

# DEGRADAÇÃO DO FUNGICIDA CARBENDAZIM POR *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

CÉLIA M. M. S. SILVA<sup>1</sup>, ELIZABETH F. FAY<sup>1</sup> & HELENA S. MELO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, EMBRAPA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP, Brasil

(Aceito para publicação em 03/05/96)

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. & MELO, H.S. Degradação do fungicida carbendazim por *Phanerochaete chrysosporium*. Fitopatol. bras. 21: 496-498, 1996.

## RESUMO

O fungo lignocelulolítico, agente causal de podridão branca em madeira, *Phanerochaete chrysosporium* resistente a benomil, tem se mostrado eficiente como degradador do fungicida carbendazim. O fungo foi cultivado em BD complementado com 100,9 µg/ml de metil benzimidazol-2-ylcarbamato (Carbendazim ou MBC) por 22 dias, sob agitação. A

determinação dos resíduos, realizada a partir do segundo dia e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou que o carbendazim é rapidamente degradado por *P. chrysosporium*, sendo que aproximadamente 76% ocorre nos primeiros 6 dias de incubação.

Palavras-chave: biodegradação, fungo.

## ABSTRACT

### Degradation of the fungicide carbendazim by *Phanerochaete chrysosporium*

The white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* which is resistant to benomyl, was found to degrade the fungicide methyl benzimidazole-2-ylcarbamate (carbendazim or MBC). The fungus was grown in PD amended with 100,9 µg/ml of carbendazim and incubated for 22 days.

Quantification of residual products was carried out by HPLC with a Shim-pack WCX-1 column and it was observed that *P. chrysosporium* rapidly degraded about 76% of the MBC in the first 6 days of incubation.

As exoenzimas microbianas são efetivas na detoxificação de resíduos em solos, em embalagens de pesticidas e em resíduos industriais. A dissipação e a perda da atividade biológica de uma ampla variedade de pesticidas são devidas, em grande parte, à degradação microbiana (Alexander, 1981).

Os fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis são caracterizados por uma alta seletividade, agindo em poucos processos do metabolismo dos patógenos, e seu uso indiscriminado tem sido causa de contaminação ambiental. Neste grupo, o composto mais conhecido é o benomil. O carbendazim, produto de hidrólise do benomil, tem as mesmas propriedades fungicidas da molécula parental, e é relati-

vamente resistente a biodegradação, mas sofre transformação pela ação de alguns microrganismos (Yarden *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 1995).

O complexo enzimático degradador de lignina do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* foi efetivo na oxidação e imobilização de um número de xenobióticos altamente recalcitrantes, incluindo 2,2-Bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) e (isômero da dioxina) TCDD. Este basidiomiceto tem sido proposto para ser utilizado como agente de biorremediação de áreas contaminadas por compostos poluentes complexos.

*Phanerochaete* é um fungo filamentosos considerado como um dos maiores degradadores de tecidos lignificados (conteúdo de lignina 20%). Duas espécies, *P. chrysosporium* e *P. sordida*, degradadoras de lignina, são capazes de esgotar

\* Bolsista do CNPq.

rapidamente Bifenil policlorados PCB em solos (Lamar & Dietrich, 1990). Também tem sido descrito para *P. chrysosporium* a degradação de diversos poluentes altamente resistentes, como DDT (Bumpus & Aust, 1987), compostos aromáticos polinucleares de alto peso molecular, como benzo-pireno (Bumpus, 1989), plásticos como polietileno (Lee *et al.*, 1981); 2,4-dinitrotolueno (Valli *et al.*, 1992a); 2,4-diclorofenol (Valli & Gold, 1991); 2,7-diclorodibenzo-p-dioxina (Valli *et al.*, 1992b); porém não há registros na literatura sobre a degradação de fungicidas benzimidazólicos por estes microrganismos. Além disso muito pouco é conhecido sobre as reações enzimáticas envolvidas na degradação deste grupo de fungicidas por microrganismos.

É relatado (Gold *et al.*, 1989; Kirk & Farrel, 1987) que no processo de biodegradação o *P. chrysosporium* libera duas heme-peroxidases; a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), assim como um sistema gerador de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Além destas enzimas extracelulares, Valli & Gold (1991) e Valli *et al.* (1992a e 1992b) sugerem que enzimas intracelulares também estejam envolvidas nas reações degradativas, o que faz com que o *P. chrysosporium* possua uma rara capacidade para a mineralização de xenobióticos recalcitrantes.

Baseado na capacidade de *P. chrysosporium* degradar moléculas recalcitrantes complexas, avaliou-se a capacidade deste fungo em degradar o fungicida carbendazim, já que o mesmo se mostrou resistente a benomil *in vitro*.

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia e Análise de Traços do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA/EMBRAPA). A linhagem de *P. chrysosporium* foi doada pelo Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz" (ESALQ/USP), através do Prof. João Lúcio de Azevedo.

A capacidade do fungo degradar carbendazim (MBC) foi determinada pelo seu crescimento em meio BD 50% complementado com 100,9 µg/ml de MBC (grau técnico, Hoechst) e incubado sob agitação em shaker orbital a 30° C num período de até 22 dias. A determinação quantitativa dos resíduos fungitóxicos realizada a partir do segundo dia, foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), após extração e purificação das amostras. Resumidamente, as etapas da extração consistiram de purificação da amostra com acetato de etila e extração com HCl 0,1 N (Austin & Briggs, 1976). A coluna Shim pack WCX-1 de troca catiônica foi primeiramente equilibrada usando as seguintes condições: temperatura da coluna: 40° C; fase móvel: bicfato de amônio 0,0125 M; fluxo: 0,2 ml/minuto; pressão: 100 psig; detector de absorvância operando a 260 nm. Sob estas condições, o tempo de retenção do carbendazim foi de aproximadamente 4,5 minutos. O método usando CLAE e detecção por UV foi desenvolvido para a análise química do carbendazim. A recuperação de MBC do meio líquido foi de 70 a 84%. Os cálculos para a quantificação foram baseados em curvas de calibração obtidas para soluções padrões de carbendazim em concentrações conhecidas.

Os estudos de degradação foram acompanhados da análise do crescimento desse microrganismo em meio de cultura líquido (BD-50%) com e sem carbendazim, durante 1 a 5 dias, nas mesmas condições de incubação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados analisados com o procedimento PROC GLM do SAS V.6.0 (Sas, 1985). O experimento foi repetido duas vezes.

Neste trabalho, demonstrou-se que o crescimento de *P. chrysosporium* na presença de MBC (100,9 µg/ml) foi inferior (P<0.05) quando comparado com o obtido em meio de cultura sem carbendazim (Fig 1), no qual houve um crescimento fúngico bem pronunciado. Verificou-se também que a produção de biomassa, no terceiro dia, no meio de cultura sem pesticida, foi maior que o mesmo parâmetro avaliado no quinto dia, em meio com adição de MBC. Esta inibição, porém, não afetou a velocidade da degradação do fungicida.

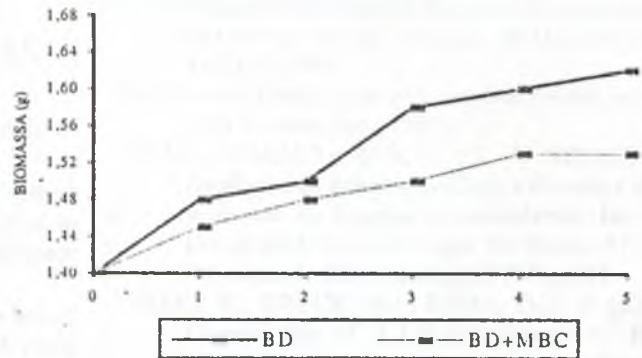


FIG. 1 - Produção de biomassa de *Phanerochaete chrysosporium* em meio de cultura (BD) com e sem carbendazim.

Como determinado pela análise por CLAE, nas amostras de meio de cultura, o carbendazim foi rapidamente degradado por *P. chrysosporium*, chegando a 76,4% de desaparecimento do produto nos primeiros seis dias (P>0,01). Não se observou aumento significativo da degradação do produto nas análises posteriores, até 22 dias de incubação (Fig. 2). Com dois e três dias de incubação o fungo degradou 39,06% e 46,79, respectivamente.

Asther *et al.* (1988), citados por Kirk *et al.* (1990), observaram que a atividade máxima da lignina-peroxidase foi observada entre o quarto e sétimo dia, dependendo da temperatura, e que a produção da enzima foi mais alta próximo a 30° C. Neste trabalho, os resultados demonstraram que a degradação do pesticida ocorreu na primeira semana de incubação.

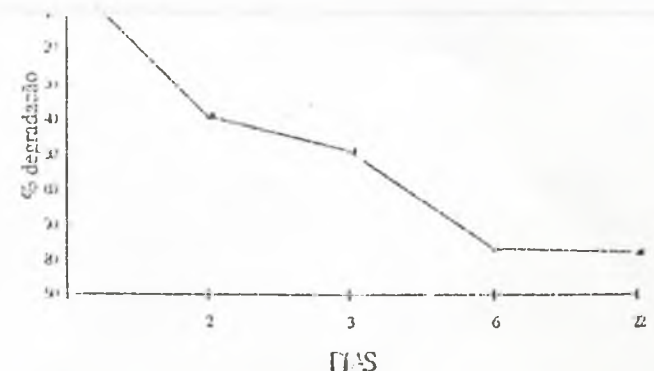


FIG. 2 - Degradação de MBC por *P. chrysosporium*.

Vários trabalhos, entre os quais Baude *et al.* (1974); Helweg, (1977); Yarden *et al.* (1985) e Yarden *et al.*, (1990), demonstraram que a taxa de degradação de carbendazim no solo e nas culturas microbianas, envolve a transformação de carbendazim  $\rightarrow$  2-aminobenzimidazol  $\rightarrow$  CO<sub>2</sub>. Neste estudo não foi observada a presença de 2-aminobenzimidazol, talvez pelo fato de ocorrer rápida mineralização do produto, cuja comprovação necessita estudos posteriores com compostos radiomarcados.

Este estudo demonstrou que a persistência de carbendazim no solo, poderá ser controlado pela presença de *Phanerochaete chrysosporium* que, uma vez presente no meio, degrada rapidamente o fungicida, reduzindo significativamente a contaminação ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211:132-138. 1981.
- 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* 7:201-210. 1976.
- BAUDE, F.J.; PEASE, H.L. & HOLT, R.F. Fate of benomyl on field soil and turf. *Journal Agricultural Food Chemistry* 22(3):413-418. 1974.
- BUMPUS, J.A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:154-158. 1989.
- 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* 53:2001-2028. 1987.
- GOLD, M.H.; WARIISH, 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. pp.127-140.
- HELWEG, A. Degradation and adsorption of carbendazim e 2-aminobenzimidazole in soil. *Pesticide Science* 8(1): 71-78. 1977.
- KIRK, T.K. & FARRELL, P.L. Enzymatic "combustion" the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41:465-505. 1987.
- KIRK, T.K.; THIEN, M.; KERSTEN, P.J., KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K.E. & FARRELL, R.L. Lignin peroxidase from fungi: *Phanerochaete chrysosporium*. In: Lindstrom, M.E. ed. Hydrocarbons and methylotrophy. San Diego, Academic Press, 1990. p.159-171 (Methods in Enzymology, v. 188)
- LAMAR, R.T. & DIETRICH, D.M. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Applied Environmental Microbiology* 56: 3093-3100. 1990.
- LEE, M.D.; WILSON, J.F. & WARD, C.H. "In situ" restoration techniques for aquifers contaminated with hazardous wastes. *Journal of Hazardous Material* 14:71-82. 1987.
- SAS User's Guide: Statistics, version 5 edition (Cary, NC: SAS Institute, Inc., 1985).
- SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S. & ABAKERLI, R.B. Avaliação da população fúngica do solo e degradação acelerada do fungicida carbendazim. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 18, Santos, SP. Sociedade Brasileira de Microbiologia. 1995. p.211.
- VALLI, K.; BROCK, B.J.; JOSHI, D.K. & GOLD, M.H. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology* 58:221-228. 1992a.
- VALLI, K. & GOLD, M.H. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*; 173:345-352. 1991.
- VALLI, K.; WARRIISH, H. & GOLD, M.H. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 174:2131-2137. 1992b.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N. & BENEPIHET, Y. Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. *Phytopathology* 75:763-767. 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* 36:15-23. 1990.