

C. M. Martinez¹, *C. M. M. S. Silva² e A. N. H. Maia²

- 1- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Rua Monteiro Lobato 80, C. P. 6121, Campinas, Sp, Brasil, CEP 13083-862. E-mail: camila@fea.unicamp.br
 2- Embrapa Meio Ambiente- C. P. 69- Jaguariúna, SP, Brasil, CEP 13820-000. *E-mail: celia@cnpma.embrapa.br

RESUMO. Linhagens fúngicas isoladas da rizosfera de arroz foram avaliadas quanto ao seu potencial ligninolítico e algumas demonstraram que poderiam ter aplicabilidade em estudos de degradação de agrotóxicos. O presente trabalho avaliou uma dessas linhagens quanto a capacidade de degradação do herbicida propanil e de seu metabólito 3,4 dicloroanilina (3,4-DCA). A linhagem P3SA1F foi cultivada em meio Czapek sólido suplementado com duas concentrações de sacarose e com diferentes concentrações de propanil e/ou 3,4-DCA (2,5; 5,0; 10; 15; 20; 25 e 50 µg mL⁻¹). Colônias que cresceram nesses meios foram avaliadas quanto a capacidade de degradar ambos os compostos em meio Czapek líquido, suplementado nas concentrações de 2,5 e 25 µg mL⁻¹. A determinação quantitativa dos resíduos dos herbicidas foi realizada por cromatografia gasosa. Paralelamente foi quantificada a biomassa formada. O crescimento do fungo foi afetado proporcionalmente pelas doses aplicadas do herbicida e do metabólito. Observou-se que a linhagem fúngica P3SA1F apresentou um período de adaptação antes de iniciar a degradação do herbicida. Aos 28 dias de incubação a taxa de degradação encontrada foi de 66,41 % para a concentração de 2,5 µg mL⁻¹, e de 62,34 % para a de 25 µg mL⁻¹. Não foi detectada a presença de 3,4-dicloroanilina.

ABSTRACT. Fungi strains isolated from rice rhizosphere which demonstrated lignolitic potential, also showed applicability in studies of pesticide degradation. This work evaluated one of those strains for its ability to degrade propanil and its metabolite 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). The P3SA1F strain was grown in solid Czapek medium supplemented with two sucrose concentrations and variable propanil or 3,4-DCA concentrations (2.5; 5.0; 10.0; 15.0; 25.0 and 50.0 µg mL⁻¹). Colonies that grew in these medium were evaluated for their ability to degrade both compounds in liquid Czapek medium supplemented with propanil at concentrations of 2.5 and 25.0 µg mL⁻¹. Gas chromatography was used to quantify propanil and 3,4-DCA. The fungi growth rate was proportionally affected by propanil and 3,4-DCA concentrations. The P3SA1F strain showed a lag time before propanil degradation. After 28 days the degradation rates of 66 and 62% were observed for propanil concentrations of 2.5 and 25 µg mL⁻¹ respectively. 3,4-DCA was not observed in the propanil degradation studies.

1.- Introdução

O propanil (3',4'-dicloropropionanilina) (Figura 1) é um herbicida seletivo de contato pós-emergente, derivado das cloroanilidas, utilizado intensivamente na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) para o controle de plantas daninhas de folha larga e estreita (Alawi, 1982). Tem meia-vida de aproximadamente 1 ano, e sofre clivagem hidrolítica quando em meio fortemente ácido e alcalino, dando origem a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA, Figura 1) e ácido propiônico. É estável em pH entre 4 e 9 (Tomlin, 1997).

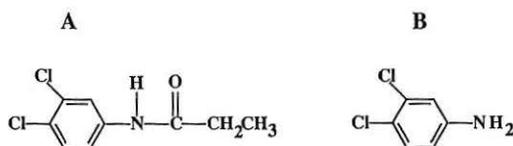


Figura 1. Estrutura do herbicida propanil (A) e seu metabólito 3,4-DCA (B)

As cloroanilinas adsorvem às substâncias húmicas presentes no solo, podendo permanecer ligadas por anos após a aplicação. Também estão sujeitas à dimerização e polimerização formando compostos azo, altamente estáveis e resistentes à mineralização (Brunsbach & Reineke, 1993; Kremer & Sterner, 1996).

Várias bactérias, algumas isoladas de cultivo de arroz, foram selecionadas pela capacidade de degradar cloroanilinas, tais como *Comamonas testosteroni* (Boon et al., 2000), *Pseudomonas acidovorans* BN3.1 (Brunsbach & Reineke, 1993), *Proteus mirabilis* (Correa & Steen, 1995), *Aquaspirillum* sp e *Paracoccus denitrificans* 3CA (Surovtseva et al., 1996). A bactéria *Pseudomonas fluorescens* biotipo II, hidrolisou propanil à 3,4-DCA (Zablotowicz et al., 2001).

Entre os fungos, a espécie *Phanerochaete chrysosporium* foi responsável pela degradação de 3,4-DCA em meio de cultura com limitação de nitrogênio (N). No processo, os principais metabólitos formados foram N-(3,4-diclorofenil)-α-cetoglutaril-δ-amida (DCAX) e DCA-succinimida (DCASI), o qual teve concentração máxima aos 10 dias de incubação. O primeiro também foi detectado em meios de cultura com limitação de carbono (C) ou suplementação de N e C (Sandermann, et al., 1998). Os autores não encontraram correlação entre a atividade da enzima lignina peroxidase e a degradação de 3,4-DCA. Outros fungos têm sido envolvidos na degradação de 3,4-DCA. Entre eles se pode citar o basidiomiceto *Filoboletus* TA9054, cujo metabólito

formado no processo, em maior quantidade, foi o 3,3',4,4'-tetracloroazobenzeno (TCAB) (Kremer & Sterner, 1996).

Silva et al. (2003), isolaram em culturas de arroz irrigado do estado de Santa Catarina, linhagens fúngicas consideradas potenciais degradadoras de compostos orgânicos. Verificaram o potencial ligninolítico destas linhagens e constataram que apenas duas linhagens (P3SA1F e P11SA2F) poderiam ter aplicabilidade em estudos de degradação de compostos orgânicos. O presente trabalho avaliou o potencial de uma dessas linhagens pré-selecionadas para a degradação do herbicida propanil e de seu metabólito 3,4-DCA.

2.- Material e Método

2.1 Crescimento miceliano (CM)

A linhagem P3SA1F foi cultivada em meio Czapek sólido ($3 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$, $1 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g L^{-1} ágar), suplementado com sacarose (0 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e com diferentes concentrações de propanil ou 3,4-DCA (2,5; 5,0; 10; 15; 20; 25 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). O desenvolvimento das colônias foi avaliado após 2, 4, 6, 7, 9, 11 e 14 dias da semeadura, registrando-se nessas datas, o diâmetro da colônia em cada placa. Taxas médias do crescimento miceliano foram calculadas para cada unidade experimental, dividindo-se a diferença entre o acréscimo no diâmetro miceliano entre os dias 2 e 14 pelo intervalo de tempo (12 dias).

Neste experimento foi utilizado o delineamento estatístico completamente casualizado com cinco repetições. O efeito das doses de sacarose, do herbicida ou 3,4-DCA, e de sua interação sobre a taxa de crescimento miceliano (TCM) foi investigado utilizando-se análise de variância e testes F de Snedecor. Em cada ensaio, foram ajustados modelos de regressão linear para descrever o efeito da dose do composto orgânico avaliado sobre a TCM.

2.2 Avaliação da degradação dos herbicidas

Para avaliar a capacidade da linhagem fúngica em degradar o propanil e 3,4-DCA, três discos de crescimento ($\varnothing 5\text{mm}$) da linhagem fúngica P3SA1F, crescida em meio de cultura sólido contendo batata-dextrose-ágar (200 mL caldo de batata, 20 g L^{-1} dextrose, 16 g L^{-1} ágar, 800 mL água destilada), foram transferidos para Erlenmeyers contendo meio de cultura Czapek líquido suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose e com propanil nas concentrações de campo ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e dez vezes superior a esta ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). As culturas foram incubadas a 28°C sob agitação constante (160rpm). O tratamento controle constou de meio de cultura sem microrganismo. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com os fatores fungo (com e sem) e tempos de avaliação (2, 4, 8, 18 e 28 dias após incubação), arrançados em esquema fatorial.

O propanil foi extraído do meio de cultura com diclorometano:acetona (1:1). A fase orgânica, foi evaporada

e o resíduo retomado em isoctano. A determinação quantitativa do propanil foi realizada em cromatógrafo gasoso, modelo HP 5890, com detector de captura de elétrons. As condições cromatográficas foram: nitrogênio (N_2) como gás de arraste; fluxo de $5,4 \text{ mL min}^{-1}$; temperatura do detector 300°C ; temperatura do injetor 270°C ; coluna HP-1 30 m x $0,53 \text{ mm}$ x $1,5 \mu\text{m}$; temperatura do forno $80^\circ\text{C}/1 \text{ minuto}$, $25^\circ\text{C min}^{-1}$ até $270^\circ\text{C}/10\text{min}$.

A 3,4 dicloroanilina foi quantificada aos 18 e 28 dias após incubação. O metabólito foi destilado-extraído em Bleidner, com água, e posteriormente extraído em isoctano. A fase aquosa foi novamente extraída com 4x 25 mL de isoctano. A fase orgânica resultante foi evaporada até a secura e retomada em tolueno. A quantificação foi feita em cromatógrafo gasoso, modelo HP 6890, com detector termoiônico específico para nitrogênio e fósforo (NPD). As condições cromatográficas foram: hélio como gás de arraste; fluxo de 6 mL min^{-1} ; temperatura do detector 325°C ; temperatura do injetor 260°C ; coluna: DB-1 30m x $0,32\text{mm}$ x $1\mu\text{m}$; temperatura do forno $60^\circ\text{C}/1 \text{ minuto}$, $25^\circ\text{C min}^{-1}$ até 250°C .

Os cálculos para quantificação do propanil e de 3,4 DCA foram baseados em curvas de calibração, obtidas para soluções padrões em concentrações conhecidas.

A avaliação da biomassa fúngica ocorreu paralelamente ao experimento de degradação. A biomassa foi filtrada em funil de Büchner e seca em estufa a 55°C até peso constante.

3.- Resultados e Discussão

O crescimento da linhagem fúngica P3SA1F foi avaliado tanto na presença do herbicida propanil quanto de seu metabólito 3,4-DCA. Foi observado que ambas as moléculas inibiram o crescimento fúngico, proporcionalmente à dose aplicada. Na dose máxima ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) tanto na presença como na ausência de sacarose, a linhagem apresentou uma inibição média na TCM, de 80,25 e 91,9 % na presença de propanil e 3,4-DCA, respectivamente. Houve uma redução média na TCM, em relação ao controle, de 37,3 e 65,1% na presença de 3,4-DCA ($15, 20$ e $25\mu\text{g mL}^{-1}$) sem e com adição de sacarose respectivamente. O que também foi observado na presença de propanil, cuja redução foi de 29% na ausência de sacarose, para a dose $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, e em média de 47,8% na presença de sacarose, para as doses 20 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados para descrever a variação nas TCM em função das doses dos xenobióticos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão linear que descrevem variações nas taxas de crescimento micelial da linhagem fúngica P3SA1F em função de doses do herbicida propanil e de seu metabólito 3,4-D, em meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

Dose de sacarose (g.L ⁻¹)	Variável dependente	Produto	Parâmetro	Estimativa (mm)	Erro padrão (mm)	Valor p*
0	Taxa de crescimento (Tx)	Propanil	α	5,2880	0,1050	<0,0001
			β	-0,0880	0,0045	<0,0001
		3,4-DCA	α	4,6471	0,0993	<0,0001
			β	-0,0765	0,0665	<0,0001
10	Log ₁₀ (Tx)	Propanil	α	0,7534	0,0107	<0,0001
			β	-0,0180	0,0004	<0,0001
		3,4-DCA	α	0,7069	0,0206	<0,0001
			β	-0,0218	0,0009	<0,0001

*Níveis de significância nominais associados aos testes t bilaterais para as hipóteses α=0 ou β=0.

Os efeitos das doses de sacarose, propanil ou 3,4-DCA e suas interações foram significativos (Teste F, p <0,0001). Os coeficientes de variação foram inferiores a 8%, indicando que grande parte da variabilidade da taxa de crescimento miceliano foi explicada pelos fatores avaliados.

Observou-se que a taxa diária de crescimento na ausência de sacarose foi maior do que aquela na presença da mesma, sendo que o padrão de variação da TCM em função da dose dos xenobióticos foi linear para a dose 0 e exponencial negativo para a dose de 10 µg mL⁻¹ de sacarose (Figura 2).

Na avaliação da degradação do herbicida, os resultados obtidos demonstraram que a linhagem fúngica P3SA1F apresentou um período de adaptação de aproximadamente 8 dias, o qual está representado graficamente na Figura 3, pela fase "lag". Segundo Alexander (1999) é nesta fase que o microrganismo produz as enzimas capazes de degradar o composto orgânico. Posteriormente, na fase de enriquecimento, foi observada uma taxa de degradação mais alta na maior concentração do herbicida (25 µg mL⁻¹) chegando a 62,34 % aos 18 dias de incubação, enquanto na menor dose (2,5 µg mL⁻¹) a taxa foi de apenas 38,96 % no mesmo período. No entanto, aos 28 dias, ambas as doses apresentaram taxas de degradação semelhantes, ou seja, 66,41 e 67,29 % para a menor e maior dose, respectivamente (figura 3).

Comparando os resultados obtidos com os de Kremer & Sterner, (1996), verifica-se que a linhagem fúngica PSAP31F degradou parcialmente o produto (± 67%) em 28 dias, não sendo detectada a presença do metabólito 3,4-DCA, provavelmente devido a rápida mineralização do mesmo. No entanto o fungo *Basidiomycete filobolus* TA9054 reduziu, após 15 dias, a concentração inicial de 3,4-DCA de 1,2mM para 0,2mM (83%). Concentração que inibiu o crescimento fúngico, mas não afetou o metabolismo do composto (Kremer & Sterner, 1996). Já o fungo *Phanerochaete chrysosporium* degradou 3,4-DCA à N-(3,4-diclorofenil)-α-cetoglutaril-δ-amida. Este metabólito esteve presente até os 21 dias de incubação (Sandermann, et al., 1998).

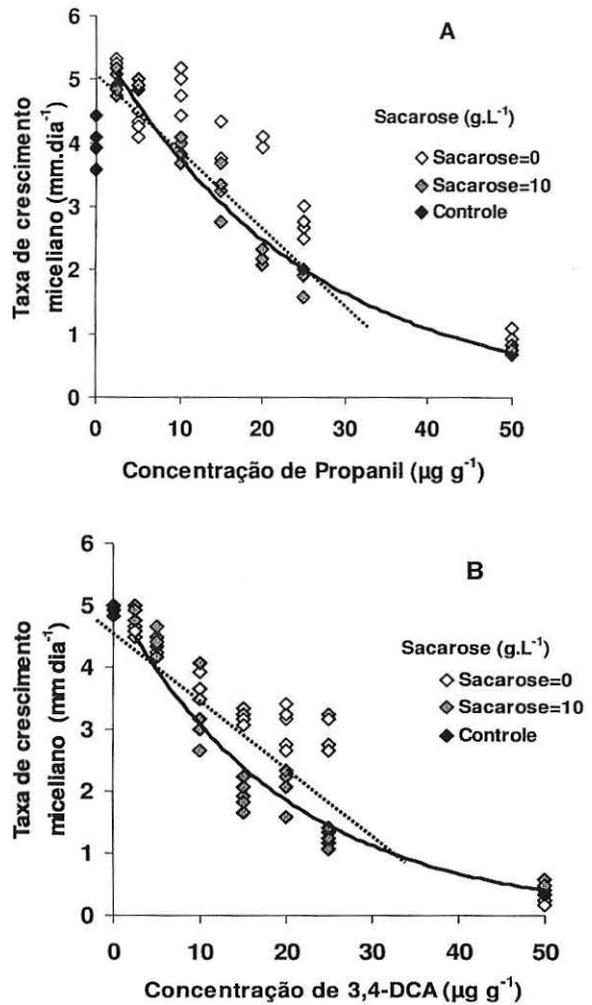


Figura 2. Taxas médias diárias de crescimento miceliano do fungo P3SA1F em função de doses do herbicida propanil (A) e de 3,4-DCA (B), em meios de cultura sem e com adição de sacarose, constando o controle somente de sacarose, 30 g L⁻¹, como fonte de carbono (..... tendência linear, —tendência exponencial).

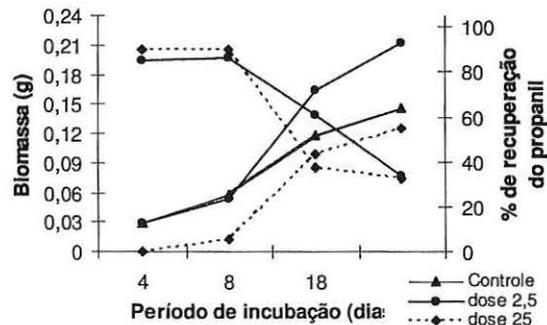


Figura 3. Biomassa do fungo P3SA1F na presença e ausência de propanil (µg mL⁻¹), medida durante o experimento de degradação, em conjunto com a recuperação do propanil (%) ao longo do tempo.

Agradecimentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, pelo apoio financeiro, processo 2003/13941-6, e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo apoio financeiro ao curso de mestrado da FEA (Unicamp).

Bibliografia

- ALAWI, M. A. Determination of propanil in rice, potatoes and water by HPLC. *Fresenius Z. Analytical Chemistry*, v.312, p.536-538, 1982.
- BOON, N.; GORIS, J.; PAUL, V.; VERSTRAETE, W. & TOP, E. M. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.7, p.2906-2913, 2000.
- BRUNSBACH, F. R. & REINEKE, W. Degradation of chloroanilines in soil slurry by specialized organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.40, p.402-407.
- CORREA, I. E. & STEEN, W. C. Degradation of propanil by bacterial isolates and mixed populations from a pristine lake. *Chemosphere*, v.30, n.1, p.103-116, 1995.
- KREMER, S. & STERNER, O. Metabolism of 3,4-Dichloroaniline by the Basidiomycete *Filoboletus* Species TA9054. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.44, p.1155-1159, 1996.
- SANDERMANN JR, H.; HELLER, W.; HERTKORN, N.; HOQUE, E. & PIEPER, D.; WINKLER, R. A New Intermediate in the Mineralization of 3,4-Dichloroaniline by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.9, p.3305-3312, 1998.
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. & VIEIRA, R. F. production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.34, p.53-55, 2003.
- SUROVTSEVA, E. G.; IVOILOV, V. S.; VASILEVA, G. K. & BELYAEV, S. S. Degradation of chlorinated anilines by certain representatives of the genera *Aquaspirillum* and *Paracoccus*. *Microbiology*, v.65, p.553-559, 1996.
- TOMLIN, C. D. S. The Pesticida Manual: A World Compendium, 11 edition; British Crop Protection Council: London, 1997.
- ZABLOTOWICZ, R. M.; LOCKE, M. A.; HOAGLAND, R. E.; KNIGHT, S. S. & CASH, B. Fluorescent pseudomonas isolates from Mississippi Delta oxbow lakes: in vitro herbicide biotransformations. *Environ. Toxicol.*, v.16, n.1, p.9-19, 2001.
- ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V. SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S. & IGNATOV, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Eur. Journal Biochemistry*, n.259, p.572-576, 1999.