

FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO RIO ATIBAIA, SP E REFINARIA DE PETRÓLEO BIODEGRADADORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS

D.M. Conceição, D.A. de Angelis, E.D. Bidoia, D. de F. de Angelis

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Av. 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil. E-mail: douglasmonte@yahoo.com.br

RESUMO

Apesar de amplamente distribuídos na natureza os compostos fenólicos fazem parte dos principais poluentes tóxicos residuais descartados pela indústria petroquímica, têxtil, entre outras. Considerando a importância ambiental destas substâncias, fungos filamentosos foram selecionados objetivando-se futuros biotratamentos de contaminantes. As 257 cepas fúngicas, isoladas do efluente da refinaria de petróleo e do rio Atibaia, SP, Brasil, foram cultivadas em ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, e o halo de degradação foi medido e classificado. A técnica denominada "Reação de Bavendamm" foi o recurso utilizado para determinar a atividade fenolítica. Cultivou-se também os isolados no efluente da lagoa de estabilização da refinaria para verificar a biomassa e a resistência. Os resultados demonstram que 50% das cepas testadas apresentam atividade fenolítica e 80% cresceram no efluente da refinaria de petróleo. Os fungos selecionados demonstraram potencial para serem introduzidos em processos de biorremediação, com perspectivas de resultados promissores para tratamentos de resíduos e efluentes fenólicos.

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação, rio Atibaia, fenoloxidasas, Reação de Bavendamm, fungos filamentosos, refinaria de petróleo.

ABSTRACT

FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM RIO ATIBAIA, SP, BRAZIL AND OIL REFINERY FOUND TO BE BIODEGRADATORS OF PHENOLIC COMPOUNDS. Despite their wide distribution in nature, phenolic compounds are part of the main toxic pollutants discarded by the petrochemical, textile and other industries. Considering the environmental importance of these substances, filamentous fungi were selected aiming at their future use in biotreatment of residues. Two hundred and fifty-seven strains were isolated from the oil refinery effluent, and from the Atibaia river water. They were inoculated on a phenolic substrate to develop a degradation halo, which was measured and classified. A technique named "Bavendamm Reaction" was used to determine the enzyme activity of fungal phenoloxidasas and peroxidases. The isolates were also cultivated in the effluent of the stabilization lagoon to study biomass production and their resistance. Results showed that 50% of tested isolates produced the enzymes studied and 80% was able to grow in the effluent. The isolates investigated presented an important potential to be used in bioremediation processes, for future application in the treatment of phenolic effluent residues.

KEY WORDS: Biodegradation, Atibaia River, phenoloxidasas, Bavendamm Reaction, filamentous fungi, oil refinery.

INTRODUÇÃO

O homem caracteriza-se pela sua capacidade de modificar e adaptar-se ao ambiente, utilizando e transformando os recursos disponíveis. Esta situação desenvolve-se, amplia-se e é otimizada pelo avanço nos diversos campos do conhecimento e da tecnologia. Contudo, o homem nem sempre se preocupa com a conservação dos recursos naturais e, principalmente, com os resíduos gerados em suas atividades.

Com o avanço da ciência, diversos compostos são sintetizados e produzidos industrialmente; conseqüentemente novos resíduos são introduzidos no ambiente. Muitas vezes, os mesmos são dificilmente degradados ou reciclados na forma em que se encontram, e assim persistem freqüentemente prejudicando a biota local e o próprio homem.

Os compostos fenólicos enquadram-se nos resíduos resultantes da biodegradação de resíduos naturais (VASSILEV *et al.*, 1994) e da atividade antrópica; são encontrados no solo e na água, mas apesar de

amplamente distribuídos na natureza fazem parte dos principais poluentes tóxicos residuais descartados por uma grande variedade de indústrias, como têxteis, refino de petróleo, polpa e papel, farmacêutica, revestimento de metais, preservação de madeira, corantes, resinas e plásticos, conversão de carvão, além de serem componentes de muitos biocidas (COLL *et al.*, 1993; MARR *et al.*, 1996; KARAM & NICELL, 1997; RENGARAJ *et al.*, 2002).

Muitas substâncias consideradas prejudiciais, como os compostos fenólicos, segundo SPAIN *et al.* (1980) podem ter a toxicidade diminuída ou eliminada pela ação de microrganismos adaptados. Condições ambientais como temperatura, pH, oxigênio, salinidade, dentre outras, podem favorecer ou reprimir a degradação. HOFRICHTER *et al.* (1993) citaram que áreas contaminadas por fenóis e outros hidrocarbonetos aromáticos costumam conter fungos filamentosos, agindo na sua degradação; algumas linhagens, como *Penicillium* sp. Bi7/2, são adaptadas a concentrações superiores a 1.500 mg/L e somente poucos fungos sobrevivem com fenol como única fonte de carbono.

A utilização de microrganismos nativos ou introduzidos no ambiente alterado, ou mesmo a captação e disposição do resíduo nocivo em locais de tratamento, como "landfarming", biopilha, lodo ativado ou outros reatores biológicos é realizada com sucesso em refinarias de petróleo, indústrias têxtil, de celulose, farmacêutica, dentre outras. Entretanto, nem sempre os indivíduos fundamentais para os processos de biorremediação estão presentes, ou encontram-se em número reduzido. A solução para este problema é procurar no ambiente aqueles que possuam os dispositivos metabólicos apropriados para mineralizar, iniciar a degradação ou diminuir o efeito tóxico de determinados compostos (SPAIN *et al.*, 1980).

Os fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição (BENNETT, 1998), desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Nas últimas décadas, a utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação vem crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas.

A degradação de compostos fenólicos tem uma estreita relação com a decomposição da lignina, sendo assim muitas das técnicas aplicadas para seleção de microrganismos ligninolíticos podem ser utilizadas para triagem de organismos degradadores de compostos fenólicos, e vice-versa. Dentre estas técnicas, podem ser citadas aquelas que utilizam o desapa-

recimento ou a mudança de cor do meio de cultura inoculado com microrganismos a serem testados, para assim quantificar ou detectar a atividade enzimática. Esta técnica permite que muitos microrganismos de uma coleção e/ou isolados de um determinado ambiente sejam selecionados rapidamente (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e/ou rejeitos urbanos (VASSILEV *et al.*, 1994) e também no tratamento de solos e efluentes diversos (DURÁN & ESPOSITO, 2000). Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade com os substratos, uma vez que a estrutura da lignina apresenta diversos modelos (GOLDSTEIN, 1981; BUMPUS *et al.*, 1985; MESTER & TIEN, 2000; HOFRICHTER, 2002).

A maior parte das moléculas orgânicas não absorve luz na região visível do espectro sendo, portanto, brancas ou incolores como a maioria dos compostos fenólicos. Sob ação de determinadas oxidases os compostos fenólicos convertem-se em suas quinonas correspondentes, e mesmo as mais simples são fortemente coloridas, por serem altamente conjugadas (ALLINGER *et al.*, 1976; LEATHAM & STAHMANN, 1981; SZKLARZ *et al.*, 1989; THURSTON, 1994; MORRISON & BOYD, 1996; DURÁN & ESPOSITO, 2000; MESTER & TIEN, 2000; ROSATTO *et al.*, 2001).

A "Reação de Bavendamm" pode ser citada como um exemplo clássico da utilização das técnicas de formação de halo. Nesta reação, o ácido fenólico, ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, conhecido como ácido gálico (DAVIDSON *et al.*, 1938; NOBLES, 1965), sob ação das fenoloxidasas fúngicas forma quinonas, que são identificadas pela formação de um halo de cor âmbar em torno do micélio.

As fenoloxidasas e peroxidases são oxidoredu-tases, enzimas caracterizadas pela catálise de reações de transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de um composto para outro. Estas representam o maior grupo de enzimas envolvidas com a atividade do metabolismo secundário dos fungos filamentosos, e comumente estão associadas com a síntese de melaninas e outros pigmentos. As fenoloxidasas ou polifenoloxidasas dividem-se em duas subclasses: lacases e tirosinases (LEATHAM & STAHMANN, 1981; DURAN & ESPOSITO, 2000). Sendo que os termos fenoloxidasas, fenolases ou polifenoloxidasas são utilizados para descrever enzimas que catalisam a oxidação de compostos aromáticos pelo oxigênio molecular reduzindo-o a água (GRIFFITH, 1994; THURSTON, 1994).

Assim, o presente trabalho objetivou selecionar linhagens de fungos filamentosos resistentes a condições adversas, isoladas do rio Atibaia e refinaria

de petróleo na região industrial do Município de Paulínia, SP, com potencial para degradar compostos fenólicos, quantificando a produção de fenoloxidasas pela "Reação de Bavendamm", que utiliza como fonte de carbono o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência dos fungos filamentosos isolados

Cerca de 260 cepas fúngicas foram isoladas em meio Martin com Rosa Bengala e meio L para leveduras, e estocadas em meio de malte e ágar batata-dextrose (SMITH & ONIONS, 1983), sob refrigeração. Os fungos filamentosos foram coletados em 7 pontos distribuídos na região industrial do Município de Paulínia, Estado de São Paulo, Brasil, na refinaria de petróleo REPLAN/Petrobrás e proximidades (Fig. 1).

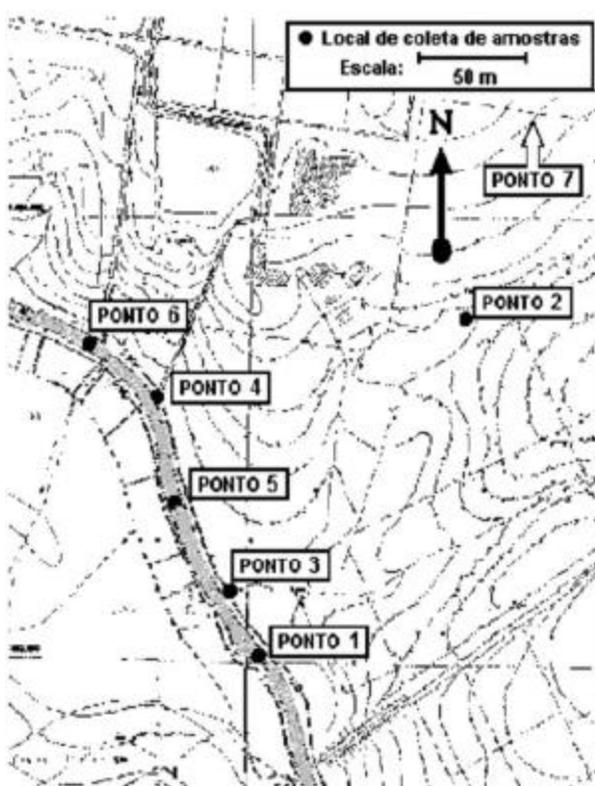


Fig. 1 - Local de coleta dos fungos filamentosos no Rio Atibaia e na lagoa de estabilização da REPLAN, onde:

1. Montante.
2. Lagoa de estabilização (L.E. - REPLAN).
3. Descarga do efluente industrial.
4. Descarga do efluente doméstico.
5. 50m acima do efluente doméstico.
6. Jusante 150m abaixo do efluente industrial.
7. Captação de água no Rio Jaguari (ponto localizado fora do mapa).

Local de coleta

O rio Atibaia localiza-se na bacia hidrográfica do Rio Piracicaba, SP, Brasil, é um dos afluentes do Rio Tietê, possui cerca de 182 km de extensão e sofre um desnível altimétrico de 238m. A região caracteriza-se pela intensa exploração agrícola (principalmente culturas de milho, cana-de-açúcar e cítricos), industrialização e desenvolvimento populacional. Em determinados segmentos não atende às especificações presentes na legislação para águas de abastecimento público (COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ, 2000; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2001).

Meios de cultura para seleção

O meio de ácido gálico foi preparado pela adição de 15 g de extrato de malte, 1 g de dextrose-peptona, 5 g de ácido gálico (Mallinckrodt), 20 g de ágar em 1 L de água destilada. Devido à provável hidrólise do ágar, acondicionou-se o ácido em frasco separado, contendo 50 mL da água destilada utilizada no meio de cultura. Esterilizou-se em autoclave, durante 10 min, a 121° C e 1 atm; pH = 3. (DAVIDSON *et al.*, 1938): O efluente de refinaria de petróleo foi coletado na lagoa de estabilização (L.E.) da REPLAN - Petrobrás. O efluente foi agitado manualmente, e coletou-se um volume de 10 mL, disposto em tubos de cultura (220 x 160 mm). As amostras foram esterilizadas em autoclave, durante 10 min, a 121° C e 1 atm. Alguns parâmetros físico-químicos do efluente estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos medidos durante a coleta das amostras no local de estudos. Os dados a seguir expressam as médias seguidas do desvio médio de 23 coletas, realizadas no período de outubro de 1999 a setembro de 2000, na lagoa de estabilização L.E. - REPLAN.

Parâmetro	Valor/desvio
pH	8,11 ± 0,43
Temperatura (°C)	24
Condutividade (ms.cm ⁻¹)	3075 ± 274
OD (mg.L ⁻¹)	7,28 ± 1,72
DQO (mg.L ⁻¹)	140,54 ± 39,22
DBO (mg O ₂ .L ⁻¹)	32,23 ± 20,78
Amônia (mg NH ₃ .L ⁻¹)	30,94 ± 14,92
Nitrito (mg NO ₂ .L ⁻¹)	1,260 ± 1,035
Nitrato (mg NO ₃ .L ⁻¹)	2,81 ± 1,35
Cloretos (mg .L ⁻¹)	639,18 ± 89,53
Alcalinidade (mg HCO ₃ .L ⁻¹)	140,24 ± 99,88
Fósforo (µg P.L ⁻¹)	0,30 ± 0,26
Ferro (µg Fe.L ⁻¹)	0,29 ± 0,10
Manganês (µg Mn.L ⁻¹)	0,05 ± 0,02
Cobre (µg Cu.L ⁻¹)	0,02 ± 0,01
Sódio (µg Na.L ⁻¹)	586,63 ± 72,13

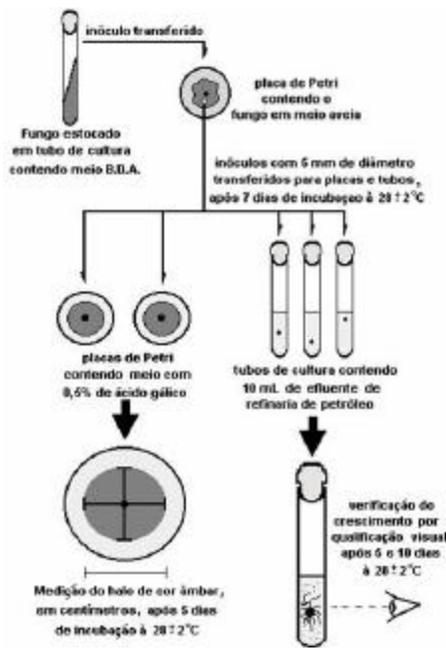


Fig. 2 - Procedimento de seleção dos fungos. Ilustração da formação e quantificação do halo resultante da "Reação de Bavendamm".

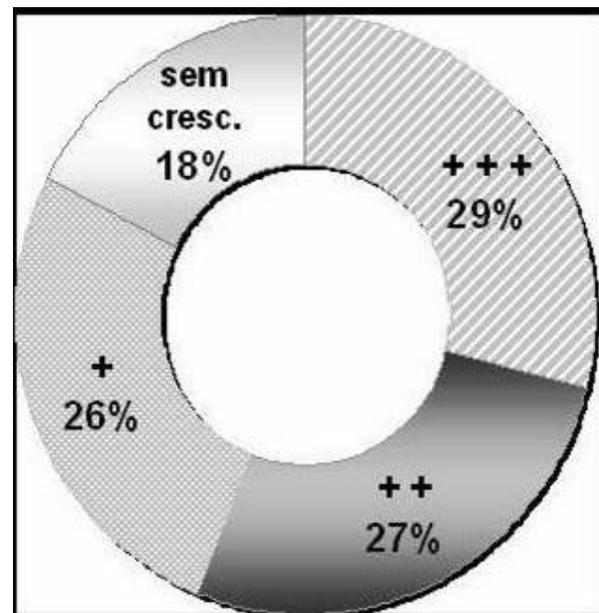


Fig. 3 - Porcentagem da biomassa dos fungos filamentosos isolados, quando cultivados no efluente de refinaria de petróleo. Onde: (+) crescimento pequeno, (++) médio, (+++) grande e (sem cresc.) sem crescimento visível.

Tabela 2 - Identificação, média da duplicata em relação ao halo medido em centímetros, média do desenvolvimento do halo acompanhado durante 5 dias a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, intensidade da cor âmbar característica da "Reação de Bavendamm" e o crescimento da biomassa.

Cepa fúngica/Identificação	Halo medido em cm							
	Tempo em dias					Média	Cor	Biomassa
	1º	2º	3º	4º	5º			
150 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,85	3,10	3,75	5,00	5,25	3,79	I	++
164 em identificação	1,70	2,85	3,70	4,50	5,30	3,61	I	+++
228 Celomiceto	1,45	3,00	3,70	4,40	4,95	3,50	I	++
94 em identificação	1,45	3,00	3,80	4,30	4,90	3,49	I	++
186 em identificação	1,80	2,80	3,65	4,20	4,90	3,47	I	+++
53 em identificação	1,05	3,00	3,80	4,30	4,80	3,39	I	+++
40 <i>Phoma sorghina</i>	1,50	2,75	3,40	4,25	4,75	3,33	I	++
19 em identificação	1,95	2,95	3,10	4,25	4,40	3,33	M	+++
188 em identificação	1,80	2,30	3,15	4,50	4,75	3,30	I	+
206 em identificação	1,00	2,25	3,40	4,50	5,00	3,23	I	+
27 em identificação	1,30	2,60	3,20	4,15	4,45	3,14	I	++
30 FNEE	1,30	2,65	3,25	3,80	4,60	3,12	I	+++
41 Hifomiceto	0,90	2,50	3,40	4,20	4,50	3,10	I	++
199 em identificação	1,30	2,90	3,50	3,75	4,00	3,09	M	+
128 em identificação	1,55	2,65	3,30	3,80	4,10	3,08	M	++
217 em identificação	1,25	2,60	3,30	3,75	4,25	3,03	I	-
282 Hifomiceto	1,15	2,25	3,15	3,50	5,00	3,01	I	+++
92 em identificação	1,25	2,20	3,30	3,75	4,40	2,98	M	+++
272 em identificação	1,55	2,60	3,10	3,50	3,95	2,94	I	+++
34 <i>Penicillium purpurogenum</i>	0,80	2,15	3,00	4,05	4,55	2,91	M	+
209 em identificação	1,00	2,00	3,15	3,90	4,40	2,89	M	-
168 em identificação	1,45	1,85	2,45	3,60	5,00	2,87	F	+
161 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,05	2,00	2,75	4,00	4,50	2,86	M	-

49	FNEE	1,05	2,20	2,80	3,90	4,10	2,81	M	+++
197	em identificação	0,90	2,40	3,40	3,50	3,75	2,79	M	+++
207	<i>Cladosporium herbarum</i>	1,25	2,00	3,05	3,65	3,95	2,78	I	-
238	<i>Dreschlera</i> sp.	1,85	2,30	2,85	3,40	3,50	2,78	M	+
167	FNEE	1,75	2,45	2,60	3,25	3,75	2,76	I	+++
144	em identificação	0,00	2,25	3,25	4,00	4,25	2,75	I	++
29	<i>Cylindrocladium</i> sp.	1,05	2,05	3,00	3,30	4,05	2,69	M	+
54	<i>Cladosporium</i> sp.	1,50	1,90	2,25	3,25	3,75	2,53	M	+
105	<i>Phoma</i> sp.	1,95	2,25	2,35	3,00	3,00	2,51	M	+
119	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1,10	1,95	2,15	3,30	3,90	2,48	M	-
183	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,00	2,40	3,00	3,25	3,75	2,48	I	++
198	em identificação	0,00	1,80	2,50	3,80	4,10	2,44	M	++
16	<i>Alternaria alternata</i>	1,70	1,95	2,55	2,65	3,30	2,43	F	+++
44	em identificação	0,00	1,70	2,15	3,75	4,20	2,36	M	++
121	<i>Fusarium</i>	1,05	1,90	2,35	3,00	3,35	2,33	M	-
96	<i>Cladosporium herbarum</i>	0,00	1,40	2,65	3,25	3,75	2,21	M	-
17	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,95	1,50	2,40	3,00	3,15	2,20	F	+++
108	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,00	1,20	2,05	3,50	3,75	2,10	M	+++
63	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,00	1,00	1,75	2,35	3,50	1,92	M	++
12	<i>Acremonium</i> sp.	0,50	1,55	2,25	2,40	2,70	1,88	F	+++
132	<i>Curvilaria geniculata</i>	1,10	1,55	1,55	1,80	2,60	1,72	F	++
26	<i>Nigrospora sphaerica</i>	0,00	0,60	2,20	2,60	2,60	1,60	F	+++
18	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,00	0,00	1,45	1,70	2,05	1,04	F	+++

Legenda:

FNEE: Fungo não esporulante escuro

MED: média do crescimento durante 5 dias

Cor: Intensidade da cor âmbar

M : Cor moderada

I : Cor intensa

F : Cor fraca

Biomassa: crescimento por qualificação visual

+ : crescimento pequeno

++: crescimento médio

+++: crescimento grande

Metodologia (Fig. 2)

Os fungos filamentosos isolados foram cultivados em meio de aveia (SMITH & ONIONS, 1983) durante 7 dias a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, após esta etapa um inóculo de 5 mm de diâmetro, foi depositado em placa de Petri contendo meio de malte acrescido de ácido gálico 0,5% (DAVIDSON *et al.*, 1938; NOBLES, 1965); pH = 3. Durante 5 dias, a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, acompanhou-se a progressão do halo e a intensidade da cor âmbar, característica da "Reação de Bavendamm". Diariamente, a intensidade da cor foi qualificada em: (F) fraca, (M) moderada ou (I) intensa e o diâmetro do halo medido em centímetros.

Qualificou-se a produção de biomassa fúngica relativa em pequena (+), média (++) e grande (+++) por qualificação visual, a partir de um inóculo de 5 mm de diâmetro cultivado em tubos de cultura (220 mm x 160 mm) contendo 10 mL do efluente de refinaria de petróleo a $28 \pm 2^\circ \text{C}$, com leituras no quinto dia e no décimo dia de cultura.

RESULTADOS

Dos 257 fungos filamentosos isolados cerca de 43% apresentaram formação de halo, indicando a

presença de fenoloxidasas. Quanto à intensidade da cor âmbar, 23% apresentaram cor fraca, 10% cor moderada e 9% cor intensa. Em relação ao diâmetro do halo 12% apresentaram diâmetro entre 0 e 2 cm; 20% diâmetro entre 2 e 4 cm e 11% diâmetro maior que 4 cm. Os 46 melhores resultados estão destacados na Tabela 2, onde os resultados foram organizados em ordem decrescente, conforme a média do halo de degradação e a biomassa apresentada no cultivo em efluente de refinaria de petróleo.

Quanto à produção de biomassa fúngica relativa, cerca de 82% dos fungos filamentosos apresentaram algum tipo de crescimento no efluente de refinaria de petróleo (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Dentre as cepas fúngicas testadas foi observado que muitas pertencem ao grupo de microrganismos com pigmentação escura. Devido ao complexo melanínico em suas paredes celulares, estes são chamados de dematiáceos ou fungos negros, os quais comumente apresentam melanina formada pelo polímero 1,8-dihidroxi-naftaleno (DNH) produzido no citoplasma e excretado na parede celular (POLAK,

1990). Existem também outros precursores como catecolamina, catecol, tirosina, γ -glutaminil-hidroxibenzeno (GHB).

A síntese das melaninas fúngicas e outros pigmentos está associada à oxidação de compostos fenólicos pelas fenoloxidasas (GRIFFITH, 1994), justificando os resultados associados aos fungos filamentosos escuros. A melanina também está associada aos mecanismos de resistência dos fungos escuros sob condições ambientais adversas, o que justifica o gênero *Cladosporium* (dematiáceo), como o mais encontrado no efluente da refinaria de petróleo REPLAN.

Alguns dos gêneros selecionados mostraram-se efetivos na degradação do pentaclorofenol. No trabalho realizado por SEIGLE-MURANDI *et al.* (1995) *Phoma glomerata* degradou aproximadamente 30% do organoclorado (100 mg.L⁻¹). MINOURA & OKAZAKI (1968) citaram a formação de halo em meio de ácido gálico ou tânico por *Cladosporium cladosporioides* e *C. herbarum*; RÖSCH & LIESE (1971) demonstraram que os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum* e *Penicillium* sp. desenvolvem-se em meio contendo taninos, os quais apresentam estruturas moleculares semelhantes às do ácido gálico. DONNISON *et al.* (2000) revelaram a produção de fenoloxidasas e peroxidases pelos fungos *Phoma* e *Cladosporium*, isolados de solos alterados na Inglaterra.

Trabalhos sobre o isolamento de fungos filamentosos em ambientes estressantes encontraram uma diversidade de gêneros bastante semelhante à presente neste trabalho. HOFRICHTER *et al.* (1993) selecionaram os gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Alternaria* de solos contaminados por fenóis e benzeno provenientes do efluente industrial no leste da Alemanha; PIECKOVÁ & JESENSKÁ (1999) investigaram a presença dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Trichoderma*, *Alternaria* nas cozinhas, banheiros e porões em residências na Bélgica; ZHDANOVA *et al.* (2000) isolaram os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Acremonium* e *Mucor*, em locais com altos índices de radiação na Usina Nuclear de Chernobyl, alguns anos após um acidente nuclear. Estes trabalhos confirmam que os gêneros encontrados no Rio Atibaia, na região industrial do município de Paulínia, constituem um grupo de fungos filamentosos que definitivamente apresentam mecanismos de resistência a condições ambientais adversas.

Spain *et al.* (1980) citaram 3 caminhos pelos quais a adaptação de um microrganismo a um novo substrato pode ocorrer: indução ou liberação de enzimas específicas não presentes anteriormente (ou presentes em baixos níveis); seleção de novas capacidades metabólicas produzidas por alterações genéticas, e o aumento do número de microrganismos capazes de catalisar

uma transformação particular. Muitas vezes o sucesso do processo de biorremediação depende da resistência do fungo ao composto alvo e às condições ambientais presentes.

As cepas fúngicas selecionadas apresentaram-se resistentes às condições impostas. Considerando que o pH ácido e a alta salinidade das águas dos locais de isolamento normalmente são danosos à maioria dos microrganismos, prejudicando possíveis biotratamentos (RIBEIRO *et al.*, 1996).

A metodologia utilizada permitiu uma interpretação simples dos resultados obtidos na seleção, principalmente porque a concentração utilizada (0,5% de ácido gálico) (DAVIDSON *et al.*, 1938). Algumas cepas fúngicas apresentaram crescimento aéreo, e o inóculo manteve o diâmetro aproximado de 5 mm, na maioria dos experimentos.

Conforme a literatura (VASSILEV *et al.*, 1994; LEONOWICZ *et al.*, 1999; TUOMELA *et al.*, 2000) os basidiomicetos são efetivamente os principais degradadores da lignina e a "Reação de Bavendamm" não é totalmente eficaz nos estudos taxonômicos (HARKIN & OBST, 1973, NISHIDA *et al.*, 1988). Torna-se importante mencionar que o presente trabalho não objetivou a degradação da molécula lignina, apesar do equipamento enzimático dos fungos selecionados possibilitar esta experimentação.

Os fungos selecionados demonstraram potencial importante para serem introduzidos em processos de biorremediação, com perspectivas de resultados promissores para tratamentos de resíduos e efluentes fenólicos, reforçando a idéia que numerosas espécies com potencial para degradar e/ou reciclar compostos tóxicos, podem ser isoladas de ambientes alterados pela poluição. Ao longo do rio Atibaia as características físicas e principalmente químicas variam, conforme o efluente industrial e/ou doméstico incorporado, isso influi diretamente na biota presente, selecionando assim os organismos mais resistentes às variações.

Quanto aos aspectos biotecnológicos, estes ambientes fornecem amplo acervo genético, ampliando as possibilidades da engenharia genética, que tem necessidade constante de novos microrganismos com características especiais, para a manipulação e aplicação no melhoramento de processos.

Os fungos selecionados estão estocados no Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, SP, em processo de identificação, para serem depositados em coleções certificadas, após os ensaios de campo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, à REPLAN – Petrobrás e ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia do

Instituto de Biociências de Rio Claro pelo apoio financeiro. Somos gratos também a Profa. Dra. Rosely Anna Piccolo Grandi, do Instituto de Botânica de São Paulo pela ajuda na identificação de alguns fungos filamentosos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; DE JONGH, D.C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. *Química orgânica*. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos, 1976. 961p.
- BENNET, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, v.66, p.101-107, 1998.
- BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S.D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungi. *Science*, v.228, p.1434-1436, 1985.
- COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ. *Relatório zero relatório de situação das bacias hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí*. [CD-ROM]. São Paulo: CBH-PCJ, 2000. (UGRHI 5).
- COLL, P.M.; FERNÁNDEZ-ABALOS, J.M.; VILLANUEVA, J.R.; SANTAMARÍA, R.; PÉREZ, P. Purification and characterization of phenoloxidase (laccase) from lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT2971). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, n.8, p.2607-2613, 1993.
- Davidson, R.W.; Campbell, W.A. & Blaisdell, D.J. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. of Agric. Res.*, v.57, n.9, p.683-685, 1938.
- DONNISON, L.M.; GRIFFITH, G.S.; HEDGER, J.; HOBBS, P.L.; BARDGETT, D. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biol. Biochem.*, v.32, p.253-263, 2000.
- DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catalysis B: Environmental*, v.28, p.83-99, 2000.
- GRIFFITH, G.W. Phenoloxidases. In: MARTINELLI, S.D. & KINGHORN, J.R. (Eds.). *Aspergillus nidullans: 50 years on - progress in industrial microbiology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1994. p.763-788
- GOLDSTEIN, I.S. *Organic chemicals from biomass*. Boca Raton: CRC Press, 1981. 310p.
- HARKIN, J.M. & OBST, J.R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, v.29, n.4, p.381-387, 1973.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v.67, p.597-607, 1975.
- HOFRICHTER, M.; GÜNTHER, T.; FRITSCH, W. Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation*, v.3, p.415-421, 1993
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbial. Technol.*, v.30, p.454-456, 2002.
- KARAN, J. & NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in wastes treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.69, p.141-153, 1997.
- LEATHAM, G.F. & STAHMANN, M.A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. General Microbiol.*, v.125, p.147-157, 1981.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO N.S.; HOFRICHTER, M. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.*, v.27, p.175-185, 1999.
- MARR, J.; KREMER, S.; STERNER, O.; ANKE, H. Transformation and mineralization of halophenols by *Penicillium simplicissimum* SK9117. *Biodegradation*, v.7, p.165-171, 1996.
- MESTER, T. & TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v.46, p.51-59, 2000.
- MINOURA, K. & OKAZAKI, G. Taxonomic Studies on cladosporia - physiological properties. *J. Ferment. Technol.*, v.46, p.269-275, 1968.
- MORRISON, R.T. & BOYD, R.N. *Química orgânica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1510p.
- NISHIDA, T.; KASHINO, Y.; MIMURA, A.; TAKAHARA, Y. Lignin Biodegradation by Wood-Rotting Fungi I. - screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai Gakkaishi*, v.34, n.6, p.530-536, 1988.
- NOBLES, M.K. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. Bot.*, v.43, p.1097-1139, 1965.
- PIECKOVÁ, E. & JESENSKÁ, Z. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med.*, v.6, p.1-11, 1999.
- POLAK, A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses*, v.33, n.5, p.215-224, 1990.
- RENGARAJ, S.; MOON, S-H.; SIVABALAN, S.; ARABINDOO, B.; MURUGESAN, V. Removal of phenol from aqueous solution and resin manufacturing industry wastewater using an agricultural waste: rubber seed coat. *J. Hazard. Mater. B.*, v.89, p.185-196, 2002.
- RIBEIRO, M.S.; SANTIAGO, V.M.J.; RUSSO, C.; NETO, O. A. A. Tratamento de água de produção via oxidação por ozônio. *Bol. Téc. Petrobrás*, v.39, p.101-104, 1996.
- ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v.24, n.1, p.77-86, 2001.
- RÖSCH, R. & LIESE, W. Untersuchungen über die enzyme von Bläuepilsen - Phenoloxidasen-Aktivität. *Arch. Mikrobiol.*, v.76, p.212-218, 1971.
- SEIGLE-MURANDI, F.; TOÉ, A. BENOIT-GUYOD, J.L.; STEIMAN, R.; KADRI, M. Depletion of pentachlorophenol by deuteromycetes isolated from soil. *Chemosphere*, v.31, n.2, p. 2677-2686, 1995
- SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. *The preservation and maintenance of living fungi*. Kew: CAB International Mycological Institute, 1983. 51p.
- SPAIN, J.C.; PRITCHARD, P.H.; BOURQUIN, A.W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.40, n.4, p.726-734, 1980.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, v.81, n.2, p.234-240, 1989.

- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, v.140, p.19-26, 1994.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biores. Technol.*, v.72, p.169-183, 2000.
- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Estudos das condições de dispersão dos efluentes da refinaria de Paulínia – REPLAN, norio Atibaia, para avaliação da contribuição do descarte para qualidade da água. Convênio Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobrás – REPLAN. São Paulo: UNESP, 2001. (Projeto de pesquisa - Fundação para o Desenvolvimento da UNESP, Instituto de Biociências de Rio Clar.)
- VASSILEV, N.; BACA, M.T.; VASSILEVA, M. Plant lignocellulose and decomposition by fungus: from nature to industrial use. *Mycologist*, v.8, p.113-114, 1994.
- ZHDANOVA, N.N.; ZAKHARCHENKO, V.A.; VEMBER, V.V. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycol. Res.*, v.104, n.12, 1421-1426, 2000.

Recebido em 30/11/04

Aceito em 30/12/04