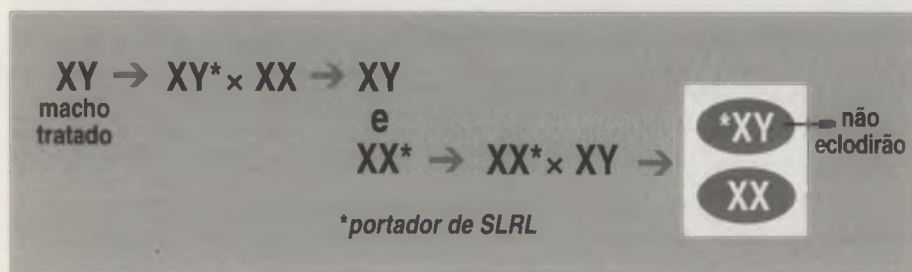


FIGURA 24. Teste do marcador recessivo letal ligado ao sexo (SLRL), em *Drosophila*.

## V. 7. 2. Testes usando outros insetos

Há testes que usam outros insetos e que também são apropriados para ensaios de genotoxicidade. Entre estes podemos mencionar os testes que usam vespas (focalizando-se gene contendo mutação dominante letal) e bichos-da-seda (usa-se mutante para cor de ovo) (Hollstein *et al.*, 1979). Embora vários mutagênicos de ação direta tenham sido detectados, através desses testes, são raramente usados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVA, A.K.; SINGH, M. Sorption of bromacil, diuron, norflurazon, and simazine at various horizons in two soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.45, p.365-374, 1990.
- AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v.31, p.347-364, 1975.
- BERNSTEIN, H.; HOPF, F.A.; MICHOD, R.E. The molecular basis of the evolution of sex. **Advances Genetics**, v.24, p.323-369, 1987.
- BERTOLDI, M.; GRISELLI, M. Different test systems in *Aspergillus nidulans* for the evaluation of mitotic gene conversion, crossing-over and non-disjunction. **Mutation Research**, v.74, p.303-324, 1980.
- BOHR, V.A.; EVANS, M.K.; FORNACE Jr., A.J. DNA repair and its pathogenetic implications. **Laboratory Investigation**, v.61, n. 2, p.143-161, 1989.
- BOHR, V.A.; PHILLIPS, D.H.; HANAWALT, P.C. Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. **Cancer Research**, v. 20, p. 6426-6436, 1987.
- BRUNET, S.; GIACOMONI, P.U. Heat-shock mRNA in mouse epidermis after UV-irradiation. **Mutation Research**, v.219, p.217-224, 1989.
- CAIRNS, J. The origin of human cancers. **Nature**, v.289, p.353-357, 1981.
- DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Cytogenetical characterization of chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells *xrs* 5 and *xrs* 6. III. Induction of cell killing, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by bleomycin, mono- and bi-functional alkylating agents. **Mutation Research**, v.212, p.123-135, 1989.
- DEAN, B.J.; BROOKS, T.M.; HODSON-WALKER, G.; HUTSON, D.H. Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. **Mutation Research**, v.153, p.57-77, 1985.
- DEEN, D.F.; MORGAN, W.F.; TOFILON, P.J.; BARCELLOS-HOFF, M.H. Measurement of sister chromatid exchanges and their relationship to DNA damage, repair and cell killing. **Pharmacology and Therapeutics**, v.42, p.349-360, 1989.
- FABRE, F.; ROMAN, H. Genetic evidence for inducibility of recombination competence in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.74, n.4, p.1667-1671, 1977.
- FENECH, M.; RINALDI, J. A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. **Carcinogenesis**, v.16, n.2, p.223-230, 1995.
- FERGUSON, L.R. Mutagenic and recombinogenic consequences of DNA-repair inhibition during treatment with 1,3-bis-(2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v.241, p.369-377, 1990.
- FRIEDBERG, E.C. Deoxyribonucleic acid repair in the yeast. **Microbiological Review**, v.52, n.1, p.70-102, 1988.
- GANESAN, A.K.; COOPER, P.K.; HANAWALT, P.C.; SMITH, C.A. Biochemical mechanisms and genetic control of DNA repair, p.313-323. In: NATARAJAN, A.T. *et al.*, ed. **DNA repair, chromosome aberrations and chromatin structure**. Amsterdam: Elsevier, s.d. p.313-346. (Progress in Mutation Research).
- GARDNER, E.J.; SNUSTAD, D.P. Mutação. In: **Genética**, 7.ed., New York, John Wiley, 1986. p.213-246
- GEORGIAN, L. The comparative cytogenetic effects of aldrin and phosphamidon. **Mutation Research**, v.31, p.103-108, 1975.
- GRAF, U.; FREI, H.; KAGI, A.; KATZ, A.J.; WURGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989.
- HARDAWAY, L.A.; YALKOWSKY, S.H. Cosolvent effects on diuron solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.80, n.2, p.196-197, 1991
- HENRIQUES, J.A.P.; QUEROL, C.B. Base molecular das mutações. In: COSTA, S.O.P. **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo, Editora Manole, 1987. p.117-134.



- HENRIQUES, J.A.P.; VALSA, J.Q.; GOMES, R.A. Utilização de testes com microrganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: COSTA, S.O.P. **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo: Editora Manole, 1987. p.329-350.
- HO, L.; BOHR, V.A.; HANAWALT, P.C. Demethylation enhances removal of pyrimidine dimers from the overall genome and from specific DNA sequences in chinese hamster ovary cells. **Molecular and Cellular Biology**. v.9, p.1594-1603, 1989.
- HOLLSTEIN, M.; McCANN, J.; ANGELOSANTO, F.A.; NICHOLS, W.W. Short-term tests for carcinogens and mutagens. **Mutation Research**. v.65, p.133-226, 1979.
- HUTCHINSON, F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. **Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology**. v.32, p.115-154, 1985.
- JOSEPHY, P.D.; DE BRUINS, L.S.; LORD, H.L.; OAK, J.N.; EVANS, D.H.; GUO, Z.; DONG, M.S.; GUENGERICH, F.P. Bioactivation of aromatic amines by recombinant human cytochrome p4501a2 expressed in ames tester strain bacteria: a substitute for activation by mammalian tissue preparations. **Cancer Research**. v.55, n.4, p.799-802. 1995.
- KÄFER, E.; SCOTT, B.R. DORN, G.L.; STAFFORD, R. *Aspergillus nidulans*. systems and results of tests for chemical induction of mitotic segregation and mutation. i. diploid and duplication assay systems. **Mutation Research**. v.98, p.1-48, 1982.
- KÄFER, E.; SCOTT, B.R.; KAPPAS, A. Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**. v.167, p.9-34, 1986.
- KUNZ, B.A.; HAYNES, R.H. Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast. **Annual Review Genetics**. v.15, p.57-89, 1981.
- LAMBERT, M.W.; FENKART, D.; CLARKE, M. Two DNA endonuclease activities from normal human and xeroderma pigmentosum chromatin active on psoralen plus ultraviolet light treated DNA. **Mutation Research**. v.193, p.65-73, 1988.
- LEIFER, Z.; KADA, T.; MANDEL, M.; ZEIGER, E.; STAFFORD, R.; ROSENKRANZ, H.S. An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**. v.87, p.211-297, 1981.
- LEITÃO, A.A.C.; GOMES, R.A. Mecanismos de reparação do DNA em *Escherichia coli*. In: COSTA, S.O.P. **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo: Editora Manole, 1987. p.135-166.
- LINDAHL, T. DNA Repair Enzymes. **Annual Review Biochemistry**. v.51, p.61-87, 1982.
- LURIA, S.E.; DELBRÜCK, M. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics**, v.28, p.491, 1943.
- LUTZ, D. No conception. **The Sciences**, v.36, n.1, 1996.
- MARX, J.L. The case of the misplaced gene. **Science**. v.218, p.983-985.
- McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy Science (USA)**, v.72, n.12, p.5135-5139, 1975.
- MENICHINI, P.; VRIELING, H.; van ZEELAND, A.A. Strand-specific mutation spectra in repair-proficient and repair deficient hamster cells. **Mutation Research**. v.251, p.143-155, 1991.
- MILES, C.J.; YANAGIHARA, K.; OGATA, S.; VAN DE VERG, G.; BOESCH, R. Soil and water contamination at pesticide mixing and loading sites on Oahu, Hawaii. **Bulletim of Environmental Contamination and Toxicology**. v.44, p.955-962, 1990.
- MIRZAYANS, R.; WATERS, R.; PATERSON, M.C. Induction and repair of DNA strand breaks and 1-b-D-Arabinofuranosylcytosina-Detectable sites in 40-75 Kvp X-irradiated compared to Cog-irradiated human cell lines. **Radiation Research**. v.114, p.168-185, 1988.
- MORAGA, A.A.; GRAF, U. Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. **Mutagenesis**. v.4, n.2, p.105-110, 1989.
- NICOTERA, T.M.; BLOCK, A.W. GIBAS, Z.; SANDBERG, A.A. Induction of superoxide dismutase, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by paraquat in chinese hamster fibroblasts. **Mutation Research**. v.151, p.263-268, 1985.

- OBE, G.; NATARAJAN, A.T.; PALITTI, F. Role of DNA double-strand breaks in the formation of radiation-induced chromosomal aberrations. In: NATARAJAN, A.T., ed. **DNA repair, chromosome alterations and chromatin structure**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press., 1982. p.1-9. (Progress in Mutation Research, v.4).
- ORR-WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W. Fungal recombination. **Microbiological Review**, v.49, n.1, p.33-58, 1985.
- PALAJDA, M.; ROSENKRANZ, H.S. Assembly and preliminary analysis of a genotoxic data base for predicting carcinogens. **Mutation Research**, v.153, p.79-134, 1985.
- PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A new method to detect potential genotoxic agents using mitotic crossing-over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, n.4, p.371-376.
- PIRSEL, M.; DIPAOLO, J.A.; DONIGER, J. Transient appearance of photolyase-induced break-sensitive sites in the DNA of ultraviolet light-irradiated syrian hamster fetal cells. **Mutation Research**, v.217, p.39-43, 1989.
- RADMAN, M.; WAGNER, R. E.; GLICKMAN B. W.; MESELSON M. DNA-methylation, mismatch correction and genetic stability. In: ALCEVIC, M., ed. **Progress in Environmental Mutagenesis** Amsterdam: Elsevier/ North Holland, 1980. p.121.
- REXROAT, M.A.; OBERLY, T.J.; BERSEY, T.J.; GARRIOT, M.L. The gradient plate assay: a modified ames assay used as a prescreen for the identification of bacterial mutants. **Mutation Research**, v.341, n.3, p.185-192. 1995
- RODRIGUES, A.S.; DUARTE-SILVA, I.; CARIA, M.H.; LAIRES, A.; CHAVECA, T.; GLATT, H.R.; RUEFF, J. Genotoxicity assessment of aromatic amines and amides in genetically engineered V79 cells. **Mutation Research**, v.341, p.93-100, 1994.
- ROEDER, G.S.; STEWART, S.E. Mitotic recombination in yeast. **Trends in Genet.**, v.4, n.9, p.263-267, 1988.
- SASAKI, M.S.; MATSUBARA, S. Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma-ray irradiation. **Internation Journal of Radiation Biology**, v.32, n.5, p.439-445, 1977.
- SCARIA, A.; EDENBERG, H.J. Preirradiation of host cells does not alter blockage of simian virus 40 replication forks by pyrimidine dimers. **Mutation Research**, v.193, p.11-20, 1988.
- SCHIELSTL, R.H. Nonmutagenic carcinogens induce intrachromosomal recombination in yeast. **Nature**, v.337, p.285-288, 1989.
- SCHIELSTL, R.H.; KHOGALI, F.; CARLS, N. Reversion of the mouse *pink-eyed unstable* mutation induced by low doses of X-rays. **Science**, v.266, p.1573-1576, 1994.
- SCOTT, B.R.; DORN, G.L.; KAUFER, E.; STAFFORD, R. *Aspergillus nidulans*: systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and overall response of all systems. **Mutation Research**, v.98, p.49-94, 1982.
- SUGIMURA, T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. **Science**, v.258, p.603-607, 1992.
- TIMBERLAKE, W.E.; MARSHALL, M.A. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. **Trends in Genetics**, v.4, n.6, p.162-169, 1988.
- TINDALL, K.R.; STEIN, J.; HUTCHINSON, F. Changes in DNA base sequence induced by gamma-ray mutagenesis of lambda DNA phage and prophage. **Genetics**, v.118, p.551-560, 1988.
- VERHAGEN, H.; BRUIJNTJES-ROZIER, G.C.D.M.; COENEN, T.M.M.; OOSTEROM, J. Modified suspension ames test for testing proteinaceous substances: an initial step. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, n.12, p.1161-1166, 1994.
- WALBOT, V. Reactivation of mutator transposable elements of maize by ultraviolet light. **Molecular and General Genetics**, v.234, p.353-360, 1992.
- WALKER, G.C.; MARSH, L.; DODSON, L.A. Genetic analysis of DNA repair: inference and extrapolation. **Annual Review of Genetics**, v.19, p.103-126, 1985.

- WANG, Y.; MAHER, V.M.; LISKAY, R.M.; McCORMICK, J.J. Carcinogens can induce homologous recombination between duplicated chromosomal sequences in mouse l cells. **Molecular and Cellular Biology**, v.8, p.196-202, 1988.
- WATANABE-AKANUMA, M.; OHTA, T. Effects of DNA repair deficiency on the mutational specificity in the *lac z* gene of *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v.311, p.295-304, 1994.
- WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BRIDGES, B.A.; ADLER, I.D. The performance of short-term tests in identifying potential germ cell mutagens: a qualitative and quantitative analysis. **Mutation Research**, v.341, p.109-131, 1994.
- WILD, D. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. **Mutation Research**, v.32, p.133-150, 1975.
- YASUI, A.; EKER, A.P.M.; KOKEN, M. Existence and expression of photoreactivation repair genes in various yeast species. **Mutation Research**, v.217, p.3-10, 1989.
- YOKOTA, J.; WADA, M.; SHIMOSATO, Y.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. **Proceedings of the National Academy of Science (USA)**, v.84, p.9252-9256, 1987.
- ZIMMERMANN, F.K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, v.31, p.71-86, 1975.

The first of these is the fact that the...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

There is a further...

It is also true that the...

# IMPACTO AMBIENTAL DECORRENTE DO USO DE PESTICIDAS AGRÍCOLAS

Rosa T. S. Frighetto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento  
e Avaliação de Impacto Ambiental — CNPMA  
Caixa Postal 69. CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

## INTRODUÇÃO

Desde a Segunda Guerra Mundial a agricultura vem passando por grandes mudanças, que incluem a introdução de produtos químicos sintéticos, o uso de maquinaria mais sofisticada, a diminuição da diversificação de culturas e a emergência de produtores de grande porte e mais especializados (National Research Council – NRC, 1989). Dentro desse cenário de desenvolvimento da agricultura, os pesticidas organossintéticos também passaram por grandes mudanças, com a descoberta dos inseticidas organoclorados e organofosforados e o desenvolvimento de herbicidas baseados em hormônio sintético. Atualmente mais de 1.600 pesticidas estão no mercado (citado em Edwards, 1993) e o seu uso continua em crescimento, em função do aumento da área cultivada, apesar da diminuição do número de usuários.

Os pesticidas, também conhecidos como agrotóxicos, são defensivos agrícolas com ação tóxica, que têm como ingrediente ativo compostos químicos formulados para controlar ou erradicar, de maneira geralmente específica, as doenças e pragas de plantas e animais e os vetores transmissores de doenças no homem. O uso de herbicidas, em particular, aumentou substancialmente em decorrência do desenvolvimento de produtos mais específicos, da habilidosa comercialização por parte das indústrias químicas, da promoção ativa, da emergência de métodos de preparo conservacionista da terra e do desenvolvimento de tecnologia de aplicação mais conveniente (Freemark & Boutin, 1995). Do total de pesticidas, os herbicidas são os mais utilizados em todo o mundo, tanto

em volume como em área tratada (Conacher & Conacher, 1986). Produtos para uso em cereais, pequenos grãos, soja, arroz, beterraba e cana-de-açúcar correspondem a 78% do total de herbicidas comercializados no mundo (Freemark & Boutin, 1995). O restante corresponde a inseticidas, fungicidas, nematicidas, acaricidas, moluscicidas, rodenticidas e outros.

Efeito é definido como uma mudança no estado ou na dinâmica de um organismo, população ou sistema ecológico, resultante da exposição a um agente químico, físico ou biológico. Os efeitos da exposição da biota e do sistema ecológico aos agentes químicos e físicos podem ser diretos ou indiretos. Os diretos são os que podem ser relacionados causalmente à exposição ao agente. Por exemplo, para exposição aos agentes químicos, os efeitos diretos são aqueles mediados pela interação molecular do agente e o sítio receptor. O efeito direto de agentes físicos sobre indivíduos e populações é mediado pelas mudanças induzidas na fisiologia e no comportamento, resultando na redução de sucesso reprodutivo ou de sobrevivência. Os efeitos diretos são exemplificados nos estudos ecotoxicológicos. Em contraste, efeitos indiretos não são diretamente mediados pela interação entre o agente e o receptor, mas pelas interações biológicas entre indivíduos ou populações diretamente expostas (Sheehan & Loucks, 1995). Os efeitos indiretos de pesticidas podem ser divididos em duas categorias: a primeira compreende os efeitos crônicos de pesticidas sobre o crescimento, fisiologia e reprodução de organismos e a segunda, os efeitos ecológicos sobre as populações e comunidades de organismos vivos.

Embora o uso de pesticidas, sem dúvida, tenha contribuído para o aumento da produtividade e para a saúde humana, criou também sérios problemas, incluindo o amplo acúmulo de resíduos com danos à vida selvagem, à piscicultura, a insetos benéficos e mesmo ao homem. O impacto de pesticidas sobre o meio ambiente não é sempre óbvio, porém, geralmente insídio. Provoca efeitos muito mais sérios do que se aparenta, tais como mudança adversa na qualidade ambiental, que pode reduzir o potencial produtivo, ao invés da aparente toxicidade. A avaliação da consequência do uso desses produtos se faz em função da natureza do produto (toxicidade e propriedades), do organismo e da exposição (quantidade, frequência e duração) (Madhun & Freed, 1990). Comparado ao que se sabe sobre o ecossistema aquático, o conhecimento sobre a exposição e efeitos ecológicos de produtos químicos sobre o ecossistema terrestre é muito mais limitado (OECD, 1989). O estudo mais extensivo e intensivo de impactos sobre a vida selvagem terrestre, decorrentes do uso de herbicidas, está sendo realizado na Europa (Freemark & Boutin, 1995).

## DESTINO DE PESTICIDAS NO AMBIENTE E A EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS

### Destino

O destino dos pesticidas no meio ambiente está diretamente relacionado com as propriedades físico-químicas dos produtos, quantidade e frequência de uso, métodos de aplicação, características bióticas e abióticas do ambiente e condições meteorológicas (Klingman *et al.*, 1982). Em função desses fatores, cada produto químico se comporta diferentemente no ambiente, dependendo da variação nas propriedades dos produtos e o modo como estes interagem com o meio ambiente. Neste, o destino dos pesticidas é governado por processos como a retenção, transformação e o transporte (Fig. 1). Conhecendo a relação entre propriedades e o comportamento, pode-se prever como o produto se comportará frente às partículas do solo e a outros componentes sólidos, sua velocidade de evaporação, a solubilidade em água e a bioacumulação (Madhun & Freed, 1990). Na Tabela 1 estão relacionados os processos de transferência e degradação, que controlam a dinâmica e destino de

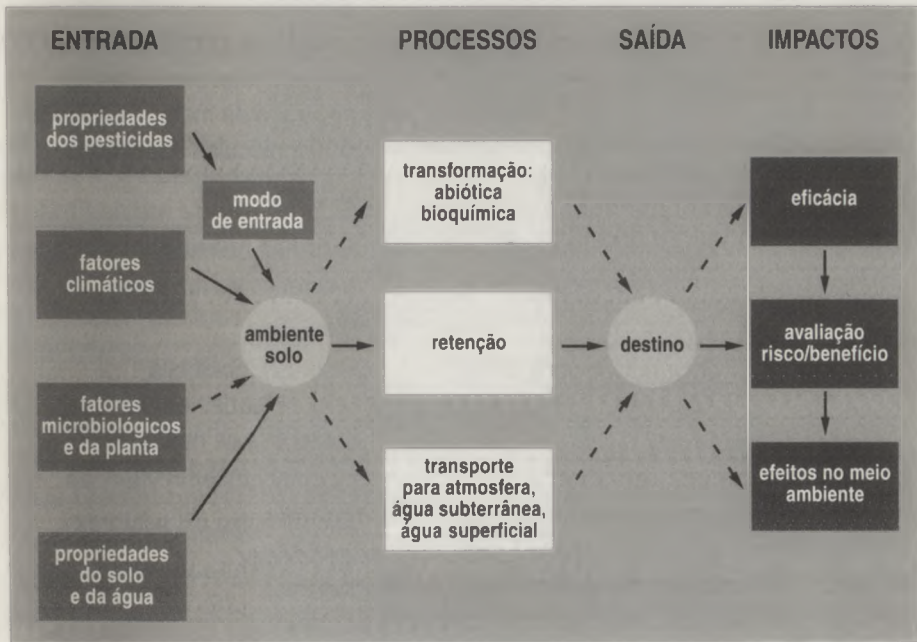


FIGURA 1. Modelo conceitual de fatores e processos que governam o destino de pesticidas no solo e como o destino desses pesticidas afeta a sua eficácia e o impacto no ambiente (Cheng, 1990).

TABELA 1. Dinâmica e Destino de Pesticidas no Ambiente (Pierzynski, Sims &amp; Vance, 1994).

PROCESSO	CONSEQÜÊNCIA	FATORES
Transferência (processo que realoca a molécula sem alterar sua estrutura)		
Deriva física	Movimento pela ação do vento	Velocidade do vento, tamanho de gotas
Volatilização	Perda por evaporação do solo, da planta ou do ecossistema aquático	Pressão de vapor, velocidade do vento, temperatura
Adsorção	Remoção pela interação com plantas, solos e sedimentos	Conteúdo mineral e matéria orgânica, tipo de mineral, umidade
Absorção	Absorção pelas raízes ou ingestão pelo animal	Transporte pela membrana celular, tempo de contato e suscetibilidade
Lixiviação	Translocação lateral e vertical através do solo	Conteúdo de água, macroporos, textura do solo, qualidade do mineral e conteúdo de matéria orgânica
Erosão	Movimento pela ação da água ou do vento	Chuva, velocidade do vento, tamanho das partículas do mineral e da matéria orgânica com moléculas absorvidas
Degradação (processo que altera a estrutura química)		
Fotoquímica	Quebra da molécula, devido à absorção de luz solar	Estrutura química, intensidade e duração da luz solar, exposição
Microbiana	Degradação microbiana	Fatores ambientais (pH, umidade, temperatura), condições de nutriente, conteúdo matéria orgânica
Química	Alteração por processos químicos como hidrólise e reações de óxido-redução	Alto ou baixo pH e fatores ambientais
Metabolismo	Transformação química após absorção pelas plantas e animais	Capacidade de ser absorvido, ser metabolizado e interagir com organismos



pesticidas no meio ambiente. Por exemplo, a deriva física se relaciona geralmente com o momento da aplicação, mas pode ocorrer também no momento de ventos fortes ou chuvas torrenciais, quando os pesticidas são lavados das plantas.

## Exposição

É necessário o conhecimento sobre o comportamento ambiental de pesticidas para se estabelecer o potencial de exposição de organismos selvagens no seu habitat. Entre vários processos do ambiente, aqueles particularmente relacionados ao comportamento ambiental como um todo incluem a sorção, lixiviação, evaporação e a degradação e, em termos de efeitos biológicos, a bioacumulação. Para avaliação de impacto ambiental, deve-se examinar a interrelação entre esses processos. Por exemplo, se o parâmetro se relaciona à absorção e acúmulo de produto químico no organismo, deve-se lembrar que a adsorção na partícula do solo ou sedimento reduzirá substancialmente a quantidade do produto químico disponível para absorção. Então, se a acumulação é no peixe, a mesma concentração do produto químico na água, livre de sedimento, resultaria em maior absorção do que se houvesse um pesado "silt load" na água.

Organismos selvagens são os que provavelmente mais sofrem exposição aos pesticidas, particularmente em campos cultivados que recebem tratamentos mais freqüentes e/ou maior quantidade de pesticidas. Organismos selvagens, habitantes das áreas vizinhas aos campos tratados, são os alvos mais prováveis de exposição através da pulverização direta (especialmente durante a aplicação aérea), da deriva durante e/ou volatilização após aplicação e devido, também, ao movimento desses produtos químicos através de *runoff* (escoamento superficial), ou através de solos erodidos. Espécies que se movem podem também ser expostas ao produto químico pelo contato com a vegetação ou pela presa contaminada, quando esta usa o campo tratado. Dentre o mecanismo potencial de exposição (Fig. 2), a pulverização direta, a deriva e o vapor da deriva são processos particularmente de interesse (Elliott & Wilson, 1983; Sheehan *et al.* 1987). Significativo vapor de deriva foi observado para clomazone (Poster, 1986) e dois outros herbicidas amplamente utilizados no Canadá e USA, triallate e trifluralina (Grover, 1983). Aplicação aérea pode resultar em exposição significativa de organismos não-alvo. Uma série de estudos mostrou que, mesmo sob condições ideais, somente cerca de 50% de pesticidas aplicados por via aérea atingem a área-alvo (Ware *et al.*, 1970; Renne & Wolf, 1979; Grue *et al.*, 1986; Davis & Williams, 1990).

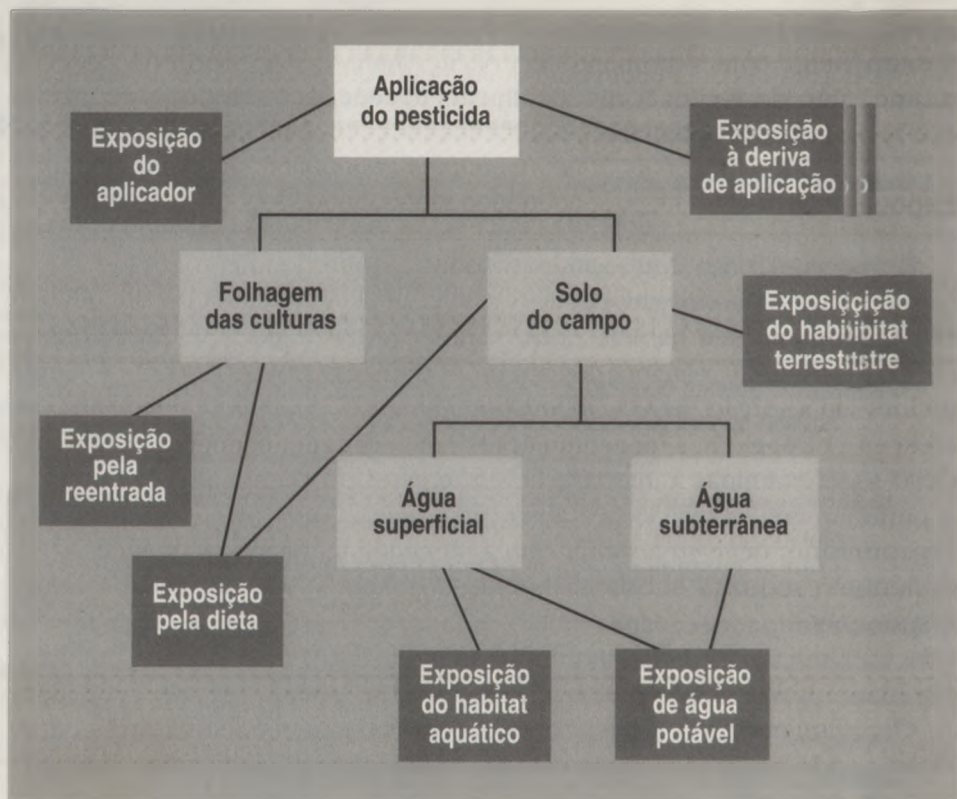


FIGURA 2. Mecanismo de exposição ao pesticida.

Além da exposição letal direta, efeitos subletais foram registrados em muitas espécies de organismos, apesar de concentração insuficiente de pesticidas ter sido consumido. Dependendo do tipo de organismo envolvido, exposição a concentrações subletais podem causar alterações de natureza genética, fisiológica ou comportamental nas espécies s s alvo e não-alvo. Casos de aumento na tolerância ou resistência, de reprodução enfraquecida, de inibição das atividades enzimáticas do cérebro, da redução ou inibição de crescimento e de deformação da espinha dorsal são os efeitos documentados.

Outros efeitos adversos, como a perda de peso, eclosão reduzida de ovos, mortalidade do embrião, hábitos alimentares alterados, comportamento de incubação alterado e resposta interrompida, também foram reportados. A avaliação de tais efeitos se tornou mais importante, devido aos resíduos de pesticidas persistentes estarem amplamente distribuídos na biota, mesmo nos locais mais remotos, onde não há registro de uso de pesticidas (Freed, 1970).

## Resistência

A exposição contínua ou repetida de um organismo a determinado pesticida pode torná-lo resistente ao produto. Esse fenômeno, genético na natureza, foi demonstrado em muitas espécies de animais, incluindo insetos e peixes (Boyd & Ferguson, 1964; Ferguson, 1970; Vinson *et al.*, 1963; Hill, Harris, 1972; Milio *et al.*, 1987; Collins, 1985; Odenkirchen & Eisler, 1988). Num Relatório do Programa Ambiental das Nações Unidas, a resistência a pesticidas é citada como um dos quatro maiores problemas ambientais no mundo (UNEP, 1979). Cerca de 504 espécies de insetos e ácaros (Georghiou, 1990), aproximadamente 150 espécies de patógenos de plantas (Georghiou, 1986; Eckert, 1988) e cerca de 273 espécies de plantas invasoras são resistentes a pesticidas (LeBaron & McFarland, 1990).

Enquanto os pesticidas que desenvolvem resistência continuarem em uso, o fenômeno da resistência continuará a desenvolver-se e alastrar-se, o que pode apresentar sérios problemas aos programas de controle de pragas e risco aos organismos não-alvo. Desenvolvimento de resistência não significa necessariamente a emergência de um "super organismo", mas meramente a de um "make up" genético, que capacita dado organismo a tolerar um produto químico específico ou um patógeno que o molesta. O impacto da resistência, que se desenvolve gradualmente com o tempo, reflete-se na questão econômica da produção agrícola. Exemplo desse fato é citado por Adkisson (1972) e NAS (1975), em que certa praga do algodão desenvolveu resistência ao pesticida e o impacto social e econômico sobre as comunidades agrícolas do Texas e México, que dependem da cotonicultura, foi devastador.

Se os custos de resistência a pesticidas são elevados nos Estados Unidos, em países tropicais em desenvolvimento são significativamente maiores, porque tais produtos são utilizados tanto no controle de pragas agrícolas, quanto no controle de vetores de doenças. Um dos maiores custos de resistência nos países tropicais está associado ao controle da malária. Por volta de 1961, a incidência de malária na Índia após o uso de pesticida estava em torno de 41.000 casos. O desenvolvimento de resistência em mosquitos fez o número de casos nesse país subir para 59 milhões (Reuben, 1989). Hoje a incidência total de malária está estimada em torno de 270 milhões de casos no mundo (WHO, 1990; NAS, 1991).

## Organismos

A suscetibilidade relativa de organismos jovens e adultos é uma consideração importante na avaliação do impacto de pesticidas na biota aquática e terrestre. Geralmente, na idade jovem as espécies são mais sensí-

veis às ações tóxicas de pesticidas do que na idade adulta. A evidência desse fato foi registrada para vários compostos. Outro fator importante a considerar é o habitat do organismo. Em lagos, por exemplo, a toxicidade de pesticidas aos peixes esteve significativamente relacionada à profundidade, à estratificação e à atividade biológica (Eisler & Jacknow, 1985)). Por exemplo, quando dois lagos situados na montanha, no Oregon (EUA), foram tratados com toxafeno, o mais profundo e biologicamente mais pobre permaneceu tóxico a peixes por muitos anos, enquanto no mais raso e rico em vida aquática os peixes puderam ser reintroduzidos um ano após o tratamento (Terrierre *et al.*, 1966).

## IMPACTO SOBRE ORGANISMOS ESPECÍFICOS

### Microrganismos

O impacto de pesticidas sobre a microbiota do solo e sobre os processos biológicos é difícil de ser determinado com precisão, devido à natureza, à heterogeneidade e à dinâmica e respostas adaptativas da população microbiana. A população biológica do ecossistema solo consiste de várias espécies de bactérias, fungos, algas, protozoários, minhocas e insetos, dentre outros invertebrados (Russell, 1973). Como é de se esperar, há uma relação benéfica e competitiva entre esses organismos e, é claro, plantas que crescem sobre esse solo. As bactérias, como o *Rhizobium* spp., são essencialmente benéficas às leguminosas, enquanto certos fungos são patogênicos. Semelhantemente, alguns nematóides podem atuar como limitantes ao crescimento de plantas.

A maioria dos pesticidas está direcionada ao controle de pragas da parte aérea de plantas ou de animais, embora uma boa parte de pesticidas atinja o solo (Parr, 1974; Brown, 1978) e nele seja incorporado através da água ou pela aração. Outros pesticidas podem ser diretamente aplicados ao solo para controle de plantas invasoras, nematóides, insetos e fungos. Duas questões distintas vêm à tona relacionadas ao uso de pesticidas no solo. A primeira é se o pesticida está sendo aplicado no controle de um organismo e a persistência é o fator determinante de sua eficiência. Nesse caso, é problemático se os organismos do solo metabolizarem o produto muito rapidamente. A segunda questão é se o pesticida é tão tóxico aos organismos do solo a ponto de desbalancear ou reduzir drasticamente sua população. Ante essas questões, vários estudos foram conduzidos para ajustar a concentração e o modo como diferentes espécies de organismos do solo metabolizam diferentes pesticidas e determinar se estes têm efeitos sobre tais organismos. Os métodos mais comumente

utilizados no estudo do efeito de pesticidas sobre organismos do solo incluem medida respirométrica do solo, nitrificação, formação de ATP, dentre outras técnicas. A degradação de pesticidas por microrganismos foi estudada, comparando-se a velocidade de desaparecimento do produto em solos normais e esterilizados, sob diferentes condições de temperatura e umidade, bem como seguindo o aparecimento de metabólitos. Foram também utilizadas culturas suplementadas e isoladas de microrganismos específicos.

Para a maioria dos pesticidas aplicados em plantas (que atingem a superfície do solo em concentrações moderadas), estes mostraram efeitos transitórios na atividade ou no número de uma ou mais espécies (Anderson, 1978). A altas concentrações, o efeito pode ser pronunciado, especialmente no caso de produtos químicos usados como fumigantes de solo (EDB, DD e metil isotiocianato). Algumas espécies podem ter sua população marcadamente reduzida, mas outras podem ser estimuladas por baixos níveis de certos químicos (Audus, 1964; Anderson, 1978). Na Tabela 2 encontram-se alguns exemplos de efeitos de pesticidas sobre microrganismos do solo.

TAABELA 2. Efeito de pesticidas sobre microrganismos do solo (Madhun & Freed, 1990).

PESTICIDAS	EFEITOS
Dalapon	Inibição da atividade denitrificadora
Simazina	Aumento da população de bactéria aeróbia fixadora de N <sub>2</sub> Diminuição de bactérias anaeróbias.
Pyrazon, Atrazina e Linuron	Diminuição da atividade e de populações de bactérias e algas
Trifluralina	Redução da nodulação de legumes mas não da população de rizóbios
Dorpropham	Inibição do crescimento de actinomicetos
PCP (pentaclorofenol)	Diminuição de populações de fungos e actinomicetos
Dalapon	Diminuição da população de bactérias
Daptan	Diminuição de fungos e aumento de actinomicetos
Diieldrin	Severa depressão na população de bactérias nitrificadoras

No metabolismo de pesticidas, os organismos do solo usam várias reações bioquímicas (Matsumura, 1982). Em alguns casos, uma molécula de estrutura similar — natural ou sintética — pode induzir ou pelo menos estimular a habilidade de os organismos metabolizarem outra molécula específica (ver Capítulo 4 sobre Degradação de Pesticidas).

## Plantas

O impacto de pesticidas sobre plantas é geralmente tão dramático e devastador quanto sobre insetos e outros animais. Por exemplo, a exposição de uma planta sensível a um agente químico regulador de crescimento poderá provocar profundos efeitos no crescimento, perda de produtividade e até morte, dependendo da dose recebida. Com outros tipos de pesticidas, o efeito pode ser muito mais sutil. O impacto pode ser também a redução da produtividade ou a geração de resíduo e tornar uma cultura não comercializável, devido à presença de resíduo.

As plantas, a exemplo de outros organismos, como insetos ou bactérias, também podem desenvolver resistência a dado pesticida. O resultado dessa resistência pode ser o desenvolvimento de uma população de plantas que não pode ser controlada, mesmo com o uso de dosagens muito mais elevadas. O impacto pode estar na eliminação das espécies mais suscetíveis e a predominância daquelas que eram em menor número, porém mais tolerantes. Não é surpreendente a observação de que houve mudança na composição, abundância e diversidade de plantas invasoras em resposta ao uso de herbicidas. Em consequência, os vários segmentos (produtores, agrônomos, indústria agroquímica) estão constantemente se adaptando a novos problemas de plantas invasoras (Freemark & Boutin, 1995).

O herbicida 2,4-D causou sintomas e destruição de culturas suscetíveis como algodão e videira (Clare & Bruns, 1953; Goodman, 1953). Outros herbicidas, que igualmente têm causado injúrias a plantas sensíveis, pela deriva de área tratada a outra não-tratada, são o propanil e novos derivados fenoxi aromáticos (Madhun & Freed, 1990). Mas o herbicida não é a única classe de pesticidas cujos resíduos têm causado problemas (Westlake & Gunther, 1966). Inseticidas organoclorados, como resíduos do tratamento de solos em culturas anteriores, poderão estar disponíveis e aparecer como resíduos nas raízes de plantas de culturas posteriores ou transferir-se para as folhas, através da vaporização (Brown, 1978). Como contaminantes de solo, os pesticidas podem atingir a água por erosão do solo ou por lixiviação. Dependendo de sua toxicidade, estes podem afetar plantas aquáticas.

## Insetos

Do total de insetos aquáticos ou terrestres, cerca de 75% são de artrópodos, a maior classe do reino animal (Mulla *et al.*, 1981). Uma vasta gama de inseticidas é relativamente não-seletiva, com efeitos de amplo espectro e, portanto, seu uso é danoso às espécies-alvo, bem como aos competidores benéficos, predadores e parasitóides de insetos-praga-alvo (Ware, 1980). Os efeitos de pesticidas sobre as espécies de insetos aquáticos e terrestres, alvos ou não-alvos, estão discutidos em várias revisões (Muirhead-Thompson, 1987; Brown, 1978; Mulla *et al.*, 1981). Especial ênfase deve ser dada às abelhas, não só pelo valor econômico mas também por serem o principal polinizador. Toxicidade de pesticidas a esses organismos varia muito, dependendo da natureza química do composto, da formulação e do tempo de aplicação (Ware, 1980). A estimativa de perda de abelhas produtoras de mel, a perda de polinização e o impacto econômico estão resumidos na Tabela 3.

TABELA 3. Estimativa de valor (US\$) das perdas de abelhas produtoras de mel e perda de polinização por abelhas produtoras de mel e abelhas selvagens (citado por Pimentel *et al.*, 1993).

PERDAS	VALOR (US\$)
De e colônia	13,3 milhões/ano
De e mel e cera	25,3 milhões/ano
Do o potencial de produção de mel	27,0 milhões/ano
Da a rentabilidade da abelha para polinização	4,0 milhões/ano
De e polinização	200,0 milhões/ano
TOTAL	269,6 milhões/ano

Em revisão feita por Freemark & Boutin (1995) é citado que o uso de herbicidas afeta a abundância e a diversidade de insetos artrópodos no habitat terrestre em áreas cultivadas e em seus arredores. A abundância de insetos, em particular as espécies consideradas pragas, tem aumentado em resposta ao uso de herbicidas. Em contraste, observou-se um declínio na abundância de insetos benéficos. Shelton & Edwards (1983) encontraram em seus estudos aumento na abundância de insetos fitófagos em campos de soja tratados com herbicidas, embora seus predadores tenham diminuído em abundância. Sem os herbicidas, a presença de certas plantas invasoras em áreas de cultivo e arredores pode influenciar

na fauna de insetos, o que pode levar ao declínio de danos por pragas, comparados às monoculturas livres destas plantas invasoras (Altieri, 1981).

## Peixes

A ameaça de pesticidas aos peixes foi amplamente discutida por Johnson (1968), Brown (1978) e Holden (1973). A aplicação em grande escala de pesticidas no campo, florestas e rios tem impacto sobre peixes, resultando em mortalidade ou em efeitos mais leves na reprodução e no comportamento.

A toxicidade aguda, que resulta da exposição de curto-período à concentração letal de pesticida, tem causado perdas dramáticas de fontes de pesca nos Estados Unidos. A pulverização de florestas com pesticidas para o controle de insetos causou um grande prejuízo à importante população de peixes nos Estados Unidos e Canadá. Devido ao uso e descarte inadequado de pesticidas, por muitos anos, registraram-se mortes de peixes. Grande acúmulo de resíduos nos peixes, em todos os Estados Unidos, foi bem demonstrado (Henderson *et al.*, 1969; Johnson & Lew, 1970; Stucky, 1970; Hunter *et al.*, 1980; Schmitt *et al.*, 1981). Em 1967, a morte de cerca de 40 milhões de peixes no rio Reno foi atribuída ao esvaziamento do tanque de endosulfan para o rio, perto de Bonn (Brown, 1978). Mesmo na ausência de menores efeitos óbvios, esses resíduos podem aumentar a mortalidade de peixes através de falha na reprodução e aumento na suscetibilidade à predação, resultante da alteração de mobilidade e comportamento de alevinos (Johnson, 1973).

## Aves

Logo após o início da moderna era dos pesticidas, estudos demonstraram a toxicidade destes produtos aos animais, tais como as aves nativas, causando sua morte (Stewart *et al.*, 1946; Hotchkiss & Pough, 1946; Coburn & Treichler, 1946). Este fato foi, mais tarde, atribuído à pulverização das árvores com DDT para o controle de insetos vetores de doenças. Numerosa mortalidade de pássaros também foi registrada pelo uso de carbofuran (Flickinger *et al.*, 1986). Os pássaros morreram por terem se alimentado de sementes de arroz ilegalmente tratadas com carbofuran. Na Tabela 4 encontram-se exemplos de toxicidade de herbicidas e inseticidas às aves e mamíferos.

Resíduos de pesticidas em ovos reflete a concentração desses produtos nos tecidos de pássaros em certa época do ano e também mede a exposição embrionária (Stickel, 1973). A análise desses resíduos fornece um dado útil, através da comparação de impacto de pesticidas sobre as aves, em diferentes localizações geográficas. Embora o uso de pesticidas



organoclorados tenha sido banido, ou severamente restringido nos Estados Unidos, existe evidência de acumulação e persistência deles em animais selvagens.

Os resíduos de pesticidas têm mostrado redução após 1960. Em certas regiões, porém, apresentam altas concentrações ou têm mostrado, repetidamente, altos níveis de resíduos, particularmente de DDE(1,1-dicloro-2,2-bis) (Cain, 1981; Bunck *et al.*, 1987; White *et al.*, 1983; Henny *et al.*, 1982; Niemi *et al.*, 1986; DeWeese *et al.*, 1986).

TABELA 4. Toxicidade de alguns herbicidas e inseticidas comumente utilizados no Canadá e EUA (Freemark & Boutin, 1995).

TOXICIDADE ORAL AGUDA LD <sub>50</sub> (MG KG <sup>-1</sup> )	HERBICIDAS	INSETICIDAS
Toxicidade a aves		
Praticamente não-tóxico (> 2000)	Atrazina, butilate, 2,4-D, metil-diclofop, EPTC glifosato, metolaclor, triallate, trifluralina	Carbaril, hexacloro de benzeno (lindane)
Levemente tóxico (500-2000)	Alaclor, MCPA	Malathion
Moderadamente tóxico (51-500)	Cianazina	Metil-azínphos
Altamente tóxico (10-50)	Bromoxynil	Clorpirifos, fonofos, terbufos dimethoate
Extremamente tóxico (<10)		Carbofuran
Toxicidade a mamíferos		
Praticamente não-tóxico (> 2000)	Butylate, EPTC, glifosato metholaclor, trifluralina	Malathion
Levemente tóxico (500-2000)	Alaclor, atrazina, metil-diclofop, MCPA, pendimethalin, triallate	Carbaril, dimethoate
Moderadamente tóxico	Bromoxynil, cianazina, 2,4-D, difenzoquat	Clorpirifos, cloreto de benzeno (lindane),
Altamente tóxico (10-50)		Metil-azínphos, fonofos
Extremamente tóxico (<10)		Carbofuran, terbufos

MCPA=ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético; EPTC=etil dipropiltiocarbamato, 2,4-D=ácido (2,4-diclorofenóxi)acético

## **Mamíferos**

Os mamíferos, a exemplo de aves, raramente são expostos ao contato direto com os pesticidas, exceto nos casos de pulverização intencional ou por acidente. A morte de mamíferos se deve, geralmente, à ingestão de alimentos contaminados. Os mamíferos predadores acumulam maiores quantidades de resíduos do que os herbívoros ou outros mamíferos. Experimentos de alimentação indicam a existência de vasta variação entre indivíduos e entre espécies de animais, em termos de susceptibilidade aos pesticidas.

## **Efeito de Pesticidas sobre os Processos Biológicos do Solo**

A maioria dos efeitos diretos e indiretos de pesticidas relatados na literatura relaciona-se aos efeitos sobre a população de organismos individuais e como afetam as populações de outros organismos. Entretanto, às vezes, o impacto é tão drástico que pode influir no funcionamento do ecossistema como um todo.

## **Efeito sobre a Degradação da Matéria Orgânica do Solo**

A matéria orgânica é fragmentada e destruída pela ação de invertebrados do solo e por aqueles microrganismos que crescem sobre o material fragmentado. Durante o processo de degradação, nutrientes, como N, P e K, são liberados da matéria orgânica e retornam ao solo, onde ficam disponíveis às plantas. Os processos de decomposição podem influir na natureza estrutural e funcional de ecossistemas.

Muitos pesticidas tóxicos aos organismos-chave desse processo podem retardar consideravelmente a degradação, como é relatado para simazina (Edwards, 1989). A ocorrência de tais efeitos é muito mais frequente do que se relata em literaturas, devendo-se esse desvio ao fato de relativamente poucos pesticidas terem sido testados, quanto aos seus efeitos na degradação de matéria orgânica.

## **Efeito sobre a Respiração do Solo**

A respiração do solo é um parâmetro que mede a atividade geral dos microrganismos e invertebrados no solo. Portanto, solos que apresentam baixo índice de respiração ou são totalmente anaeróbios, acumulam matéria orgânica não decomposta e apresentam baixa fertilidade. Alguns microrganismos podem utilizar pesticidas como substratos, provocando assim um aumento significativo na respiração do solo. Entretanto, a maioria dos solos férteis apresenta tipicamente alta taxa de respiração e a su-

pressão respiratória por longo período, em geral, representa efeito negativo de pesticidas. São relativamente poucos os estudos realizados sobre efeitos de pesticidas na respiração do solo, a não ser a utilização desse índice na avaliação de efeitos sobre populações de microrganismos.

### **Efeito sobre a Ciclagem de Nutrientes**

Como o nitrogênio mineral é o principal componente da nutrição das plantas, juntamente com o carbono, é importante saber se os pesticidas, uma vez no solo, influem nos processos dinâmicos que afetam a disponibilidade do nutriente. Os componentes-chave de tais processos incluem a amonificação e a nitrificação como parte do processo de N-mineralização. Os dois processos são conduzidos pelas bactérias fixadoras de nitrogênio e estas podem ser sensíveis aos pesticidas. Há uma extensa literatura sobre esse tipo de estudo e relatos de observação da diminuição dos dois processos causados particularmente pelos herbicidas (Edwards, 1989).

### **Efeito sobre Processos Enzimáticos**

As enzimas têm importante função na ciclagem de nutrientes no solo, particularmente na dinâmica de mineralização e imobilização. Uma variedade de atividades enzimáticas tem sido medida nas amostras de solo, admitindo-se que tais processos são produtos extracelulares de microrganismos e plantas. A sua síntese e atividade podem ser influenciadas pelas características do solo, principalmente pelo pH. As atividades mais avaliadas e citadas em literatura são: atividade de fosfatase ácida e alcalina (APA), considerada responsável pela recirculação do fósforo (P) no ecossistema, através da catálise na reação de hidrólise de compostos orgânicos de P; atividade de urease por sua participação na degradação de uréia, adicionada ao solo como fertilizante sintético e pela excreção animal. A atividade de desidrogenase (DHA) representa a enzima oxidoreductase, que catalisa a oxidação de substratos, produzindo elétrons. Estes entram no sistema de transporte de elétrons da célula, podendo o parâmetro ser utilizado como medida da atividade microbiana. Outros processos enzimáticos menos investigados são a enzima amidase, que catalisa a hidrólise de amidas alifáticas, produzindo  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ , e seus substratos podem se tornar potencial fertilizante de solos. A nitrato-reductase é uma importante enzima no processo de denitrificação; as arilsulfatases (ASA) são enzimas que catalisam a hidrólise de ânions arilsulfatos pela quebra da ligação O-S, o que as torna importantes na ciclagem de S nos solos.

## Dinâmica de Pesticidas no Ambiente

Numa escala média ou global, o caminho percorrido pelo produto químico no ambiente é dependente de fatores majoritários dos sistemas ecológico/climático. Esses fatores incluem o fluxo de energia solar e o campo gravitacional, bem como gradientes atmosférico e aquático. Mesmo em escala global, a interação de propriedades físico-químicas de uma substância tem a sua função no transporte e disponibilidade. A níveis mais baixos de resolução ambiental, é provável que propriedades físicas, como a pressão de vapor, solubilidade em água e coeficiente de partição, sejam as mais importantes (Brown, 1978; Chiou *et al.*, 1977; Gillett *et al.*, 1974; Haque *et al.*, 1974; Kenaga, 1975). Na Tabela 5 encontram-se exemplos de interrelação entre propriedades físico-químicas e o comportamento ambiental. Grandes diferenças no comportamento ambiental de agentes químicos e minerais são atribuídas às propriedades físicas.

TABELA 5. Relação entre propriedades físico-químicas e o comportamento ambiental (Madhun & Freed, 1990).

DADOS FÍSICO-QUÍMICOS	PROCESSO RELACIONADO
Solubilidade em água	Lixiviação, grau de adsorção, mobilidade no ambiente e absorção pelas plantas.
Coeficiente de partição	Potencial de bioacumulação e adsorção na matéria orgânica.
Hidrólise	Persistência no ambiente ou na biota.
Ionização	Via e mecanismo de adsorção e absorção, persistência e interação com outras moléculas.
Pressão de vapor	Mobilidade atmosférica e velocidade de vaporização.
Reatividade	Metabolismo, degradação microbiológica, fotoquímica e autoquímica.

## Monitoramento Ambiental

Produtos químicos no ambiente podem gerar efeitos adversos na biota, na qualidade da água e do ar, na produtividade do solo. Por essas razões, é geralmente desejável monitorar sua aplicação ou liberação para assegurar-se de que tais efeitos adversos não ocorram. Na aplicação de pesticidas, o monitoramento pode ser útil quando há necessidade de se

modificar as técnicas de aplicação ou durante o uso de um produto em particular para evitar efeitos adversos (Neely, 1981). Levitan *et al.* (1995) fizeram uma revisão bastante ampla, considerando os mais variados questionamentos sobre o assunto.

Dentre os efeitos adversos que podem ser gerados pelos produtos químicos estão, como foi mencionado, os efeitos diretos sobre as espécies não-alvo, tais como a morte de plantas cultivadas, abelhas e pássaros ou envenenamento de peixes e outros organismos do ambiente, pelo contato direto com o produto pulverizado. Os produtos mais persistentes podem gerar efeitos mesmo a baixas concentrações, tais como a redução da produtividade ou a redução da capacidade reprodutiva das espécies (ex.: afinamento da casca do ovo em pássaros, devido à bioacumulação). Outro fator é a possibilidade de existência de resíduos no solo e sua absorção pela cultura subsequente ou de deriva do produto, permitindo resíduos na cultura atual (Brown, 1978).

No monitoramento ambiental, há a questão de quais amostras devem ser colhidas para o mapeamento de resíduos e uma avaliação do possível impacto benéfico ou adverso. Devem tomar amostras de água, solo, alguma biota disponível e ocasionalmente ar, para determinar a distribuição e o destino de resíduos. Em particular, quando se usam organofosforados, carbamatos ou piretróides sintéticos com persistência relativamente curta, deve-se amostrar água para assegurar-se de que peixes ou outros organismos aquáticos não foram adversamente afetados. Amostrar também plantas e outros organismos, na área tratada ou adjacente, para determinar níveis de resíduos e assegurar que não houve excessiva deriva, e possível acumulação, o que pode provocar efeito adverso na biota. Com produtos mais persistentes, tais como hidrocarbonetos clorados (ex.: lindane e dieldrin, que foram intensivamente utilizados no passado), podem ser encontrados resíduos no solo. Adicionalmente, podem-se amostrar água, plantas e animais que habitam no local ou outros organismos para determinar o grau de exposição que ocorreu durante e logo após a aplicação. Para seguir os níveis de resíduo no ambiente, por longo período, deve-se observar uma espécie acumuladora, tais como minhocas ou peixes, e relacionar o efeito sobre ela ou o nível de resíduo encontrado nas análises químicas ao resíduo ambiental (Blau *et al.*, 1975; Neely, 1981).

Na avaliação de risco de locais contaminados não se tem levado em consideração processos lentos que ocorrem no meio ambiente e que possivelmente podem reduzir o impacto de compostos tóxicos depositados no solo, em particular aqueles compostos que não são lixiviados e não oferecem risco de contaminação de aquíferos. Em recentes estudos, acumularam-se evidências de que a disponibilidade de certos compos-

tos orgânicos muda conforme estes ficam depositados no solo por certo tempo, processo chamado de "envelhecimento". Há dados que sugerem a existência do mecanismo de sequestração de moléculas orgânicas para dentro da matriz do solo. O declínio da disponibilidade e a sequestração parecem estar relacionados; conseqüentemente, esses fatores têm grande relevância na avaliação da toxicidade, na determinação de risco e na regulamentação da remediação de locais contaminados (Alexander, 1995).

## CONCLUSÃO

O impacto ambiental de pesticidas é extremamente diverso, mostrando-se alguns efeitos relativamente óbvios e outros extremamente discretos e complexos. Alguns são bastante específicos e outros amplos e não tão óbvios. Os efeitos podem ser resumidos em três principais áreas:

### Impacto de Pesticidas sobre a Biodiversidade

Um dos efeitos mais marcantes foi sobre aves, particularmente aquelas que pertencem ao nível trófico mais elevado na cadeia alimentar, através da bioconcentração de inseticidas organoclorados. As aves que se alimentam de grãos e vegetais também são suscetíveis aos pesticidas pela contaminação de seus alimentos (Hardy, 1990). Também foi detectada drástica diminuição na população de aves que se alimentam de insetos, devido à perda de seu alimento no campo em decorrência do uso de inseticidas.

Um segundo impacto mais importante foi registrado nos peixes e crustáceos marinhos, dada contaminação do sistema aquático por pesticidas. Esse impacto resultou não somente do uso deles na agricultura, mas também pela descarga de efluentes industriais nos cursos de água. Um dos exemplos clássicos é o do rio Reno (Alemanha). É difícil avaliar com exatidão a extensão global dos efeitos de pesticidas sobre os peixes. Além do mais, muitos organismos que servem de alimento a peixes são bastante suscetíveis a pesticidas. Assim, os efeitos indiretos sobre a suplementação de alimentos aos peixes podem ter maior impacto nas populações destes.

Sabe-se que as abelhas são extremamente importantes na polinização. Embora em muitos países os pesticidas sejam testados quanto à sua toxicidade sobre esses insetos antes de serem registrados para uso, e o uso de pesticidas tóxicos às abelhas seja permitido somente em condições restritas, ainda assim, há registro de sérias perdas de produtividade por falta de polinização (Pimentel *et al.*, 1993).

A literatura sobre controle de pragas está repleta de exemplos sobre o aparecimento de novas espécies, devido à eliminação de seus inimigos naturais. A quebra da cadeia alimentar dessa natureza leva à situação de maior dependência de pesticidas organossintéticos para se continuar produzindo (Pimentel *et al.*, 1993).

Uma revisão mais completa de efeitos de herbicidas sobre a flora e a fauna não-alvos pode ser encontrada em Freemark & Boutin (1994). McLaughlin & Mineau (1995) descreveram o impacto de práticas agrícolas sobre a biodiversidade.

### **Impacto sobre o Solo e a Água**

Efeito direto muito sério sobre a estrutura e fertilidade do solo é pouco provável, mas existem efeitos indiretos muito mais difíceis de serem avaliados ou quantificados. A revisão de Doran *et al.* (1996) sobre a saúde do solo e sustentabilidade é bastante completa, englobando o uso de pesticidas e seus efeitos sobre a qualidade do solo.

O movimento de pesticidas para águas superficiais e subterrâneas está bem documentado, com relatos de contaminação de águas potáveis e sua conseqüência sobre os animais selvagens e o homem, ocasionalmente incluindo toxicidade aguda. Os sedimentos de leitos de rio se tornam, muitas vezes, tão contaminados que sua remediação é difícil ou praticamente impossível.

O nitrato na água potável pode causar doenças fatais, mas também provocar efeitos carcinogênicos indiretos se transformado no corpo em nitrosaminas (Clancy, 1986). As nitrosaminas podem se formar também da reação entre o nitrato e a atrazina, herbicida comumente encontrado na água de poços de regiões produtoras de milho (Culliney *et al.*, 1992).

### **Impacto sobre o Ser Humano**

Com certeza os impactos na biodiversidade, no solo e na água afetam fortemente a qualidade de vida do ser humano. Entretanto, outra preocupação crescente é a relacionada com a existência de resíduos de pesticidas no alimento e na água potável, alguns com suspeita de serem carcinogênicos. Ao longo dos últimos 50 anos, foram registrados muitos casos de doenças e óbitos causados por pesticidas, chegando esse número a 20.000 mortes/ano (Edwards, 1993). Em muitos desses casos houve exposição acidental aos pesticidas, sendo que os acidentes mais comuns registrados aconteceram com os produtores e aplicadores. No entanto, há ocorrência de desastres maiores como o de Bhopal (Índia), onde houve a morte de 2.500 a 5.000 pessoas devido ao metil isocianato; o

acidente com TCDD (tetraclorodibenzodioxina) na Itália, onde 32.000 pessoas foram afetadas e 459 pessoas morreram, além do registro de 6.070 casos de doença, causados pela ingestão de grãos tratados com pesticidas (Hayes & Lawes, 1991).

Pode-se concluir com clareza que os aspectos descritos dão suporte à natureza do custo ambiental e social do uso de pesticidas e enfatizam a necessidade de uma pesquisa muito mais minuciosa e complexa do que se pensava necessária há poucas décadas. Pesticidas são e continuarão a ser ferramentas valiosas no controle de pragas, porém seu uso deve estar associado a uma análise de custo/benefício social e ambiental mais preciso e realístico, para que se possam minimizar os riscos e maximizar o retorno de benefícios dessa estratégia de controle de pragas, tanto para a sociedade quanto para o meio ambiente.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKISSON, P.L. The integrated control of the insect pests of cotton. **Tall Timbers Conference on Ecological Control and Habitat Management**, v.4, p.175-188, 1972.
- ALEXANDER, M. How toxic are toxic chemicals in soil? **Environmental Science & Technology**, v.29, n.11, p.2713-2717, 1995.
- ALTIERI, M.A. Crop-weed-insect interactions and the development of pest-stable cropping systems. In: THRESH, J.M., ed. **Pests, pathogens and vegetation: the role of weeds and wild plants in the ecology of cropland pest diseases**. London: Pitman, 1981. p.459-466.
- ANDERSON, J.R. Pesticide effects on non-target soil microorganisms. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L., ed. **Pesticide microbiology** London: Academic Press, 1978. p.313-533.
- AUDUS, L.J. Herbicide behaviour in the soil. In: AUDUS, L.J., ed. **The physiology and biochemistry of herbicides** London: Academic Press, 1964. p.163-206.
- BLAU, G.E.; NEELY, W.B.; BRANSON, D.R. Ecokinetics: A study of the fate and distribution of chemicals in laboratory ecosystems. **American Institute of Chemical Engineering Journal**. v.21, p.854-861, 1975.
- BOYD, C.E.; FERGUSON, D.E. Susceptibility and resistance of mosquito fish to several insecticides **Journal of Economic Entomology**, v.57, p.430-431, 1964.
- BROWN, A.W.A. **Ecology of pesticides** New York: John Wiley, 1978.
- BUNCK, C.M.; PROUTY, R.M.; KRYNITSKY, A.J. Residues of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in starlings (*Sturnus vulgaris*), from the continental United States 1982. **Environmental Monitoring & Assessment**, v.8, p.59-75, 1987.
- CAIN, B.W. Nationwide residues of organochlorine compounds in wings of adult mallards and black ducks, 1979-1980. **Pesticide Monitoring Journal**, v.15, p.128-134, 1981.
- CHENG, H.H. Pesticides in the soil environment. In: CHENG, H.H., ed. **Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 1990, p.1-5.
- CHIOU, C.T.; FREED, V.H.; SCHMEDDING, D.W.; KOHNERT, R.L. Partition coefficient and bioaccumulation of selected organic chemicals. **Environmental Science & Technology**. v.11, p.475-478, 1977.
- CLANCY, K.L. The role of sustainable agriculture in improving the safety and quality of the food supply. **American Journal of Alternative Agriculture**. v.1, p.11-18, 1986.

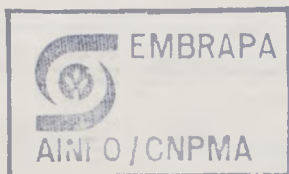


- CLORE, W.J.; BRUNS, V.F. The sensitivity of concord grapes to 2,4-D. **Proceedings. American Society of Horticulture**, v.61, p.125-134, 1953.
- COBURN, D.R.; REICHLER, R. Experiments on toxicity of DDT to wildlife. **Journal of Wildlife Management**, v.10, p.208-216, 1946.
- COLLINS, P.J. Resistance to grain protectants in field populations in sawtoothed grain beetle in Southern Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.25, p.683-686, 1985.
- CONACHER, J.; CONACHER, A. **Herbicides in agriculture: minimum tillage, science and society**. Nedlands: University of Western Australia, 1986. 169p. (Geowest, n.22).
- CULLINEY, T.W.; PIMENTEL D.; PIMENTEL, M.H. Pesticides and natural toxicants in foods. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.41, p.297-320, 1992.
- DAVIS, B.N.K.; WILLIAMS, C.T. Buffer zone widths for honeybees from ground and aerial spraying of insecticides. **Environmental Pollution**, v.63, p.247-259, 1990.
- DeWEESE, L.R.; McEWEN, L.C.; HENSLER, G.L.; PETERSEN, B.E. Organochlorine contaminants in passeriformes and other avian prey of the peregrine falcon in the western United States. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v.5; p.675-693, 1986.
- DORAN, J.W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M.A. **Soil health and sustainability**. New York: Academic Press, 1996., v.56, p.1-54. Academic Press, 1996. (Advances in Agronomy, 56).
- ECKERT, J.W. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: DELP, C.J., ed. **Fungicide resistance in North America**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1988. p.1-3.
- EDWARDS, C.A. Impact of herbicides on soil ecosystems. **Critical Reviews in Plant Science**, v.8, p.221-257, 1989.
- EDWARDS, C.A. The impact of pesticides on the environment. In: PIMENTEL, D.; LEHMAN, H. ed **The pesticide question: environment, economics and ethics**. London: Chapman and Hall, 1993. p.13-46.
- EISLER, R.; JACKNOW, J. **Toxaphene hazards to fish, wildlife and invertebrate: a synoptic review**. Washington DC, U.S. Government Printing Office, 1985. (U.S. Fish Wildlife Service Biology Report, 85).
- ELLIOTT, J.G.; WILSON, B.J. ed. The influence of the weather on the efficiency and safety of pesticide application: the drift of herbicides. Croydon: British Crop Protection Council, 1983. 135p. (BCPC Occasional Publications, 3).
- FERGUSON, D.E. The effects of pesticides on fish: changing patterns of speciation and distribution. In: GILLET, J.W., ed. **The biological impact of pesticides in the environment**. Corvallis: Oregon State University Press, 1970. p.83-86.
- FLICKINGER, E.L.; MITCHELL, C.A.; WHITE, D.H.; KOLBE, E.J. Bird poisoning from misuse of the carbamate furadan in Texas rice field. **Wildlife Society Bulletin**, v.14, p.59-62, 1986.
- FRED, V.H. Global distribution of pesticides. In: GILLET, J.W., ed **The biological impact of pesticides in the environment**. Corvallis: Oregon State University Press, 1970. p.1-10.
- FREEMARK, K.; BOUTIN, C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.52, p.67-91, 1995.
- GEORGHIOU, G.P. **The magnitude of the resistance problem: pesticide resistance, strategies and tactics for management**. Washington: National Academy of Sciences, 1986. p.18-41.
- GEORGHIOU, G.P. Overview of insecticide resistance. In: GREEN, M.B.; LE BARON, H.M.; MOBERG, W.K. ed. **Managing resistance: from fundamental research to practical strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.18-41.
- GILLET, J.W.; HILL IV, J.; JARVINEN, A.W.; SCHOOR, W.P. **A conceptual model for the movement of pesticides through the environment**. Washington, DC, U.S. Government Printing Office, 1973. (USEPA EPA-660/3-74-024)
- GOODMAN, V.H. 2,4-D injury to cotton. **Mississippi Agriculture Experimental Station Circular**, v.185, 1953.

- GROVER, R. Transport of wild oat herbicides in the environment. In: SMITH, A.E., ed **Proceedings of the wild oat symposium**. Regina: Canadian Plains Research Center, University of Regina, 1983. p.119-132.
- GRUE, C.E.; TOME, M.W.; DeWEESE, L.R.; MINEAU, P.; SWANSON, G.A.; FOSTER, J.R.; ARNOLD, P.M.; HUCKINS, J.N.; SHEEHAN, P.J.; MARSHALL, W.K.; LUDDEN, A.P. Potential impacts of agricultural chemicals on waterfowl and other wildlife inhabiting prairie wetlands: an evaluation of research needs and approaches. **Transactions North American Wildlife National Research Conference**. v.51, p.357-383, 1986.
- HAQUE, R.; SCHMEDDING, D.W.; FREED, V.H. Aqueous solubility, adsorption, and vapor behavior of polychlorinated biphenyl arochlor 1254 **Environmental Science & Technology**, v.8, p.139-142, 1974.
- HARDY, A.R. Estimating exposure: the identification of species at risk and routes of exposure. In: SOMERVILLE, L.; WALKER, C.H. ed **Effects of pesticides on terrestrial wildlife**. London: Taylor & Francis, 1990. p.81-97.
- HARRIS, C.R. Factors influencing the effectiveness of soil insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.17, 177-198, 1972.
- HAYES, W.J.JR.; LAWES, E.R. Handbook of pesticide toxicology. New York: Academic Press, 1991. 3v.
- HENDERSON, C.; JOHNSON, W.L.; INGLIS, A. Organochlorine insecticide residues in fish **Pesticide Monitoring Journal**. v.3, p.145-171, 1969.
- HENNY, C.J.; BLUS, L.J.; PROUTY, R.M. Organochlorine residues and shell thinning in Oregon seabird eggs. **Murrelet**. v.63, p.15-21, 1982.
- HOLDEN, A.V. Effects of pesticides on fish. In: EDWARDS, C.A., ed. **Environmental pollution by pesticides**. New York: Plenum Press, 1973. p.213-253.
- HOTCHKISS, N.; POUGH, R.H. Effect on forest birds of DDT used for gypsy moth control in Pennsylvania **Journal of Wildlife Management**. v.10, p.202-207, 1946.
- HUNTER, R.G.; CARROLL, J.H.; RANDOLPH, J.C. Organochlorine residues in fish of lake Texoma, October 1979 **Pesticide Monitoring Journal**, v.14, p.102-107, 1980.
- JOHNSON, D.L. Pesticides and fishes - a review of selected literature. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.97, p.398-424, 1968.
- JOHNSON, D.W. Pesticide residues in fish. In: EDWARDS, C.A. ed. **Environmental pollution by pesticides**. New York: Plenum Press, 1973. p.181-212.
- JOHNSON, D.W.; LEW, S. Chlorinated hydrocarbon residues in representative fishes of southern Arizona. **Pesticide Monitoring Journal**, v.4, p.57-61, 1970.
- KENAGA, E.E. Partitioning and uptake of pesticides in biological systems. In: HAQUE, R.; FREED, V.H., ed. **Environmental dynamics of pesticides**. New York: Plenum Publ. Corp.1975. p.217-273.
- KLINGMAN, G.C.; ASHTON, F.M.; NOORDHOFF, L.J. **Weed science: principles and practices**. 2.ed. New York: John Wiley, 1982, 449p.
- LE BARON, H.M.; MCFARLAND, J. Herbicide resistance in weeds and crops. In: GREEN, M.B.; LE BARON, H.M.; MOBERG, W.K. ed. **Managing resistance: from fundamental research to practical strategies**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1990. p.336-352.
- LEVITAN, L.; MERWIN, I.; KOVACH, J. Assessing the relative impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.55, p.153-168, 1995.
- MADHUN, Y.A.; FREED, V.H. Impact of pesticide on the environment. In: CHENG, H.H. ed. **Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.429-466. (SSSA Book Series, 2).
- MATSUMURA, F. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In: MATSUMURA, F.; KRISHNA MUKTI, C.R., ed. **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum Press, 1982. p.67-90.
- MCLAUGHLIN, A.; MINEAU, P. The impact of agricultural practices on biodiversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.55, p.201-212, 1995.

- MILIO, J.F.; KOEHLER, P.G.; PATTERSON, R.S. Evaluation of three methods for detecting chloropyrifos resistance in German cockroach (Orthoptern: Blattellidae) populations. **Journal of economic entomology**, v.30, p.44-46, 1987.
- MUIRHEAD-THOMPSON, R.C. **Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- MULLA, M.S.; MIAN, L.S.; KAWECKI, J.A. Distribution, transport, and fate of the insecticides malathion and parathion in the environment. **Residue Review**, v.81, p.1-159, 1981.
- NAS. **Pest control: an assessment of present and alternative technologies**. Washington, D.C.: National Academy of Science, 1975. 4v.
- NAS. **Malaria prevention and control**. Washington, D.C.: National Academy of Science, 1991.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Alternative agriculture**. Washington, D.C.: National Research Council, 1989. 448p.
- NEELY, W.B. Chemicals in the environment. In: **Proceedings. USEAP Workshop Transport and Fate of Toxic Chemicals in the Environment**. New York: Marcel Dekker, 1981.
- NIEMI, G.J.; DAVIS, T.E.; VEITH, G.D.; VIEUX, B. Organochlorine chemical residues in herring gulls, ring-billed gulls, and common terns of western Lake Superior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.15, p.313-320, 1986.
- ODENKIRCHEN, E.W.; EISLER, R. **Chloropyrifos hazards to fish, wildlife, and invertebrate**: synoptic review. Washington, DC: U.S. Gov. Print. Office, 1988. (U.S. Fish Wildlife Service Biology Report, 85).
- OECD. Organization of Economic Cooperation and Development. **Report of the OECD workshop on ecological effects assessment**. Paris: OECD, 1989. 67p. (OECD Environment Monograph, 26).
- PARR, J.F. Effect of pesticides on microorganisms in soil and water. In: GUENZI, W.D., ed. **Pesticides in soil and water**. Madison: Soil Science Society of America, 1974. p.315-340.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. Organic chemicals in the environment. In: PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F., ed. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p.185-215.
- PIMENTEL, D.; ACQUAY, H.; BILTONEN, M.; RICE, P.; SILVA, M.; NELSON, J.; LIPNER, V.; GIORDANO, S.; HOROWITZ, A.; D'AMORE. Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In: PIMENTEL, D.; LEHMAN, H., ed. **The pesticide question: environment, economics, and ethics**. London: Chapman & Hall, 1993. p.47-84.
- POSTER, J. Command herbicide. The rookie battles controversy. **Crops Soils Magnification**, v.39, p.9-11, 1986.
- RENNE, D.S.; WOLF, M.A. Experimental studies of 2,4-D herbicide drift characteristics. **Agricultural Meteorology**, v.20, p.7-24, 1979.
- REUBEN, R. Obstacles to malaria control in India - the human factor. In: SERVICE, W.W., ed. **Demography and vector-borne diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.143-154.
- RUSSELL, E.W. **Soil conditions and plant growth**. 10.ed. London: Longman, 1973.
- SCHMITT, C.J.; LUDKE, J.L.; WALSH, D.F. Organochlorine residues in fish: National pesticide monitoring program, 1970-74. **Pesticide Monitoring Journal**, v.14, p.136-155, 1981.
- SHEEHAN, P.J.; BARIL, A.; MINEAU, P.; SMITH, D.K.; HARFENIST, A.; MARSHALL, W.K. **The impact of pesticides on the ecology of prairie nesting ducks**. Ottawa: Canadian Wildlife Service, Environment Canada, 1987. 641p. (Technical Report Series, 19).
- SHEEHAN, P.J.; LOUCKS, O.L. Effects characterization. In: U.S. Environmental Protection Agency. **Ecological Risk Assessment**. Washington: EPA, 1995. (Issue Papers).
- SHELTON, D.M.; EDWARDS, C.R. Effects of weeds on the diversity and abundance of insects in soybeans. **Environmental Entomology**, v.12, p.296-298, 1983.
- STEWART, R.E.; COPE, J.B. ROBBINS, C.S.; BRAINERD, J.W. Effects of DDT on birds at the Patuxent research refuge. **Journal of Wildlife Management**, v.10, p.195-201, 1946.

- STICKEL, L.F. Pesticide residues in birds and mammals. In: EDWARDS, C.A., ed. **Environmental pollution by pesticides**. London: Plenum Press, 1973. p.254-333
- STUCKY, N.P. Pesticide residues in channel catfish from Nebraska. **Pesticide Monitoring Journal**, v.4, p.62-66, 1970.
- TERRIERE, L.C.; KIIGEMAGI, U.; GERLACK, A.R.; BOROVIKA, R.L. The presence of toxaphene in lake water and its uptake in aquatic plants and animals. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.14, p.66-69, 1966.
- UNEP. **The state of the environment**: selected topics - 1979. Nairobi: United Nations Environment Programme, Governing Council, Seventh Session, 1979.
- VINSON, S.B.; BOYD, C.E.; FERGUSON, D.E. Resistance to DDT in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. **Science**, v.139, p.217-218, 1963.
- WARE, G.W. Effects of pesticides on nontarget organisms. **Residue Review**, v.76, p.173-201, 1980.
- WARE, G.W.; CAHILL, W.P.; GERHARAT, P.D.; WITT, J.M. Pesticide drift, IV. On target deposits from aerial application of insecticides. **Journal of Economic Entomology**. v.63, p.1982-1983, 1970.
- WESTLAKE, W.E.; GUNTHER, F.A. **Occurrence and mode of introduction of pesticides in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1966. (ACS, 60).
- WHITE, D.H.; MITCHELL, C.A.; KAISER, T.E. Temporal accumulation of organochlorine pesticides in shorebirds wintering on the south Texas coast, 1979-1980. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.12, p.241-245, 1983
- WHITE, D.H.; KRYNITSKY, A.J. Wildlife in some areas of New Mexico and Texas accumulate elevated DDE residues, 1983. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.15, p.149-157, 1986.
- WHO. World Health Organization press release. **Tropical Diseases News**. v.31, p.3, 1990.





Impresso em offset

**H** HAMBURG  
GRAFICA  
EDITORA

Rua Bogart, 64 - V. Yermala  
04298-020 São Paulo - SP  
Fone: (011) 6946-0233  
Telefax: (011) 6914-4773

com filmes fornecidos pelo editor

EMBRAPA

FICHA DO LIVRO

576

M528m

AUTOR MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.  
L. de, ed.

TÍTULO: Microbiologia ambiental.

DEVOLVER EM


NOME DO LEITOR

07/05/98

Adelino César Resenfi

19/08/98

Adelino César Resenfi

  
Embrapa



---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*  
*Centro Nacional de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental*  
*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

