

LUCIANA JANDELLI GIMENES

Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2011

LUCIANA JANDELLI GIMENES

Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. DÁCIO ROBERTO MATHEUS

CO-ORIENTADOR: DR. RICARDO HARAKAVA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Gimenes, Luciana Jandelli

G487b Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares / Luciana Jandelli Gimenes – São Paulo, 2011.
105 p. il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2011.
Bibliografia.

1. Basidiomicetos. 2. Biorremediação. 3. Organoclorados. I. Título

CDU: 582.284

“Ironias da natureza... O homem sintetizou alguns compostos orgânicos pesticidas para destruir microrganismos e hoje estuda estes últimos para destruir aqueles mesmos compostos...”

Trecho retirado do livro Poluentes Orgânicos Persistentes, Série Cadernos de Referência Ambiental, V. 13, Salvador

Dedico,

Aos meus pais Ayrton e Denise e minha irmã Adriana, pelo carinho, confiança sempre, amor constante e presente em todas as horas e toda admiração pelo exemplo de dedicação.

Ao meu querido Dráusio pelo amor, incentivo e admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A todos aqueles que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Ao Instituto de Botânica, em razão da cessão das instalações e pela infra-estrutura oferecida, principalmente ao Núcleo de Pesquisa em Micologia pela utilização de laboratórios e equipamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado disponibilizada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica.

À Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG, através de convênio com Rhodia do Brasil Ltda, pelo apoio financeiro para a execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Dácio Roberto Matheus, pela orientação, amizade, confiança, companheirismo, pelo exemplo de profissional, e pelo enorme incentivo na etapa final do trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pela orientação na parte molecular, sugestões, auxílio e amizade.

Aos meus pais, Ayrton e Denise, meu eterno agradecimento, por todo amor, apoio incondicional, incentivo e por se sentirem orgulhosos de cada etapa por mim cumprida.

À minha irmã Adriana, pelo incentivo e apoio nas fases mais difíceis. Tenho a certeza que não há alguém no mundo com uma irmã melhor do que a minha!!!!

Ao meu amado Dráusio Ladeira Silva, pelo amor, amizade, pelo incentivo, por me ouvir e me entender e pelo seu olhar de admiração a cada momento.

Ao meu cunhado e “irmão” Octávio Luiz Mascarenhas de Queiroz, por toda torcida, incentivo e por ter entrado na família, deixando-a ainda mais feliz.

Aos meus “irmãos científicos” Marina Bianchini de Salvi, Ricardo Ribeiro da Silva e William Seiti Okada, pela ajuda em todos os momentos que precisei e pela grande amizade e carinho.

À querida amiga Adriana de Mello Gugliotta, pelas palavras de incentivo, por sempre ser muito prestativa e pela amizade fraterna. Você mora no meu coração!!

À Gladys e Terry Brennan pela amizade e ajuda na revisão do inglês nos “abstracts”.

Aos amigos que fiz, fruto da convivência no Instituto de Botânica: Adriano Afonso Spielmann, Alexandra Lenk Gomes Ferreira, Ana Paula Soares Paranhos, Andréa Araújo, Carolina Gasch Moreira, Cristiane Nascimento, Diógina Barata, Eduardo Custódio Gasparino, Glauciane Danusa Coelho, José Ivanildo de Souza, Juçara Bordin, Leandro Augusto Gonçalves, Luciana da Silva Canêz, Luciane Crosseti, Maira Cortellini Abrahão, Milena de Luna Alves Lima, Nelson Menolli Junior, Sergio Luiz Moreira Neto e Thiara Siqueira Bento, pelo convívio e inestimáveis momentos de descontração e alegrias.

À Dra Vera Lucia Ramos Bononi, pelo exemplo de pessoa, profissional e ética científica, meus sinceros agradecimentos durante o período que foi diretora, por ter melhorado as condições de trabalho e pesquisa no Instituto de Botânica.

À Dra. Elen Aquino Perpetuo e Marcela dos Passos Galluzzi Baltazar do Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA/USP), pela imensa ajuda, dedicação, colaboração nas análises cromatográficas e interpretação dos espectros de massa.

À Márcia Regina Angelo, em decorrência de toda a atenção que sempre dispensou com muito esmero e sempre prestativa.

Enfim, a todos que, de diferentes formas e maneiras, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO I:	2
1. Introdução	2
2. Revisão bibliográfica	4
2.1. Biorremediação	4
2.2. Poluentes persistentes orgânicos (POP's)	6
2.3. Pentaclorofenol (PCF)	7
2.4. Fungos basidiomicetos	9
2.4.1. Fungos basidiomicetos e sua aplicação na biorremediação ambiental	9
2.4.2. <i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel	11
2.5. Enzimas ligninolíticas	12
2.6. Análises moleculares e fungos basidiomicetos	12
2.7. Hibridização subtrativa por supressão (HSS)	14
2.8. Quantificação da expressão gênica através de PCR quantitativa (q PCR)	14
2.9. Objetivos	15
2.10. Referências bibliográficas	15
CAPÍTULO II: Artigo 1: Fenoloxidasas de linhagens de <i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel em diferentes substratos contaminados com pentaclorofenol	24
Resumo	25
Abstract	25
Introdução	27
Material e métodos	27
Resultados	33
Discussão	38
Referências bibliográficas	40
CAPÍTULO III: Artigo 2: Biodegradação de pentaclorofenol em solo por linhagens de <i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel.....	46

Resumo	47
Abstract	47
Introdução	49
Material e métodos	49
Resultados	54
Discussão	55
Referências bibliográficas	57
CAPÍTULO IV: Artigo 3: Identificação de genes de <i>Trametes villosa</i> por hibridização subtrativa por supressão na presença de pentaclorofenol	62
Resumo	63
Abstract	63
Introdução	65
Material e métodos	66
Resultados	70
Discussão	76
Referências bibliográficas	78
CONCLUSÕES	82
Anexos	83

RESUMO

Em estudos anteriores, duas linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel foram selecionadas por apresentarem comportamentos diferentes quanto às atividades enzimáticas e às taxas de degradação de pentaclorofenol (PCF), mostrando-se adequadas em sistemas de biorremediação de solos contaminados com organoclorados. O fato de linhagens de uma mesma espécie apresentarem comportamento fisiológico diferente quanto à degradação de PCF pode representar uma grande vantagem no estudo molecular dos genes e fatores que regulam a atividade enzimática e a degradação de xenobióticos. Análises moleculares em fungos basidiomicetos relacionadas aos genes de enzimas ligninolíticas estão sendo realizadas, mas, até o momento, não há estudos da correlação entre a degradação de poluentes e a identificação desses genes por técnicas moleculares. Foram avaliadas atividades de fenoloxidasas e a degradação de PCF por quatro linhagens de *T. villosa* de diferentes localidades do Brasil. Evidenciaram-se perfis enzimáticos distintos entre os isolados na presença de PCF. Na ausência de PCF a atividade enzimática de CCIBt 3393 e CCIBt 2513 em solo foi aproximadamente de 40 UL⁻¹, enquanto para CCIBt 2550 e SC foi menor, em torno de 9 UL⁻¹, o que aumentou significativamente na presença do PCF, elevando as atividades para 300 UL⁻¹ e 90 UL⁻¹, respectivamente. Nos cultivos destas linhagens em meio Batata-Dextrose-Ágar, as atividades enzimáticas corresponderam às observadas em solo. Todas as linhagens apresentaram taxas de degradação após seis dias de incubação em cultivo em solo. A linhagem SC foi capaz de degradar 63,8% de PCF, a linhagem CCIBt 2513 degradou 42,2% e as linhagens CCIBt 2550 e CCIBt 3393 exibiram taxas de degradação de 35,9 % e 24,2% respectivamente, fato muito interessante se comparado com trabalhos anteriores com períodos muito maiores de incubação. Visando identificar genes de *T. villosa* envolvidos na degradação de PCF, foi adotada a técnica de hibridização subtrativa por supressão, onde foram encontrados genes potencialmente envolvidos na degradação desta molécula, tais como: citocromo P450, oxidases, monooxigenases e desidrogenases. Dentre estes, foram selecionados cinco genes para verificação da expressão gênica após a exposição de *T. villosa* ao pentaclorofenol, por meio da análise RT-PCR quantitativo em tempo real. Foram observados maiores níveis de expressão de um gene codificador de citocromo P450 e, com menor intensidade, de um gene codificador de monooxigenase ligada a flavina, após a exposição do fungo ao PCF.

Palavras chave: Basidiomicetos, biodegradação, citocromo P450, fenoloxidase, PCR em tempo real, xenobióticos.

ABSTRACT

In previous studies, two strains of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel were selected because they presented different behaviors with regard to enzymatic activity and the rate of degradation of pentachlorophenol (PCP), which make the strains adequate for use in systems for bioremediation of soils contaminated with organochlorine compounds. The fact that strains of the same species present different physiological behavior with regard to degradation of PCP can be of great advantage in the study of genes and molecular factors that regulate enzymatic activity and degradation of xenobiotics. Molecular analysis of genes related to ligninolytic enzymes of basidiomycetes are being carried out, but to date, there are no studies of the correlation between the degradation of pollutants and the identification of these genes by molecular techniques. The phenoloxidase activities of and the degradation of PCP by 4 strains of *T. villosa* from different regions of Brazil were evaluated. Distinct enzymatic profiles among the strains became evident in the presence of PCP. In the absence of PCP in soil, the enzymatic activity of CCIBt 3393 and CCIBt 2513 was approximately 40 UL⁻¹. It was lower for CCIBt 2550 and SC, namely around 9 UL⁻¹. In the presence of the PCP, it increased by almost 10 times reaching 300 UL⁻¹ and 90 UL⁻¹, respectively. In cultures of these strains in PDA, the enzymatic activity corresponded to those observed in soil. All strains showed rapid degradation rates of PCP after six days in soil incubation. The SC strain was able to degrade 63% of PCP, the strain CCIBt 2513 degraded 42.2% and the strains CCIBt 2550 and CCIBt 3393 exhibited degradation rates of 35.9% and 24.2% respectively, very interesting fact compared with previous studies which showed much longer periods of incubation. To identify genes of *T. villosa* involved in the degradation of PCP, we adopted the technique of suppression subtractive hybridization. In the subtractive library enriched for genes induced by PCP, genes potentially involved in the degradation of this molecule, such as cytochrome P450 oxidases, monooxygenases and dehydrogenases were found. Among these, five genes were selected for gene expression analysis after exposure of *T. villosa* to pentachlorophenol, using quantitative real-time RT-PCR. After exposure of the fungus to pentachlorophenol, higher expression levels of a gene encoding cytochrome P450 were observed and, also of a gene encoding flavin-binding monooxygenase, but with less intensity.

Key words: Basidiomycetes, biodegradation, cytochrome P450, phenoloxidase, RT-PCR, xenobiotics.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS – 2,2-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate)
- BD – Meio de cultura batata- dextrose
- BDA – Meio de cultura batata- dextrose- Agar
- C-AMP – Adenosina monofosfato cíclico
- cDNA – DNA complementar
- CCIBt – Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica
- CG/MS – Cromatografia Gasosa/Espectrômetro de Massa
- CMRA – Capacidade máxima de retenção de água
- DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- HCB – Hexaclorobenzeno
- HSS – Hibridização subtrativa por supressão
- IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- LB – Meio de cultura Luria- Bertani
- LiP –Peroxidase dependente da lignina
- MAP-quinase – proteína quinase ativada por mitógenos
- MnP – Peroxidase dependente do manganês
- mRNA – RNA mensageiro
- NaPCF – Pentaclorofenato de sódio
- PCF – Pentaclorofenol
- PCB's – Bifenilas policloradas
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- pH– Potencial hidrogeniônico
- POP's – Poluentes orgânicos persistentes
- RNA – Ácido ribonucléico
- qPCR – PCR em tempo real ou PCR quantitativo
- TBE – Tampão Tris HCl/ ácido bórico/ EDTA
- TCDD – 2, 3, 7, 8 -tetraclorodibenzo-*p*-dioxina
- TNT – 2, 4, 6 – trinitrotolueno
- X-Gal – 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

APRESENTAÇÃO

Este estudo representa o resultado das análises enzimáticas, de degradação do poluente organoclorado pentaclorofenol e análises moleculares das linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel coletadas em diversas localidades brasileiras. O presente trabalho faz parte do projeto amplo “Avaliação do potencial de aplicação de fungos para biorremediação de solos contaminados com resíduos organoclorados”, desenvolvido no Instituto de Botânica e no Instituto Biológico em parceria com a Rhodia do Brasil, o qual é tema de tese de doutorado da autora.

A tese está apresentada em capítulos, sendo que o capítulo I corresponde ao texto geral da tese e os demais são artigos que posteriormente serão enviados para publicação.

O capítulo I constitui uma introdução e revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados na tese.

O capítulo II corresponde ao artigo que será submetido para publicação, apresentando o resultado do estudo das atividades enzimáticas das linhagens de *Trametes villosa* em diferentes substratos contaminados com PCF.

O capítulo III refere-se ao artigo que será submetido para publicação, demonstrando o resultado da análise de biodegradação de pentaclorofenol em solo por *Trametes villosa*.

O capítulo IV reporta ao artigo que será submetido para publicação, apresentando os resultados da identificação de genes de *Trametes villosa* por hibridização subtrativa por supressão.

O capítulo V apresenta as considerações finais, sendo portanto, um fechamento da tese.

CAPÍTULO I

1. Introdução

A partir da década de 50, com os avanços da industrialização no Brasil e com o rápido crescimento urbano, muitos resíduos industriais oriundos das indústrias químicas, farmacêuticas, de fertilizantes e de pesticidas foram gerados e lançados no meio ambiente, causando-lhe um forte impacto. Estes compostos são genericamente chamados de xenobióticos, são estáveis e não encontrando decompositores naturais, não participam dos ciclos biogeoquímicos, acumulando-se no ambiente (Leisinger 1983, Semple *et al.* 2001). Resultaram ainda na poluição do meio ambiente, colocando em risco à saúde humana e a integridade dos ecossistemas, provocando sérios problemas ecológicos e toxicológicos (Häggbloom 1992, Boopathy 2000, Pointing 2001, Rabinovich *et al.* 2004).

Na Baixada Santista no Estado de São Paulo, uma das mais industrializadas regiões do país, os solos foram contaminados com diversos resíduos industriais, contendo altas concentrações de hexaclorobenzeno (HCB), além da mistura de organoclorados como o pentaclorofenol (PCF), tri-clorobenzeno e hexaclorobutadieno, que foram resultantes da fabricação desmedida na década de 70. O pentaclorofenato de sódio (NaPCF) foi usado em formulações de fungicidas, algicidas, lesmicidas e preservativos de madeira e de tintas e o tetracloroeto de carbono, que é um desengraxante industrial, foi utilizado na indústria metalúrgica. De acordo com dados fornecidos pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB foram localizadas mais de onze áreas contaminadas com resíduos organoclorados na Baixada Santista, principalmente Cubatão, São Vicente e Itanhaém. Por exigência da CETESB cerca de 33.000 toneladas de solos contaminados foram removidas e armazenadas num local chamado de Estação de Espera, situada no Km 262 da Rodovia Padre Manuel da Nóbrega, sendo que aguardam tratamento, já que a incineração foi paralisada por determinação judicial pelo fato de não eliminar o problema, mas simplesmente transferi-lo de lugar (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus 2003, Machado *et al.* 2005).

Estes compostos são extremamente tóxicos, causam inúmeros prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente e são considerados uma classe de poluentes químicos altamente persistentes no meio ambiente e acumulam-se nos níveis tróficos superiores da cadeia alimentar (Chaudhry & Chapalamadugu 1991).

Várias técnicas físico-químicas estão disponíveis para a remoção dos poluentes orgânicos; entretanto, algumas não oferecem uma solução para a questão, uma vez que só transferem o poluente de um lugar para outro. Deste modo, a biorremediação, ou seja, o uso

de microrganismos para controlar e destruir poluentes é uma opção interessante pela possibilidade de obter a degradação de compostos contaminantes no próprio local contaminado, diminuindo enormemente os riscos ambientais (Matheus 2003).

Devido à capacidade de degradar lignina por meio de um sistema enzimático inespecífico, convertendo-a em CO₂ e água, os fungos basidiomicetos apresentam um grande potencial de aplicação em processos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (Matheus & Okino 1998, Matheus 2003). A capacidade dos fungos de podridão branca em degradar lignina torna-os o grupo mais interessante dentre os fungos para utilização em biorremediação de compostos recalcitrantes.

A biodegradação do pentaclorofenol tem sido bastante estudada, tanto como um composto modelo para o melhor entendimento dos processos de degradação pelos basidiomicetos, quanto pela importância que este composto tem do ponto de vista de contaminação ambiental. Este composto foi utilizado como herbicida e dessecante apresentando propriedades inseticidas, além de fungicida e bactericida, sendo que seu principal uso foi como preservativo de madeira. O PCF é um contaminante extremo de solos no Brasil e em várias regiões do mundo (causando sérios danos ambientais).

Machado *et al.* (2005) selecionaram, de um total de 125 espécies coletadas em diferentes ecossistemas brasileiros, duas linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel (CCB 176 e CCB 213, hoje CCIBt 2513 e CCIBt 2550, respectivamente) que se apresentaram adequadas para serem avaliadas em sistema de biorremediação de solos contaminados com PCF. Nesse estudo as linhagens de *Trametes villosa* apresentaram comportamentos diferentes quanto às atividades enzimáticas e às taxas de degradação de PCF.

O fato de linhagens de mesma espécie apresentarem um comportamento fisiológico diferente quanto à degradação de pentaclorofenol pode representar uma grande vantagem no estudo molecular dos genes e fatores que regulam a atividade enzimática e a degradação de organoclorados.

Análises moleculares de fungos basidiomicetos relacionadas com genes de enzimas ligninolíticas foram realizadas (Li *et al.* 1994, D'Souza *et al.* 1996, Yaver & Golightly 1996, Varela *et al.* 2000, Belinky *et al.* 2002, Moreira *et al.* 2005), mas até o momento, os estudos não apresentam uma correlação entre a degradação de poluentes e esses genes clonados e sequenciados.

O citocromo P450 é um dos principais sistemas enzimáticos que atuam sobre os xenobióticos. O sistema citocromo P450 em fungos é conhecido pelo envolvimento na biosíntese da parede celular, resistência antifúngica, biosíntese de micotoxinas, biotransformações químicas, desnitrificação e detoxificação de poluente ou biodegradação

(Van der Brink *et al.* 1998). Estudos fisiológicos e de identificação metabólica com compostos químicos selecionados indicam envolvimento de uma alternativa de sistemas de oxidação incluindo citocromo P450 na biodegradação (Yadav *et al.* 2003).

A técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS) é um eficiente método para detectar genes que são expressos diferentemente entre diversas células ou entre células em condições menos modificadas (Morales & Thurston 2003), devendo possibilitar a detecção dos sítios envolvidos na degradação do poluente por *Trametes villosa*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Biorremediação

Biorremediação é uma técnica que utiliza microrganismos para controlar e destruir poluentes a uma concentração a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis (dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental). É uma alternativa tecnológica atrativa, não apenas pelo baixo custo, mas também pela possibilidade de se obter a completa degradação dos compostos contaminantes. Por se tratar de processos biológicos, a biorremediação constitui uma tecnologia eficiente do ponto de vista ambiental (Machado 1998, Matheus & Machado 2002, Ballaminut 2007).

Esta tecnologia iniciou-se com as primeiras civilizações, que sem o conhecimento da teoria, usavam diversos microrganismos para a destruição de compostos tóxicos de diversos usos, como doméstico, agrícola e industrial e como resultado final a conversão desses compostos em dióxido de carbono, água e biomassa. A partir do século XIX, o biotratamento tornou-se mais avançado por meio do surgimento de novas engenharias embora ainda não tivesse sido chamado de biorremediação. Nas últimas décadas, houve o desenvolvimento de várias técnicas de biotratamento e hoje, qualquer transformação ou remoção de contaminantes por organismos, é considerada biorremediação (Litchfield 2005).

Há uma limitação na aplicação dos sistemas biológicos dependendo do local, onde os contaminantes se encontram, pois este pode inibir o crescimento ou a atividade microbiana. Alguns poluentes podem não estar disponíveis à biodegradação, como é o caso de metais pesados e alguns compostos clorados. A conjugação dos processos de biorremediação a outros tratamentos físico-químicos de remoção de poluentes torna-se interessante para melhorar a eficiência da biodegradação (Boopathy 2000, Matheus & Machado 2002).

Existem várias técnicas de biorremediação sendo cada uma com seu diferencial, com vantagens e desvantagens. A escolha de cada uma das técnicas depende de fatores decisivos,

como o tipo de microbiota existente no ambiente contaminado, assim como as condições do sítio contaminado, tipo de contaminação e sua extensão (United States 2001). Atualmente, dentre os processos utilizados na descontaminação de solos encontram-se:

Biorremediação de solo *in situ*: processo conduzido no próprio local da contaminação. É possível tratar grandes volumes de solo, não é necessária a remoção do solo contaminado e causa menor impacto de lançamento de contaminantes ao meio do que as técnicas *ex situ*. Porém, como desvantagens, temos uma menor velocidade de ação, difícil gerenciamento, sendo que apresenta somente uma melhor eficácia em locais com solos arenosos ou menos compactados (United States 2001).

Biorremediação de solo *ex situ*: processo conduzido fora do local da contaminação. É uma tecnologia rápida, de fácil controle e capaz de tratar maiores quantidades de contaminantes e tipos de solo do que as tecnologias *in situ*. Entretanto, requer escavação e pré-tratamento do solo (United States 2001).

Diversas técnicas são utilizadas com o objetivo de acelerar o processo de biodegradação (Pointing 2001, Matheus & Machado 2002; Matheus *et al.* 2003; Litchfield 2005). Alguns exemplos são:

✓ Biorremediação intrínseca ou atenuação natural: a degradação é feita pela microbiota autóctone, utilizando apenas recursos disponíveis no local.

✓ Bioestimulação: é a otimização das condições de crescimento dos microrganismos nativos do local contaminado, oferecendo a eles condições que estimulem seu metabolismo degradativo.

✓ Bioaumento ou bioenriquecimento: há a introdução de microrganismos para a degradação de um contaminante.

✓ Biofiltros: consiste em microrganismos mobilizados em colunas para tratamento de ar ou efluentes líquidos.

✓ Bioventilação: introdução de oxigênio no solo para estimular a ação dos microrganismos e evaporar o poluente.

✓ “Land farming”: sistema de tratamento de resíduos e efluentes contaminados no solo.

✓ Compostagem: é um processo de tratamento aeróbio termófilo, onde o material contaminado é misturado a um grande volume de substrato que contém a microbiota degradadora.

✓ Biorreatores: são reatores onde são introduzidos os microrganismos ou as comunidades microbianas, com controle de fatores como a aeração e a temperatura. É uma das melhores alternativas para tratamentos *ex situ*, pois o contato entre o poluente e os microrganismos é facilitado resultando em um processo mais eficiente.

Em qualquer um dos casos de biorremediação, há um grande desafio em determinar condições adequadas que promovam a mais completa degradação dos poluentes, preferencialmente até a sua mineralização, transformando-os em gás carbônico, água e minerais (Matheus 2003).

2.2. Poluentes orgânicos persistentes (POP's)

Os poluentes orgânicos persistentes (POP's) são substâncias químicas, sintetizadas pelo homem desde a década de 40, de difícil degradação devido a sua alta persistência no ambiente e apresentam uma capacidade de transporte a longas distâncias pela atmosfera e correntes marítimas assim como um grande potencial de bioacumulação e biomagnificação. Os POP's, segundo o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, são geralmente compostos orgânicos clorados aromáticos, poliaromáticos e acíclicos clorados, os quais são industriais, utilizados como agrotóxicos, agentes bioestáticos ou biocidas para preservação de madeira e outros materiais (Toledo 2002).

Em 1995, por meio do supra citado Programa, iniciaram-se as negociações para controlar o uso, produção e liberação dos POP's. O ponto culminante foi em 2001 com início da Convenção de Estocolmo, onde foi assinado um tratado por 151 países, inclusive o Brasil, com o intuito de acabar com a fabricação e utilização de 12 substâncias tóxicas, os chamados "Doze Sujos". Esta Convenção foi elaborada ao longo de três anos de negociação e concluída em dezembro de 2004. Entre os "Doze Sujos", foram incluídos oito pesticidas, tais sejam: aldrin, dieldrin, endrin, clordano, DDT, heptacloro, toxafeno e mirex, dois químicos de aplicação industrial como hexaclorobenzeno e bifenilas policloradas (PCB's) e dois resíduos; dioxinas e furanos. O projeto ainda dividiu o globo terrestre em 12 regiões geográficas, avaliou em cada região os danos e as ameaças causadas por tais substâncias, indicando as mais preocupantes do ponto de vista de contaminação, assim como as prioridades de ações de intervenção e de minimização dos impactos previstos. Para a América do Sul foram elencados oito países: Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Chile, Bolívia, Peru e Equador (Almeida *et al.* 2007).

Os POP's produzem vários efeitos tóxicos em animais e seres humanos, principalmente nos sistemas reprodutivos, nervosos e imunológicos, além de causarem câncer (Fernícola & Oliveira 2002).

2.3. Pentaclorofenol (PCF)

A biodegradação do PCF tem sido bastante estudada, por ser este um composto modelo para o melhor entendimento dos processos de degradação pelos basidiomicetos, como pela importância que este composto tem do ponto de vista de contaminação ambiental (Mileski *et al.* 1988, Lamar & Dietrich 1992, Lamar *et al.* 1994, Reddy & Gold 2000, Shim & Kawamoto 2002, Law *et al.* 2003, Walter *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005, Tortella *et al.* 2005, Walter *et al.* 2005, Marcial *et al.* 2006, Udayasoorian *et al.* 2007).

Consoante já mencionado, o PCF é um contaminante de solos no Brasil e em várias regiões do mundo, causando sérios danos ambientais (Lamar *et al.* 1994; Machado *et al.* 2005). É um pesticida clorofenólico de caráter ácido, constituído de benzeno com cinco átomos de cloro substituídos, cuja estrutura química é representada por C_6Cl_5OH (Figura 1). Este poluente pertence ao grupo dos hidrocarbonetos halogenados, é altamente resistente à degradação biótica e abiótica, e conseqüentemente apresenta uma alta persistência no meio ambiente (Pointing 2001, Semple 2001). A estabilidade do anel aromático e o alto conteúdo de cloro dessa molécula a torna de difícil degradação (Montiel *et al.* 2004).

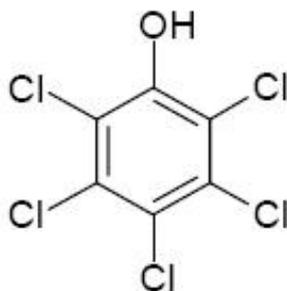


Figura 1: Estrutura química do PCF.

O PCF foi sintetizado pela primeira vez em 1872 e seu principal uso, devido ao seu amplo espectro de toxicidade e ao baixo custo, foi como preservativo de madeira durante as décadas de 1930 a 1980, juntamente com o seu sal, o pentaclorofenato de sódio (Machado *et al.* 2005). Foi ainda utilizado como bactericida, herbicida, algicida, inseticida e moluscida (McAllister *et al.* 1996 *apud* Okada 2010).

Encontrado na forma de pó e conhecido popularmente como Pó da China (Verchueren 1983), o PCF é um sólido cristalino, de cor branca com ponto de fusão a 190 °C e ebulição a 300,6 °C. É relativamente volátil, praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes

orgânicos, como metanol, etanol, acetona, benzeno e etilenoglicol. Causa sérios problemas à saúde humana com efeitos adversos em longo prazo, é carcinogênico, pode causar alterações nos sistemas imunológico e endócrino, danos hepáticos (cirrose hepática e tumores), desordens nervosas, aumenta a suscetibilidade do organismo a infecções, pode causar disfunções no aparelho reprodutivo, nervoso e glandular (Morales & Pazos 1998). O PCF atua como inibidor da fosforilação oxidativa, processo básico da respiração celular. Portanto, é tóxico a todas as formas de vida e sua alta toxicidade torna-o persistente (United States 1999).

O quadro 1 mostra outras características do PCF:

QUADRO 1. Características do Pentaclorofenol

Sinonímia	PCF; clorofenol; pentacloro
Fórmula bruta	C_6Cl_5OH
Grupo químico	organoclorado
Massa molecular	266,5
Número de registro CAS	87-86-5
Ponto de fusão (°C)	187 a 191
Ponto de ebulição (°C)	309 a 310
Pressão de vapor (atm)	0,00017 a 20 °C e 0,14 a 100 °C
Densidade (g/ml)	1,978 a 15 °C (SÓLIDO)
Persistência	elevada
Solubilidade	metanol, etanol, benzeno e etileno glicol

Quadro 1: Características do PCF. Fonte: Morales & Pazos 1998 *apud* Coelho 2007.

A remoção no ambiente deste poluente pode ser realizada por processos abióticos e bióticos. A remoção por meios bióticos capazes de retirar o PCF do ambiente pode ocorrer pela ação de microrganismos, animais e plantas. Já os processos abióticos encontram-se a volatilização, fotodecomposição (promove até 25% de degradação de PCF) e adsorção. (McAllister *et al.* 1996 *apud* Okada 2010).

O PCF foi listado como um dos principais poluentes pelas Agências de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e da União Européia (Meunier 2002). Hoje está banido de

muitos países, devido ao seu potencial carcinogênico (United States 1999). No Brasil, em 1985 o Ministério da Agricultura proibiu a comercialização, o uso e a distribuição do PCF classificando-o como agrotóxico, juntamente com outros organoclorados destinados à agricultura. Em 2006 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária proibiu todos os usos de PCF e a partir de 2007 foi proibido para qualquer finalidade, inclusive para o tratamento de madeira (Coelho 2007).

2.4. Fungos basidiomicetos

2.4.1. Fungos basidiomicetos e sua aplicação na biorremediação ambiental

Os fungos, de um modo geral, são degradadores de material orgânico na natureza, na sua maioria sapróbios e sua importância, em termos ecológicos, é o papel que desempenham na ciclagem de nutrientes. Participam ativamente nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e potássio e são degradadores de compostos orgânicos naturais persistentes (Tuomela *et al.* 2000).

Os fungos são mais interessantes para os processos de biorremediação do que as bactérias heterotróficas. Estas são utilizadas por serem mais conhecidas devido suas aplicações industriais. Porém, em algumas situações, o metabolismo bacteriano é limitado, seu sistema enzimático é produzido somente na presença do contaminante, fazendo com que sua eficiência na degradação torna-se baixa quando esse contaminante é insolúvel em água. Há casos que existem níveis indesejáveis de um contaminante no ambiente só que insuficientes para induzir a produção de enzimas bacterianas. Outros fatores de estresse ambiental, como baixos teores de nutrientes, baixos valores de pH, pouca água e elevadas concentrações do contaminante, restringem a aplicação de bactérias. Já os fungos, nessas condições principalmente de estresse ambiental conseguem crescer, se desenvolver e mostrar resultados positivos nos processos de biorremediação (Machado 1998, Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Machado 2002, Matheus 2003, Ballaminut 2007, Silva 2009, Okada 2010).

A utilização dos basidiomicetos para a biodegradação de poluentes orgânicos vem sendo muito estudada (Bumpus & Aust 1987, Aust 1990, Barr & Aust 1994, Matheus *et al.* 2000, Reddy & Gold 2000, Seradati *et al.* 2003, Walter *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2006, Ballaminut 2007, Salvi 2008, Silva 2009, Okada 2010), assim como a capacidade destes fungos em degradar PCF tem sido o objeto de vários outros trabalhos (Machado *et al.* 2005).

Um dos primeiros fungos a ser estudado foi o *Phanerochaete chrysosporium* que em meados da década de 1980 mostrou sua enorme capacidade em mineralizar poluentes, como DDT, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), benzo(a)pireno, lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) e alguns bifenilas policloradas (PCB's), bem como o PCF (Barr & Aust 1994). Além disso, *P. chrysosporium* reuniu uma série de características favoráveis, como rápido crescimento, degradação eficiente da lignina, alta temperatura de crescimento e com isso tornou-se um sistema modelo para a compreensão dos processos envolvidos na degradação da lignina. Este basidiomiceto tornou-se também modelo fundamental para os estudos químicos, bioquímicos, fisiológicos e genéticos assim como o mais utilizado em trabalhos visando a aplicação de basidiomicetos em processos biotecnológicos.

Os basidiomicetos não são só selecionados para a degradação de organoclorados em solos, quanto para a degradação de efluentes de indústrias de papel e têxtil (Matheus & Okino 1998). Foram avaliadas várias espécies nativas do estado de São Paulo e *Trametes villosa*, *Psilocybe castanella* e *Lentinus crinitus* selecionadas como as mais interessantes para a descontaminação de solos com altas taxas de PCF e HCB (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005).

A grande maioria das espécies de basidiomicetos utiliza os componentes de madeira para seu crescimento. Nos fungos degradadores de madeira destacam-se dois grupos (Alexopoulos *et al.* 1996, Bononi 1998, Matheus & Okino 1998):

✓ **Fungos causadores de podridão branca:** degradam celulose, hemicelulose e lignina, quebrando-as em moléculas menores até CO₂ e H₂O. Por isso são chamados de fungos lignocelulolíticos. Os fungos quando degradam a madeira causam a perda de resistência, tornando-a laminada, esponjosa e fibrosa e com uma coloração branca, resultando então o nome de podridão branca.

✓ **Fungos causadores de podridão parda:** degradam celulose e hemicelulose. Nos estágios finais de degradação, a madeira resulta numa aparência amorfa e escura.

O número de fungos de podridão parda é bem menor se comparado com os de podridão branca, representando em torno de 6% do total de basidiomicetos lignícolas e está associado no Hemisfério Norte à decomposição de coníferas. Porém este índice é ainda menor em regiões tropicais, em torno de 2% (Ryvarden 1991).

Quando houve o entendimento do mecanismo de degradação da lignina pelos fungos de podridão branca e do caráter inespecífico de atuação do sistema enzimático, foi proposto que este grupo de fungos poderia ser utilizado para a degradação de poluentes ambientais (Bononi 1997).

2.4.2. *Trametes villosa*

Trametes villosa (Sw.) Kreisel (Figura 2) é um fungo basidiomiceto lignícola, comumente encontrado no Brasil, pertencente ao reino Fungi, Filo Basidiomycota e Família Polyporaceae. *T. villosa* CCIBt 2513 foi selecionada entre várias espécies de basidiomicetos em estudos de biorremediação por apresentar tolerância a altas concentrações de PCF e também é capaz de reduzir de 60% sua concentração no solo (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005).

Silva *et al.* (2005) testaram três espécies de basidiomicetos e *T. villosa* foi a única a se desenvolver em solo contendo tetraclorodietoxibenzeno (produto da oxidação química do HCB).

Machado *et al.* (2005) selecionaram, de um total de 125 linhagens coletadas em diferentes ecossistemas brasileiros, duas linhagens de *T. villosa* (CCIBt 2513 e CCIBt 2550) que se apresentaram adequadas para serem avaliadas em sistema de biorremediação de solos contaminados com PCF. Nesse estudo as linhagens de *T. villosa* apresentaram comportamentos diferentes quanto às atividades enzimáticas e às taxas de degradação de PCF.



Figura 2: *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel (Foto: A. M. Gugliotta).

2.5. Enzimas ligninolíticas

Para a aplicação de fungos basidiomicetos em processos de biorremediação é de extrema importância o total conhecimento das características físico-químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por esses fungos. Normalmente os basidiomicetos conseguem tolerar altas concentrações de poluentes orgânicos possibilitando o uso destes microrganismos em processos de biorremediação; entretanto, a presença do poluente nas culturas fúngicas pode alterar e também interferir em processos metabólicos vitais para o fungo, ocasionando alterações na produção e na atividade das enzimas ligninolíticas (Moreira-Neto 2006).

As enzimas ligninolíticas dos basidiomicetos são excretadas e atuam na oxidação dos substratos em ambientes externos às células. Essas são produzidas durante o metabolismo secundário, já que a oxidação da lignina, assim como de poluentes, não fornecem energia para o fungo (Hofrichter 2002).

Kirk *et al.* (1978), a partir de estudos sobre o processo de degradação da lignina e técnicas com carbono radiomarcado ^{14}C , comprovaram que os basidiomicetos eram eficientes degradadores de lignina. A utilização deste grupo de fungos em trabalhos envolvendo a biodegradação de xenobióticos tornou-se muito interessante, por serem os únicos microrganismos capazes de metabolizar completamente a molécula de lignina convertendo-a em gás carbônico, água e sais minerais (Kirk & Shimada 1985).

A maioria dos fungos produz tanto peroxidases quanto fenoloxidasas, mas há outros que produzem apenas uma classe enzimática expressa como isoenzimas (Rothschild *et al.* 2002, Wesenberg 2003). O complexo de enzimas consiste de lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacases que podem ser definidas como fenoloxidasas. As enzimas LiP e MnP pertencem a classe das peroxidases e oxidam seus substratos pela redução de um elétron com a formação de um radical catiônico. Já a MnP atua exclusivamente como fenoloxidase em substratos fenólicos. As lacases são consideradas verdadeiras fenoloxidasas e fazem parte de um grande grupo de enzimas oxidases que complexam cobre. São produzidas por plantas superiores e por fungos, sendo secretadas pela maioria dos basidiomicetos (Higuchi 1989).

2.6. Análises moleculares e fungos basidiomicetos

Vários estudos de análises moleculares de genes de enzimas ligninolíticas e basidiomicetos foram realizados (Li *et al.* 1994, D'Souza *et al.* 1996, Yaver & Golightly

1996, Varela *et al.* 2000, Belinky *et al.* 2002, Moreira *et al.* 2005), mas até o presente não há trabalhos que associem a degradação de poluentes com genes clonados e sequenciados.

Yaver *et al.* (1996) realizaram a purificação, caracterização, clonagem e a expressão gênica de dois genes de lacase em *Trametes villosa*.

Stapleton & Dobson (2003), estudando *Trametes versicolor*, observaram que a supressão da atividade de dehidrogenase-celobiose do fungo foi mediada ao nível da transcrição gênica, sugerindo os sítios que podem estar envolvidos na mediação desta supressão.

Yadav *et al.* (2003) através da técnica de PCR em tempo real, isolaram os genes citocromo P450 monoxigenases de *Phanerochaete chrysosporium*, clonaram, sequenciaram e compararam o nível de expressão em meio limitado (ligninolítico) e meio rico (não ligninolítico).

Terrón *et al.* (2004) detectaram efeito de diversos compostos fenólicos sobre a atividade de lacase e expressão gênica desta enzima produzida por uma linhagem de *Trametes*.

Doddapanemi & Yadav (2005) estudaram a expressão e regulação da monoxigenase citocromo P450 em *Phanerochaete chrysosporium*. Este trabalho mostrou a primeira evidência molecular para a presença de componentes ativos de c-AMP e MAP quinases, sinalizando as rotas de processos de degradação de fungos de podridão branca. O citocromo P450 faz parte de um grupo importante da fase I da oxigenação das enzimas e este basidiomiceto é o modelo entre os fungos de podridão branca capaz em mineralizar compostos químicos poluentes.

Doddapaneni *et al.* (2005) clonaram e caracterizaram as duas conexões dos genes P450 monoxigenases designado para a nova família CYP63 do P450 e o gene P450 oxiredutase em *Phanerochaete chrysosporium*. Posteriormente, todo o genoma sequenciado deste fungo apresentou 148 diferentes genes de P450, um grande número detectado para um fungo.

González *et al.* (2007) observaram a indução de lacases de linhagem de *Trametes* por efluentes da indústria canavieira, ricos em melanoidina, bem como o aumento da expressão dos genes de duas isoenzimas.

Espécies de *Trametes* são estudadas por degradar TNT (2, 4, 6 – trinitrotolueno) e genes de lacase são frequentemente expressos durante essa degradação, sugerindo, portanto, que a lacase nesse fungo está relacionada na degradação de TNT e seus catabólitos. Entretanto a específica função desses genes de lacase durante a degradação ainda não são bem conhecidos (Ryu *et al.* 2008).

Singh & Chen (2008) estudaram as condições ótimas para a produção de enzimas degradadoras de enzimas ligninolíticas de *P. chrysosporium*, o qual teve também como objetivo compilar e identificar os fatores que afetam na LiP e MnP por *P. chrysosporium*, numa revisão sumarizada dos principais 200 artigos encontrados sobre o assunto. Inúmeros trabalhos relacionados com esse fungo e enzimas ligninolíticas já foram realizados.

No entanto, poucos são os trabalhos que correlacionam as expressões gênicas às atividades de degradação dos substratos estudados e sim apenas às atividades enzimáticas observadas (Ryu et al. 2008).

2.7. Hibridização subtrativa por supressão

Diatchenko *et al.* (1996) desenvolveram uma metodologia alternativa para o isolamento de genes expressos diferentemente entre diversas células ou entre células em condições menos modificadas, denominada de Hibridização Subtrativa por Supressão (HSS).

A HSS baseia-se na amplificação preferencial pela reação em cadeia da polimerase (PCR), de sequências diferencialmente representadas em duas populações de cDNA, enquanto que o fenômeno da supressão impede a amplificação das sequências comuns. Diferentemente de outros métodos para a obtenção de genes diferencialmente expressos, que possibilitam a identificação de uma pequena quantidade de genes, a HSS resulta em uma mini biblioteca enriquecida destes genes, fornecendo amplo material para a comparação de populações de mRNAs (Guzzo 2004).

Dada à eficiência dessa técnica, a HSS é amplamente usada na identificação de genes envolvidos em vários tipos de câncer e em processos de diferenciação celular. Poucos são os trabalhos com o uso de HSS em fungos basidiomicetos, mas estes já confirmaram a eficiência deste método.

Morales & Thurston (2003) fizeram o isolamento de genes diferencialmente expressos em celulose pela técnica de hibridização subtrativa por supressão em uma espécie de fungo comestível *Agaricus bisporus*.

2.8. Quantificação da expressão gênica através de PCR quantitativa (q PCR)

Um dos maiores passos da ciência no século XX foi a introdução da biologia molecular como uma ferramenta de grande valia nas Ciências Biológicas. A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) trouxe importantes benefícios e avanços científicos, como por exemplo, o sequenciamento do genoma, o estudo da genética molecular, a

expressão de genes em sistemas recombinantes entre outros importantes auxílios (Novais *et al.* 2004)

Posteriormente, uma inovação tecnológica proveniente da PCR, conhecida por PCR em Tempo Real ou PCR quantitativa (q PCR), surgiu e vem ganhando espaço por apresentar capacidade de gerar resultados quantitativos. É uma técnica que permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR que apresenta somente resultados qualitativos (Mullis 1990). Essa possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e cDNA.

As vantagens da PCR em tempo real em relação à PCR qualitativa são: a facilidade na quantificação, maior precisão, maior sensibilidade, velocidade na análise, reprodutibilidade, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação. A maior vantagem da q PCR é poder monitorar e quantificar o ciclo da reação, gerando assim, maior precisão e sensibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial do ciclo da reação de PCR denominado Cycle threshold - Ct (Bruce *et al.* 1999).

2.9. Objetivos

Comparar linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel a quanto às atividades de fenoloxidasas, assim como à degradação de pentaclorofenol;

Comparar a expressão dos genes envolvidos na atividade enzimática das linhagens de *Trametes villosa* e identificar os genes expressos na presença do pentaclorofenol e consequentemente envolvidos na atividade enzimática e degradação do poluente.

2.10. Referências bibliográficas

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W, Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4^a ed. NewYork: John Wiley and Sons.

Almeida, F.V., Caetano, A.J., Bisinoti, M.C., Jardim, W.F. 2007. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. Química Nova, 30: 1976-1985.

Aust, S.D. 1990. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. Microbial Ecology 20: 197-209.

- Ballaminut, N.** 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163p.
- Barr, D. P. & Aust, S. D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology* 28: 78-87.
- Belinky, P. A., Goldberg D., Krinfeld B., Burger M., Rothschild, N., Cogan U. & Dosoretz C. G.** 2002. Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: its function, expression and gene structure. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 754-764.
- Bononi, V. L. R.** 1997. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. *In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (eds.). Microbiologia Ambiental, Jaguariúna, Embrapa – CNPMA, 440 p.*
- Bononi, V.L.R. (org).** 1998. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 184p.
- Boopathy, R.** 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Bumpus, J.A. & Aust, S.D.** 1987. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood-rotting fungus. *In: Exner, J.H. (Ed.). Solvent Hazardous waste problems: learning from dioxins. Washington DC: American Chemistry Society 340-349.*
- Bruce, A., Bray D., Johnson A., Lewis J., Rass, M., Roberts, K. & Walter, P.** 1999. Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.
- Coelho, G. D.** 2007. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB 444 durante crescimento em solo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124 p.
- D' Souza, T.M., Booninathan & Reddy, C.A.** 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62: 3739-3744.
- Diatchenko, L. , Lau, Y.-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K. Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. & Siebert, P.D.** 1996.

Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 6025-6030.

Doddapaneni, H. & Yadav, J. S. 2005. Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Molecular Genetics and Genomics* 274: 454-466.

Doddapaneni, H., Subramanian, V. & Yadav, J. S. 2005. Physiological regulation, xenobiotic induction and heterologous expression of P450 monooxygenase gene *pc-3* (CYP63A3), a new member of the CYP63 gene cluster in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Current Microbiology* 50: 292-298.

Fernícola, N. A. G. G. & Oliveira, S. S. 2002. Produtos orgânicos persistentes: POPs. Série Caderno de Referência Ambiental v.13. Salvador, 500 p.

González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Junca, H., Carbajo, J. M., Zapico, E. J., Silva, R., Arana-Cuenca, A., Téllez, A. & González, A. E. 2007. Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. *Research in Microbiology* 59: 103 - 109.

Guzzo, S. D. 2004. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 236p.

Higuchi, T. 1989. Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. *In.*: Lewis, N. G.; Paice, M. G. (Ed.). *Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers*. Washington: American Chemical Society : 482-502.

Hägglom, M. M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.

Jiang, X., Zeng, G., Huang, D., Chen, Y., Liu, F., Huang, G., Li, J. Xi, B. & Liu, H. 2006. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 909–913.

Kirk, T. K.; Schultz, E.; Connors, W. J.; Lorenz, L. F. & Zeikus, J. G. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* 117: 277-285.

- Kirk, T. K. & Shimada, M.** 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In*: Higuchi, T. (Ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press. p. 579-605.
- Law, W. M., Lau, W. N., Lo, K. L., Wai, L. M. & Chiu, S.W.** 2003. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere* 52: 1531–1537.
- Lamar, R. T. & Dietrich, D. M.** 1992. Use of lignin-degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol-treated wood. *Journal of Industrial Microbiology* 9: 181-191.
- Lamar, R. T., Davis, M. K., Dietrich, D. M. & Glaser, J. A.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1603-1611.
- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* 39: 1183-1191.
- Li, D., Alic, M. & Gold, M.H.** 1994. Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3447-3449.
- Litchfield, C.** 2005. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioScience* 55: 273-279.
- Machado, K.M.G.** 1998. Biodegradação de pentaclofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solo contaminado com resíduos industriais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 172 p.
- Machado, K.M.G., Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2005. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 246-252.
- Marcial, J., Barrios-Gonzalez, J. & Tomasini, A.** 2006. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochemistry* 41: 496–500.
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 415-421.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2001. New basidiomycetes on bioremediation of organochlorine contaminated soil. *In: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* San Diego, Battelle Press 3: 99-106.
- Matheus, D. M., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G. & Silva, R. R. & Rodrigues, T. A.** 2003. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. *In: Magar, V. S. & Kelley, M. E. (eds.). In Situ and On-Site Bioremediation. Proceedings of the Seventh. International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium.* Orlando, Battelle Press, Paper G5.
- Matheus, D. R. & Machado, K. M. G.** 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador.* 13: 479-500.
- Matheus, D.R. & Okino, L.K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In: Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.* Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 184 p.
- McAllister, K. A.; Lee, H.; Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7: 1-40.
- Meunier, B.** 2002. Catalytic degradation of chlorinated phenols. *Science* 296: 270-271.
- Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A. & Aust, S. D.** 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2885-2889.
- Montiel, A. M., Fernández, F.J., Marcial, J., Soriano, J., Barrios-González, J. & Tomasini, A.** 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology Letters* 26: 1353–1357.
- Morales, I. C. & Pazos, C. B.** 1998. Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera y Bosques* 4: 21-37.

- Morales, P. & Thurston, C. F.** 2003. Efficient isolation of genes differentially expressed on cellulose by suppression subtractive hybridization in *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 107: 401- 407.
- Moreira, P. R., Duez, C., Dehareng D., Antunes, A., Almeida-Vara, E., Frère, J.M., Malcata, F. Xavier & Duarte, J.C.** 2005. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a Bjerkandera strain. *Journal of Biotechnology* 118: 339-352.
- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Mullis K.B.** 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 4: 36-43.
- Novais, C. M., Alves, M. P.& Silva, F. F.** 2004. Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. Edição 33.
- Okada, W. S.** 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 138 p.
- Pooting, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
- Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V. & Vasilchenco, L. G.** 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 1-17.
- Reddy, G.V.B & Gold, M. H.** 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146: 405–413.
- Rothschild, N., Novotny, C., Sasek, V. & Dosoretz, C. G.** 2002. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiology Technology* 31: 627-633.
- Ryu, S.-H., Lee, A.-Y. & Kim, M.** 2008. Molecular characteristics of two laccase from the basidiomycetes fungus *Polyporus brumalis*. *Journal of Microbiology* 46: 62-69.
- Ryvarden, L.** 1991. Genera of Polypores. *Nomenclature and Taxonomy. Synopsis Fungorum* 5: 1- 363.

- Salvi, M.B.** 2008. Degradação química e biológica de ^{14}C -Hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.
- Semple, K. T., Reid, B. J. & Fermor, T. R.** 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112: 269-283.
- Sedarati, M.R., Keshavarz, T., Leontievsky, A.A., Evans, C.S.** 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 103-114.
- Shim, S. S. & Kawamoto, K.** 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Research* 36: 4445–4454.
- Silva, E. M., Machuca, A. & Milagres, A. M. F.** 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology* 1-6.
- Silva, E. M., Machuca, A. & Milagres, A. M. F.** 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology* 1-6.
- Silva, R. R.** 2009. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 187 p.
- Singh, D. K & Chen, S.** 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 399 – 417.
- Stapleton, P. C. & Dobson A. D. W.** 2003. Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. *FEMS Microbiology Letters* 221: 167-172.
- Terrón, M. C., González T., Carbajo J. M., Yagüe S., Arana-Cuenca A., Téllez A., Dobson A. D.W. & González A. E.** 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology* 41: 954-962.

- Toledo, H. H. B.** 2002. Hexaclorobenzeno. *In*: Poluentes Orgânicos Persistentes. Fernícola, N. A. G. G.; Oliveira, S. S.– Salvador : CRA, v.13, cap.10, pág.385-416. Série Caderno de Referência Ambiental.
- Tortella, G. R., Diez, M. C. & Durán, N.** 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 197–212.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itävaara, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- Udayasoorian, C., Prabu, P. C. & Balasubramanian, G.** 2007. Degradation of Pentachlorophenol by White Rot Fungus (*Phanerochaete chrysosporium*-TL 1) Grown in Ammonium Lignosulphonate Media. *Biotechnology* 1: 76-80.
- United States.** 1999. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. National Toxicology Program (NTP). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Pentachlorophenol (CAS NO. 87-86-5) in F334/N Rats (Fedd Studies). Technical Report Series No. 483. NIH Publication No. 97-3973. Research Triangle Park, NC, 232 p.
- United States.** 2001. Environmental Protection Agency. A citizen's guide to bioremediation. www.epa.gov/superfund/sites; www.cluin.org.
- Van den Brink, H.J.M., Van Gorcom, R.F.M., Van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J.** 1998. Cytochrome P 450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 23: 1-17.
- Varela, E., Martínez, A.T. & Martínez, M.J.** 2000. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. 2000. *Journal of Biotechnology* 83: 245-251.
- Verchueren, K.** 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York. 363 p.
- Walter, M., Guthrie, J.M., Sivakumaran, S., Parker, E., Slade, A., McNaughton, D. & Boyd-Wilson, K.S.H.** 2004. Screening of New Zealand native white-rot isolates for PCP degradation. *Bioremediation Journal* 7: 119–128.
- Walter, M., Boyd-Wilson, K., Boulb, L., Ford, C., McFadden, D., Chong, B. & Pinfeld, J.** 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 51–57.
- Yadav, J. S., Soellner, M. B., Loper, J. C. & Mishra, P. K.** 2003. Tandem cytochrome P450 monooxygenase genes and splice variants in the white fungus *Phanerochaete*

chrysosporium: cloning, sequence analysis, and regulation of differential expression. *Fungal Genetics and Biology* 38: 10-21.

Yaver, D. S. & Golightly E. J. 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181: 95-102.

CAPÍTULO II: ARTIGO 1

Fenoloxidasas de linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel em diferentes substratos contaminados com pentaclorofenol

Luciana Jandelli Gimenes¹, Ricardo Harakava² & Dácio Roberto Matheus³

¹ Doutoranda do Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, São Paulo, SP

² Pesquisador Científico do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP

³ Professor Titular da Universidade Federal do ABC, Santo André, SP

Resumo

Trametes villosa (Sw.) Kreisel é uma das várias espécies de basidiomicetos selecionadas para biorremediação de solos contaminados com organoclorados. Foram avaliadas atividades de fenoloxidasas de quatro linhagens de *T. villosa* de diferentes localidades do Brasil em substratos contaminados com pentaclorofenol (PCF). O extrato enzimático foi obtido em solução tampão acetato de sódio (50 mM). Evidenciaram-se perfis enzimáticos distintos entre as linhagens na presença de PCF. Em solo sem PCF, a atividade enzimática da linhagem CCIBt 3393 foi de 40,37 UL⁻¹, CCIBt 2513 de 37,73 UL⁻¹, CCIBt 2550 foi de 9,63 UL⁻¹ e SC de 7,5 UL⁻¹. Observaram-se aumentos significativos desta atividade na presença de PCF, onde CCIBt 3393 foi de 323,64 UL⁻¹, CCIBt 2513 de 141,68 UL⁻¹ e 89,36 e 67,37 UL⁻¹ para as linhagens CCIBt 2550 e SC, respectivamente. Nos cultivos em Batata-Dextrose-Ágar, sem PCF, *T. villosa* de SC e CCIBt 3393 apresentaram atividades crescentes entre 3,97 a 40,37 UL⁻¹, enquanto CCIBt 2513 e 2550 demonstraram atividade variável aos sete dias de incubação entre 6,17 e 40,90 UL⁻¹. Os resultados mostram uma significativa variação de fenoloxidasas entre as linhagens, indicando que a atividade enzimática e a degradação de poluentes estão associadas à linhagem e não às espécies de basidiomicetos.

Palavras chave: Basidiomicetos, biodegradação, enzima ligninolítica, PCF, xenobióticos.

Apoio financeiro: FUNDEPAG/ Rhodia do Brasil/ CAPES.

Abstract

Trametes villosa (Sw.) Kreisel is one of several species of basidiomycetes selected for bioremediation of soils contaminated with organochlorines. The phenoloxidase activity of 4 strains of *T. villosa* from different localities of Brazil was evaluated in substrates contaminated with pentachlorophenol (PCP). The enzymatic extract was obtained in sodium acetate buffer (50 mM). Distinct enzymatic profiles among the strains became evident in the presence of PCP. In soil without PCP, the enzymatic activity of CCIBt 3393 was 40.37 UL⁻¹, of CCBt 2513 was 37.73 UL⁻¹, of CCIBt 2550 was 9.63 UL⁻¹ and of SC was 7.5 UL⁻¹. However, in the presence of PCP, CCIBt 3393, CCIBt 2513, CCIBt 2550 and SC showed a significant increase in activity, namely 323.64 UL⁻¹, 141.68 UL⁻¹, 89.36 UL⁻¹ and 67.37 UL⁻¹, respectively. At 7 days of incubation in potato dextrose agar medium, without PCP, cultures

of the *T. villosa* strains SC and CCIBt 3393 showed activity growths from 3.97 to 40.37 UL⁻¹, while CCIBt 2513 and CCIBt 2550 showed varied activity between 6.17 and 40.90 UL⁻¹. The results show a significant phenoloxidase variation among the strains, indicating that the enzymatic activity and the degradation of pollutants are associated with strain and not with basidiomycetes species.

Keywords: Basidiomycetes, biodegradation, ligninolytic enzyme, PCP, xenobiotics.

Financial support: FUNDEPAG/ Rhodia do Brasil/ CAPES.

Introdução

O organoclorado pentaclorofenol (PCF) foi amplamente usado como preservativo de madeira e pesticida, mas hoje está banido de vários países devido ao seu potencial carcinogênico, por ser extremamente tóxico e causar inúmeros prejuízos a saúde humana e ao meio ambiente. É considerado uma das substâncias tóxicas persistentes a serem eliminadas dos processos produtivos e dos ambientes contaminados (Almeida *et al.* 2007). O PCF tem sido utilizado como um composto modelo para estudos de degradação de compostos recalcitrantes (Coelho 2007, Häggblom 1992, McAllister *et al.* 1996, Pointing 2001).

Kirk *et al.* 1978 comprovaram que os basidiomicetos eram eficientes degradadores de lignina e a utilização deste grupo de fungos em trabalhos envolvendo a biodegradação de xenobióticos tornou-se muito interessante. São também os únicos microrganismos capazes de metabolizar completamente a molécula de lignina convertendo-a em gás carbônico, água e sais minerais (Kirk & Shimada 1985). A degradação é um processo multienzimático, resultado da ação coordenada de várias enzimas intra e extracelulares, como as lacases, peroxidases e oxidases (Boyle *et al.* 1992, Leonowicz *et al.* 1999, Tuomela *et al.* 2000, Pointing 2001). Há grande variação na atividade enzimática ligninolítica de espécies de basidiomicetos (Machado *et al.* 2005), sem no entanto se destacar diferenças intra-específicas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades de fenoloxidasas totais de *T. villosa*, assim como caracterizar as diferenças de quatro linhagens desta espécie.

Material e Métodos

Linhagens fúngicas

Foram utilizadas quatro diferentes linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel, sendo CCIBt 2513, CCIBt 2550 e CCIBt 3393 pertencentes à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) em São Paulo e a linhagem SC foi cedida pelo Herbário FLOR da UFSC. Os fungos da CCIBt foram isolados de basidiomas encontrados em madeira de mata nos municípios de São Paulo, SP (CCIBt 2550), Cruzália, SP (CCIBt 2513) e no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo (CCIBt 3393). As linhagens CCIBt 2513 e 2550 foram anteriormente selecionadas por degradar pentaclorofenol (PCF) e hexaclorobenzeno (HCB) em solos contaminados em trabalhos de Matheus *et al.* 2000 e Machado *et al.* 2005, onde foram designadas como CCB 176 e CCB 213, respectivamente.

Cultivo das linhagens em meio líquido

As linhagens de *T. villosa* foram crescidas em placas de Petri em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), 28 °C por sete dias. O conteúdo total de cada placa foi triturado em liquidificador com 100 mL de água destilada esterilizada por 30 segundos. Foram adicionados 30 mL do inóculo líquido em Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de caldo Batata-Dextrose (BD), em triplicatas, e incubados a 28 °C para crescimento. Uma porção de 1 mL do meio líquido foi retirada aos 0, 2, 4 e 7 dias de incubação para determinação das atividades enzimáticas. Após sete dias de incubação, cada Erlenmeyer contendo o meio BD com o fungo inoculado, foi contaminado com 200 mg PCF L⁻¹, diluído em 5 mL metanol P.A.

O experimento foi também realizado em diferentes situações para que fossem analisadas todas as possibilidades de interferência do metanol ao crescimento do fungo:

- i. BD + fungo sem metanol
- ii. BD + fungo + 5 mL de metanol
- iii. BD + fungo + 5 mL de metanol + PCF

Cultivo das linhagens em meio sólido

Preparo do pré-inóculo

Os fungos foram previamente cultivados em placas de Petri contendo BDA, a 28 °C por sete dias (Figura 1). Após o crescimento, as culturas foram mantidas a 4 °C para posterior utilização.



Figura 1: *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel
CCIBt 2513 com sete dias de crescimento.

Inóculo para cultivo em solo

Bagaço de cana-de-açúcar picado em tamanho de 0,5 a 1,0 cm foi misturado com 10% farinha de soja (m/m). Foi realizada a determinação da umidade do bagaço e da farinha de soja em termo balança Marte (modelo ID-50) a 110 °C por 20 minutos. A pesagem consistiu em colocar três gramas de cada amostra, em triplicata, anotados os pesos iniciais e finais, assim como a porcentagem de umidade de cada uma. De acordo com Matheus (2003) foram feitos os cálculos para adequação do peso seco x umidade e a umidade foi ajustada com água destilada até aproximadamente 70% da capacidade máxima de retenção de água – CMRA.

Porções de 100 g da mistura úmida foram colocadas (Figura 2A), em triplicata, em sacos de polipropileno e esterilizadas por 90 minutos a 121 °C (Ballaminut 2007). Cinco discos de 5 mm de crescimento micelial de cada linhagem foram retirados da colônia fúngica pré-crescida em BDA e inoculados ao substrato. Os sacos foram fechados e incubados por quinze dias (Figura 2B), a 28 °C (Matheus 2003).



Figura 2: A. Substrato sólido para preparo do inóculo fúngico, antes da incubação. B. Substrato sólido colonizado por *Trametes villosa* (CCIBt 3393), após 15 dias de incubação.

Solo

Utilizou-se solo arenoso de restinga não contaminado com pentaclorofenol (solo controle), coletado no município de São Vicente, SP, de área de jazida de areia para fabricação de vidro, legalmente instalada, tendo como características como 98% areia, pH 5,07, CTC 5,5 mEq. 100 mL⁻¹, 0,13% de matéria orgânica, 0,06% de nitrogênio, 1,00 µg g⁻¹ de fósforo, 0,01 mEq. 100 mL⁻¹ potássio, 0,13 mEq. 100 mL⁻¹ alumínio, 0,20 mEq. 100 mL⁻¹ cálcio, 0,10 mEq. 100 mL⁻¹ magnésio, 13,47 µg g⁻¹ enxofre, 3,67 µg g⁻¹ sódio, 25,53 µg g⁻¹ ferro, 0,10 µg g⁻¹ manganês, 0,10 µg g⁻¹ cobre, 0,37 µg g⁻¹ zinco, 0,10 µg g⁻¹ boro, determinadas pelo Laboratório Lagro em Campinas-SP.

A umidade do solo foi determinada com uso de termo balança como realizada para o solo. Misturou-se ao solo 2,5% de gesso comercial (peso seco), homogeneizado manualmente em sacos de polipropileno por 15 minutos para desfazer todos os grânulos e posteriormente esterilizado por tindalização (Pelczar *et al.* 1997).

Esterilização do solo (Tindalização)

Anteriormente, a esterilização do solo era realizada em câmara vedada, substituindo a atmosfera interna por brometo de metila, durante 48 horas (Moreira-Neto 2006), porém desde janeiro de 2007 foi proibida no Brasil a importação e a utilização deste produto. Portanto, para a esterilização optou-se pelo método de tindalização ou esterilização fracionada, que consistiu em esterilizar em autoclave o solo, antes da contaminação com PCF, em pressão atmosférica por 1 hora e 30 minutos, a 100 °C, durante três dias consecutivos (Pelczar *et al.* 1997).

Os sacos foram lacrados em seladora e dispostos ocupando no máximo 1/3 da autoclave para garantir uma boa esterilização.

Sistema de cultivo

Trinta gramas de solo (base seca), contaminado e controle, com 5% de emulsão de óleo de soja e Tween 20 (9:1) foram colocados em potes de vidro de 250 mL em triplicatas, autoclavados, acrescidos de 10% do inóculo de cada linhagem (base seca) e homogeneizados manualmente, conforme Matheus & Bononi (2002). Os sistemas foram umedecidos a 50% da capacidade máxima de retenção de água e a mistura foi homogeneizada manualmente com auxílio de um bastão de vidro esterilizado. Os potes foram fechados com a tampa e gaze esterilizada, para permitir as trocas gasosas. A incubação foi feita a 28 °C e a cada três dias foi realizada a correção da umidade, feita pela adição de água destilada estéril de acordo com a perda de peso dos frascos (Matheus 2003).

Para o sistema de cultivo em solo contaminado com PCF, o solo foi contaminado com 200 mg Kg⁻¹ de PCF diluído em 20 mL de metanol PA, sendo que a contaminação só foi realizada após a tindalização e homogeneizado manualmente por 15 minutos para uma perfeita incorporação. Como controles, foram usados solos nas mesmas condições, acrescidos de substrato sólido sem fungo e com adição de metanol P.A. (5 mL g⁻¹ solo).

Meio de cultivo em Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

As linhagens de *T. villosa* foram crescidas em placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a 28 °C por sete dias. Para a contaminação do BDA com PCF, antes da solidificação do meio, foram adicionados 200 mg PCF L⁻¹ diluído em 20 mL metanol P.A.

para cada 1 L de meio preparado. Nos controles foram adicionados os mesmos volumes de metanol P.A sem a adição de PCF.

Extrato enzimático de meio sólido

Os extratos enzimáticos brutos provenientes dos cultivos das diferentes linhagens em solos com e sem adição de PCF foram obtidos como descrito por Ballaminut (2007), com a adição de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 na proporção 1:3, aos 0, 2, 4 e 6 dias de incubação. Para a obtenção do extrato enzimático bruto oriundo do cultivo em meio BDA sem PCF, o conteúdo das placas com o fungo crescido foi picado e adicionado solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 na proporção de 1 : 3 (p/v), homogeneizado manualmente com bastão de vidro por 3 minutos, seguida de agitação a 120 rpm, 1 hora. O extrato foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur seguido de filtração em membrana Millipore de 0.45 μm (Moreira-Neto 2006, modificado). O sobrenadante recuperado foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas. Foram realizadas extrações enzimáticas com 0, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de incubação, a 28 °C .

Extrato enzimático de meio líquido

O extrato enzimático bruto em meio BD sem PCF consistiu em retirar porções de 1 mL do meio líquido aos 0, 2, 4 e 7 dias de incubação para determinação das atividades de fenoloxidasas em espectrofotômetro. Após sete dias de incubação o meio foi contaminado com 200 mg de PCF L⁻¹ e as atividades enzimáticas foram determinadas aos 8, 10, 12 e 15 dias de incubação. Nos tratamentos controle (sem PCF) aos sete dias foram adicionados 5 mL de metanol P.A.

Determinação da atividade de fenoloxidasas

Tanto para as amostras obtidas em meio de cultura sólido quanto em líquido, foram determinadas as atividades de fenoloxidasas em espectrofotômetro (HITACHI/ U – 2001) detectadas pela oxidação do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6- sulfônico) a 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), durante 10 min em espectrofotômetro (HITACHI / U – 2001), em temperatura ambiente, segundo método descrito por Machado & Matheus (2006). A mistura de reação continha, em 1 mL: 250 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 4,0), 600 μL do extrato enzimático, 50 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 100 μL de solução de

ABTS 5 mM. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto.

Resultados

Fenoloxidades em meio de cultura líquido Batata-Dextrose com e sem PCF

As quatro linhagens mostraram diferenças de perfis enzimáticos entre elas (Figura 3), sendo que a linhagem SC não apresentou leitura no dia 0 de incubação, mas depois teve taxas menores que CCIBt 2513 e CCIBt 3393, e maiores que CCIBt 2550. O estudo mostra, nesse caso, que a atividade enzimática foi maior para CCIBt 2513 seguida por CCIBt 3393, SC e CCIBt 2550, evidenciando comportamentos muito distintos entre as linhagens CCIBt 2513 e SC, quando comparadas com CCIBt 2550 e CCIBt 3393.

A linhagem de *T. villosa* CCIBt 2513 apresentou uma diminuição na atividade após a contaminação com PCF, aos 12 dias de incubação mostrou um pequeno aumento e depois uma queda na atividade aos 15 dias. A linhagem SC apresentou um aumento de atividade de fenoloxidasas após a adição de PCF, havendo uma queda da atividade aos 15 dias de incubação, porém menor do que a linhagem CCIBt 2513. A linhagem de *T. villosa* CCIBt 3393 foi a que apresentou menor queda após a contaminação com PCF, porém após os 12 dias de incubação mostrou um aumento na atividade de fenoloxidasas.

Após o 4º dia de incubação, a linhagem CCIBt 2550 foi contaminada com outros fungos competidores, impossibilitando a continuidade de crescimento e conseqüentemente as análises enzimáticas.

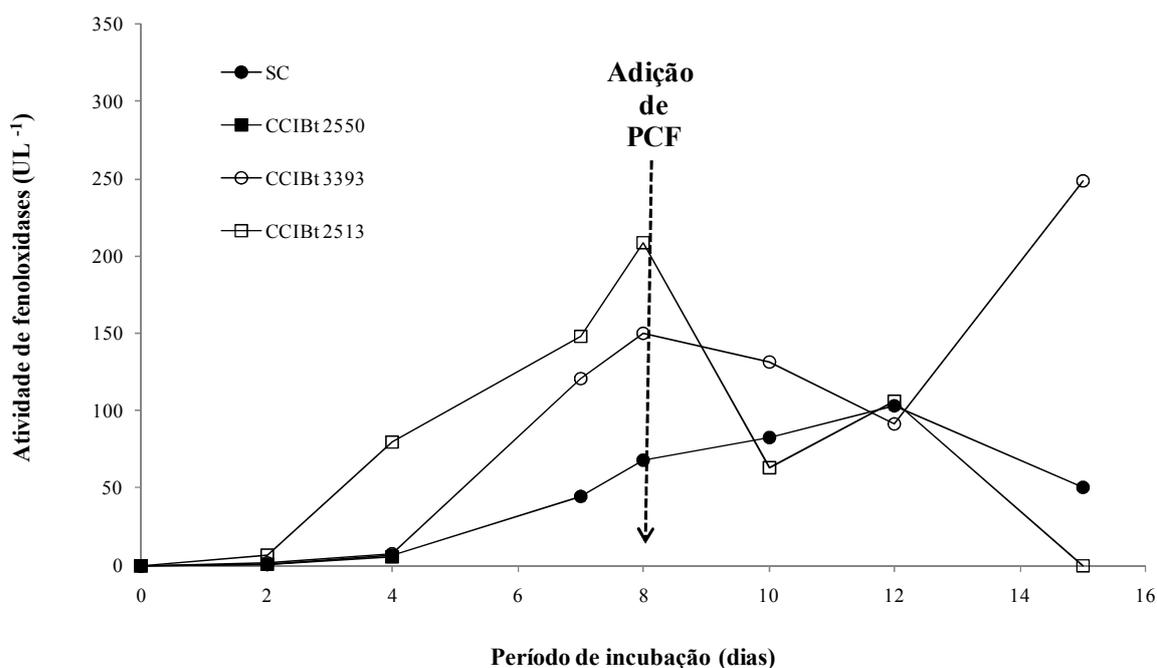


Figura 3: Atividade de fenoloxidasas de linhagens de *Trametes villosa* crescidas em meio líquido BD contaminado com 200 mg PCF L⁻¹ de meio.

Fenoloxidasas de linhagens cultivadas em meios sólidos

Em solo sem adição de PCF, *T. villosa* CCIBt 3393 apresentou aos seis dias, atividade de 40,37 UL⁻¹, que não diferiu estatisticamente das linhagens CCIBt 2513 de 37,73 UL⁻¹ (P=0,1768), mas diferiu de CCIBt 2550 com 9,63 UL⁻¹ (P=0,0054) e SC com 7,5 UL⁻¹ (P=0,0016), que não apresentaram diferenças estatísticas entre si (P=1,00) (Figura 4). A linhagem CCIBt 3393 teve um maior pico de atividade, seguida CCIBt 2513, sendo que aos seis dias praticamente se igualaram. As linhagens CCIBt 2550 e SC apresentaram perfis enzimáticos semelhantes entre si e significativamente menores que as demais.

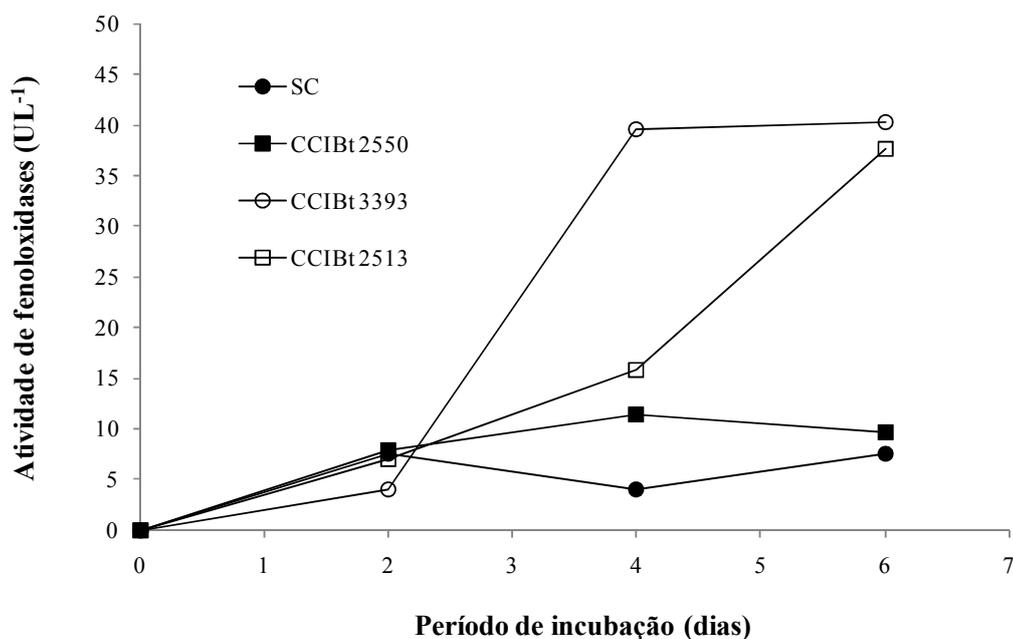


Figura 4: Atividade de fenoloxidasas de linhagens de *Trametes villosa* crescidas em solo sem PCF.

Em solo com adição de PCF houve aumento significativo da atividade de fenoloxidasas se comparado ao solo sem contaminação ($P > 0,001$), onde a linhagem CCIBt 3393 apresentou pico de atividade de $323,64 \text{ UL}^{-1}$, CCIBt 2513 foi de $141,68 \text{ UL}^{-1}$ e $89,36$ e $67,37 \text{ UL}^{-1}$ para as linhagens CCIBt 2550 e SC, respectivamente (Figura 5). Com adição do PCF observou-se um aumento de 4 a 9 vezes da atividade enzimática em relação ao solo sem PCF.

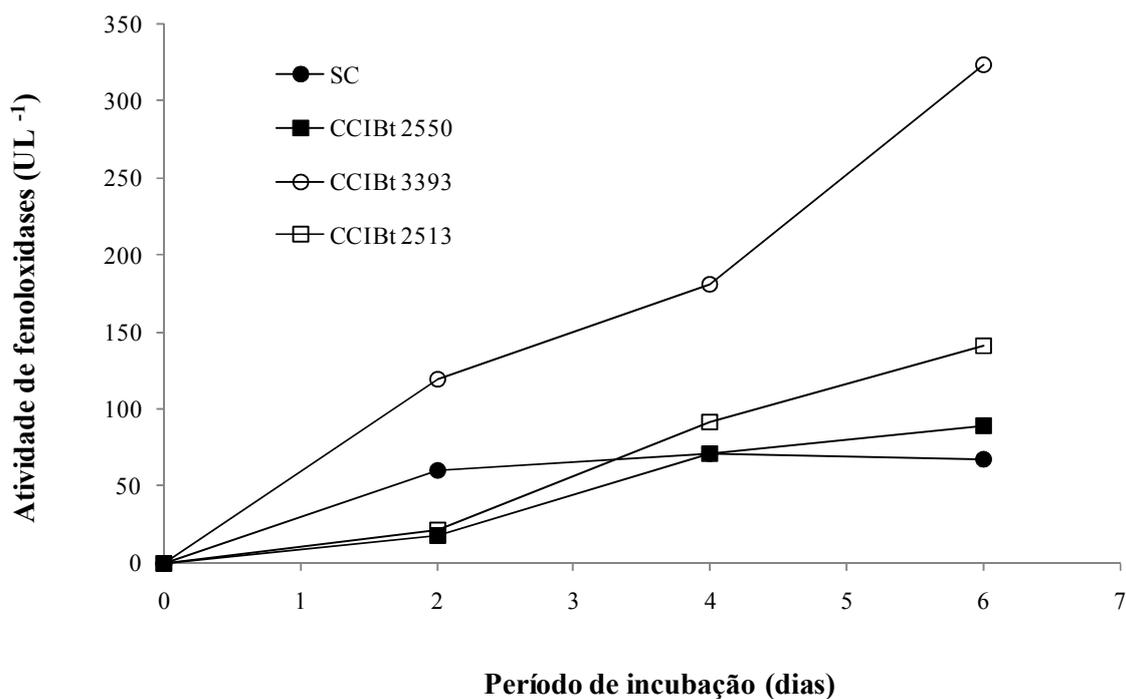


Figura 5: Atividade de fenoloxidasas de linhagens de *Trametes villosa* crescidas em solo com PCF.

Quando cultivados em BDA sem PCF (Figura 6), as linhagens de *T. villosa* SC e CCIBt 3393 apresentaram atividades de fenoloxidasas sempre crescentes, variando de 3,97 a 42,90 UL^{-1} durante a incubação, sendo que CCIBt 3393 mostrou atividade sempre maior em relação a SC. Por sua vez, *T. villosa* CCIBt 2513 e CCIBt 2550 apresentaram atividade de fenoloxidasas na mesma faixa de amplitude (de 6,17 a 40,9 UL^{-1}) até os cinco dias, diminuindo a atividade aos seis dias a partir daí apenas a linhagem CCIBt 2513 voltou a apresentar aumento da atividade, se igualando a linhagem CCIBt 3393.

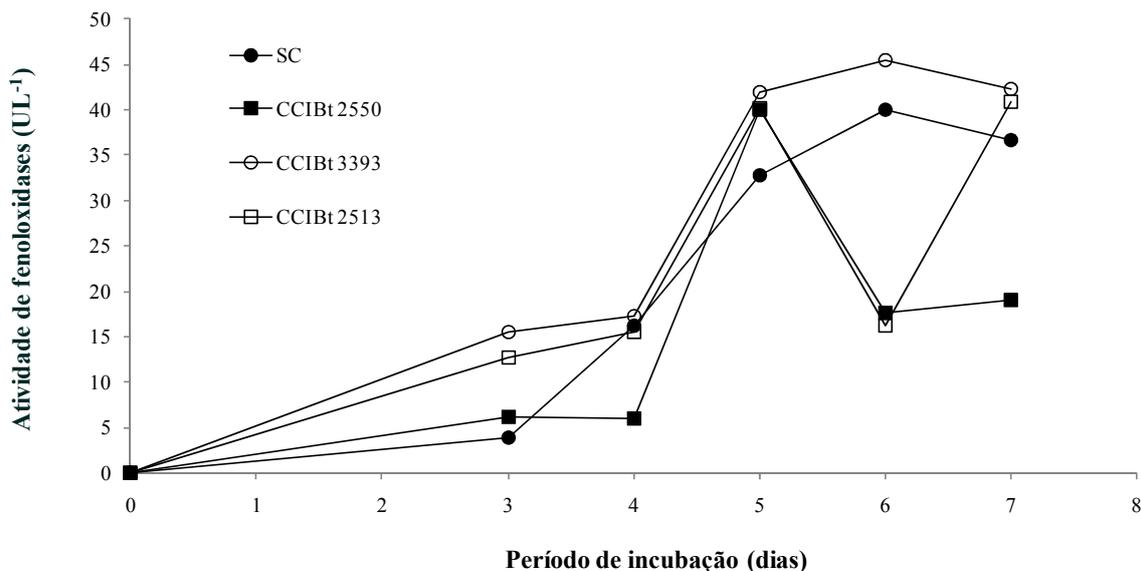


Figura 6: Atividade de fenoxidases de linhagens de *T. villosa* em meio sólido BDA sem PCF.

Todas quatro linhagens de *T. villosa* foram inoculadas também em BDA com 200 mg kg⁻¹ de PCF, sendo que apenas a linhagem CCIBt 2513 apresentou crescimento. Na ausência de PCF, esta linhagem coloniza toda a placa de Petri de 5 a 7 dias de incubação, a 28 °C (Figura 7A). Na presença do PCF observou-se um crescimento muito lento, com início somente após 15 dias de inoculação. A aparência da cultura era totalmente diferente do normal, com um crescimento irregular na placa e o micélio se concentrou entorno do inóculo, apenas com um desenvolvimento aéreo. Foi realizada análise microscópica para confirmação da espécie e constatou-se que realmente era a espécie referida e não um fungo contaminante. Após 50 dias de incubação (Figura 7B), o fungo ainda não havia crescimento para completar toda a placa (aproximadamente 4,6 cm em cada quadrante da placa). A partir daí, o meio de cultura já começou a ressecar impossibilitando, portanto a continuação do crescimento.

Foram novamente testadas as 4 linhagens com concentrações menores de PCF (6, 12, 25, 50, 100 mg kg⁻¹). Após 14 dias, não havia ocorrido crescimento micelial das 4 linhagens.

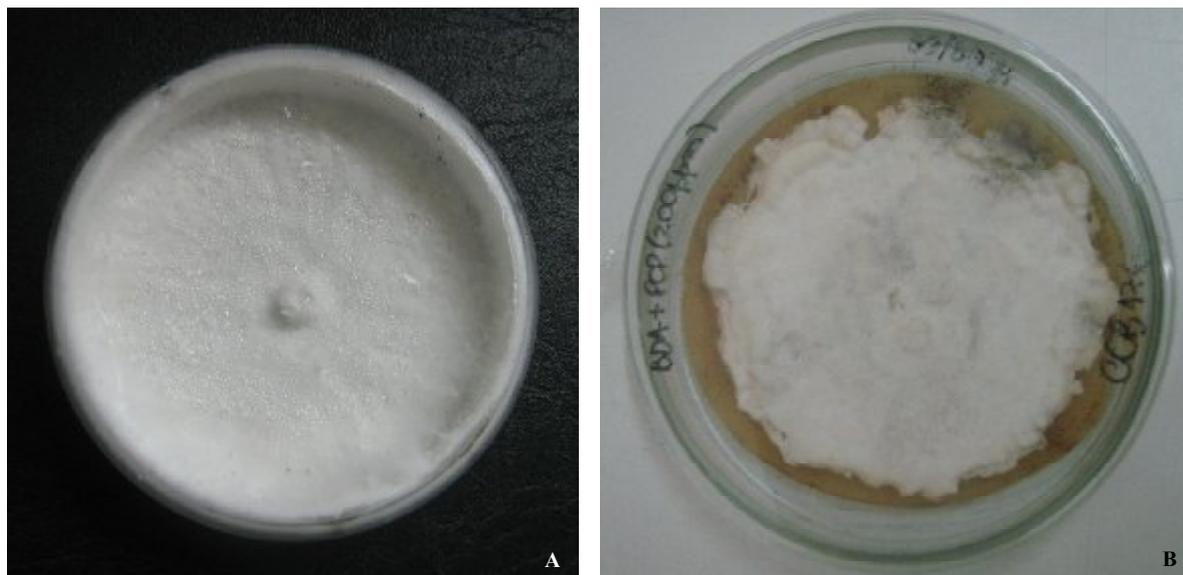


Figura 7: A. CCIBt 2513 sem PCF com 7 dias de crescimento. B. CCIBt 2513 com 200 mg kg⁻¹ de PCF com 50 dias de crescimento.

Discussão

Bending *et al.* (2002) observaram que os fungos da família Polyporaceae são capazes de produzir diferentes enzimas do sistema ligninolítico, como observado em *Lentinus crinitus* (Ballaminut & Matheus 2007, Ballaminut 2007), *Psilocybe castanella* (Moreira-Neto 2006, Okada 2010) e *Trametes villosa* (Machado 1998). Vários trabalhos comparam atividades enzimáticas entre diferentes gêneros e espécies (Rüttimann *et al.* 1992, Okino *et al.* 2000, Watanabe *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2003, Wesenberg *et al.* 2003, Herández-Luna *et al.* 2008, Ryu *et al.* 2008, Pakhadnia 2009), no entanto raros são os estudos de perfis enzimáticos relacionando apenas linhagens de uma mesma espécie. Machado (1998) avaliou o potencial de biodegradação de PCF por fungos basidiomicetos lignocelulíticos, incluindo duas linhagens de *T. villosa* (CCIBt 2513 e CCIBt 2550). Gorshina *et al.* 2006 determinaram a atividade de oxidases (lacases) no gênero *Trametes*, incluindo 4 diferentes espécies, entre elas, *T. hirsuta*, *T. ochracea*, *T. pubescens* e *T. versicolor*. No entanto, *T. villosa* não consta nesse estudo e não há comparação entre linhagens desta espécie.

Para a determinação das atividades enzimáticas tem sido escolhidos períodos até quatorze dias de incubação, dependendo do sistema de cultivo, pois é um tempo usual em estudos de degradação de poluentes (Lamar & White 2001, Matheus *et al.* 2003, Machado *et al.* 2005, Silva *et al.* 2005, Moreira-Neto 2006, Ballaminut & Matheus 2007). Como já verificado para *Psilocybe castanella* (Moreira-Neto 2006, Okada 2010) e outros fungos de podridão branca, como *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* (Vikineswary *et al.* 2006, Ballaminut 2007), o período favorável para uso do inóculo fúngico em processos de

biorremediação corresponde aos primeiros vinte dias de incubação, por apresentar maiores taxas de atividades enzimáticas ligninolíticas envolvidas na biodegradação de xenobióticos.

Como já mencionado por vários autores, as enzimas ligninolíticas não estão apenas caracterizadas como produtos secundários do metabolismo fúngico, ou seja, a produção delas está relacionada ao processo de crescimento do fungo (Papinutti *et al.* 2003, Hakala *et al.* 2005, Moreira-Neto 2006, Ballaminut 2007, Okada 2010).

Okada (2010) testou inóculos com diferentes idades e agregantes aplicados em solo contaminado com PCF, para os estudos de degradação, produção enzimática e análise de colonização do solo. Entretanto, o fungo modelo para biorremediação *P. chrysosporium*, assim como outros basidiomicetos, quando crescidos em substratos ligninocelulósicos produziram enzimas ligninolíticas extracelulares diferentes daqueles expressos em meios sintéticos (Datta *et al.* 1991, Orth *et al.* 1993, Vyas *et al.* 1994, Pal *et al.* 1995, Vares *et al.* 1995). Nos resultados obtidos, há uma diferença de atividade enzimática entre as linhagens nos três diferentes meios.

A capacidade dos basidiomicetos em tolerar altas concentrações de poluentes orgânicos já foi citada em estudos anteriores (Leontievsky *et al.* 2002, D'Annibale *et al.* 2005, Machado *et al.* 2005). Contudo a presença de compostos xenobióticos em culturas fúngicas pode alterar processos metabólicos, incluindo mudanças nas atividades enzimáticas (Bar & Aust 1994). Certos poluentes podem alterar o crescimento do fungo, muitas vezes devido à toxicidade destes compostos (Moreira-Neto 2006), assim como alterações nos sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais (Ballaminut 2007). Muitos isômeros de xilidinas (dimetilanilinas, usadas como corantes na indústria) e PCF atuam como indutores de lacases (Lutarek *et al.* 1997, Jung *et al.* 2002, Kollmann *et al.* 2005). Nas linhagens cultivadas em solo, foram observadas diferenças nos perfis enzimáticos quando adicionado o poluente, possivelmente como um mecanismo de destoxificação e *Trametes villosa* produziu um aumento na atividade ligninolítica em resposta a concentração do xenobiótico. Para o experimento em BD foi necessário que a adição do poluente fosse realizada após sete dias de crescimento do fungo, pois em todas as tentativas realizadas que se inoculava o fungo e seguido do PCF não houve crescimento micelial, concluindo-se portanto haver uma enorme interferência do poluente em relação ao crescimento fúngico, fato que ocorreu para todas as linhagens. A indução ou ativação do sistema enzimático ligninolítico dos fungos basidiomicetos brasileiros na presença de organoclorados em solo foi descrita detalhadamente por Machado *et al.* 2005.

A produção de fenoloxidasas é uma característica comum de basidiomicetos e parece estar associada à produção de peroxidases nos fungos decompositores de madeiras (Niku-

Paavola *et al.* 1990), sendo que essas são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero da lignina (Okino 1996). Aparentemente apenas os basidiomicetos são capazes de mineralizar a molécula de lignina e a utilização destes organismos em tal processo é possível devido às enzimas oxidativas como a lacase, tirosinase e peroxidases (Okino 1996). As atividades das fenoloxidasas, manganês peroxidases e das lacases já estão bem descritas na literatura e no caso de lacases e fenoloxidasas, de fácil ocorrência entre fungos de podridão branca (Srinivasan *et al.* 1995, Okino *et al.* 2000, Okada 2010).

De acordo com os resultados observados, as diferentes linhagens de *T. villosa* mostraram variações nos perfis enzimáticos nos diferentes meios de cultura. Com isso, comprovou-se que não se pode generalizar o comportamento da espécie a partir de apenas uma linhagem. Para estudos de degradação devemos nos atentar nas diferenças entre as linhagens, uma vez que a presença de PCF e diferentes substratos e linhagens mostraram comprovadamente grandes variações intraespecíficas, o que geralmente é desprezado pelos autores.

Referências Bibliográficas

- Almeida, F.V., Caetano, A.J., Bisinoti, M.C., Jardim, W.F.** 2007. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, 30: 1976-1985.
- Ballaminut, N.** 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163 p.
- Ballaminut, N. & Matheus, D. R.** 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 248 – 252
- Barr, D. P. & Aust, S. D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology* 28: 78-87.
- Bending, G. D., Friloux, M. & Walker, A.** 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters* 212: 59-63.
- Boyle, C. D., Kropp, B. R. & Reid, I. D.** 1992. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3217-3224.

- Coelho, G. D.** 2007. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB 444 durante crescimento em solo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo, 101p.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quaratino, D., Mincione, E. & Petruccioli, M.** 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* 90: 723-731.
- Datta, A., Bettermann, A. Kirk, T. K.** 1991. Identification of specific manganese peroxidases among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Applied and Environmental Microbiology* 5: 1453-1460.
- Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Biryukov, V. V., Morozova, O. V., Shleev, S. V & Yaropolov, A.I.** 2006. The Dynamics of Oxidase Activity during Cultivation of Basidiomycetes from the Genus *Trametes* Fr. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 558-563.
- Hägglom, M. M.** 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.
- Hägglom, M. M. & Valo, R. J.** 1995. Bioremediation of chlorophenol wastes. *In: Young, L. Y. & Cerninglia, C. E. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.* 389-434.
- Hakala, K. T., Lundell, T., Galkin, S., Maijala, P., Kalkkinen, N., Hatakka, A.** 2005. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbiol. Technology* 36: 461-468.
- Hernández-Luna, C.E., Soto-Gutiérrez, E.G. & Salcedo-Matínez, S.M.** 2008. Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 465-473.
- Jung, H., Xu, F. & Li, K.** 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme and Microbial Technology.* 30: 161-168.
- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F. & Zeikus, J. G.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* 117: 277-285.

- Kirk, T. K. & Shimada, M.** 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In*: Higuchi, T. (Ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press, p. 579-605.
- Kollmann, A., Boyer, F. D., Ducrot, P. H., Kerhoas, L., Jolival, C., Touton, I., Einhorn, J. & Mougin, C.** 2005. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 251-258.
- Lamar, R.T. & White, R. B.** 2001. Micoremediation – commercial status and recent developments. *In*: Glen, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). Biorremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. San Diego, Battelle Press, 3v. pp. 263-278.
- Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Golovleva, L. A., Sedarati, M. & Evans, C. S.** 2002. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentration of chlorophenols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 599-604.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtás-Wasilewska, M., Cho, N. & Hofrichter, M.** 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Rogalski, J., Jastek, M. & Malarczzyk, E.** 1997. Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: Induction by ferulic acid, partial purification, and immobilization of laccase from the high laccase-producing strain. *Cerrana unicolor*. *Acta Microbiologica Polonica*. 46: 297-311.
- Machado, K.M.G.** 1998. Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172p.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 297-301.
- Machado, K. M. G. & Matheus, D. R.** 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 468-473.

- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 161 p.
- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ¹⁴C hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In*: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Monterey, CA, Paper 2B-10.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 415-421.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G., Silva, R. R., Rodrigues, T. A.** 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. Proceedings do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.
- McAllister, K. A., Lee, H., Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7: 1-40.
- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Niku-Paavola, M. L., Karhunun, E. & Kantelinen, A.** 1990. The effect of culture conditions on the production of lignin-modifying enzymes by the White-rot fungus *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology* 13: 211-221.
- Okada, W. S.** 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 138 p.
- Okino, L. K.** 1996. Atividade ligninolítica de basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 58 p.
- Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R.** 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 889-893.
- Orth, A. B., Royse, D. J., Tien, M.** 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4017-4023.

- Pakhadnia, Y. G., Malinouski, N. I. & Lapko, A. G.** 2009. Purification and Characteristics of an Enzyme with Both Bilirubin Oxidase and Laccase Activities from Mycelium of the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry* 74: 1260-1269.
- Pal, M., Calvo, A. M., Terron, M. C.** 1995. Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 541-545.
- Papinutti, V. L., Diorio, L. A. & Forchiassin, F.** 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 157-160.
- Pelczar, M.J.Jr., Cham, E.C.S., Krieg, N.R.** 1997. *Microbiologia, conceitos e aplicações*. 2^a edição. V.1. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill.
- Pointing, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. 57: 20–33.
- Rüttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. & Vicuña, R.** 1992. Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 6: 64-76.
- Ryu, S-W, Lee, A-Y & Kim, M.** 2008. Molecular characteristics of two laccase from the basidiomycete fungus *Polyporus brumalis*. *The Journal of Microbiology* 46: 62-69.
- Silva, E. M., Machuca, A. & Milagres, A. M. F.** 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology* 37: 1-6.
- Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. & Reddy, C. A.** 1995. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied Environmental Microbiology* 61: 4274-4277.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itävaara, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- Vares, T., Kalsi, M., Hatakka, A.** 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂ dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of the remazol brilliant blue R. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3919-3927.
- Vikineswary, S.; Abdullah, N.; Renuvathani, M.; Sekaran, M.; Pandey, A.; Jones, E. B. G.** 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology* 97: 171-177.

- Vyas, B. R. M., Volc, J., Sasek, V.** 1994. Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiology* 39 (3): 235-240.
- Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y. & Kuwahara, M.** 2000. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta*. *European Journal of Biochemistry* 267: 4222-4231.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161-187.

CAPÍTULO III: ARTIGO 2

Biodegradação de pentaclorofenol em solo por linhagens de *Trametes villosa* (Sw.)

Kreisel.

Luciana Jandelli Gimenes¹, Ricardo Harakava², Elen Aquino Perpetuo³, Marcela dos Passos Galluzzi Baltazar³ & Dácio Roberto Matheus⁴

¹ Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, São Paulo, SP

² Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP

³ Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA/USP)

⁴ Universidade Federal do ABC, Santo André, SP

Resumo

Desde a década de 50, o acúmulo de produtos tóxicos ao meio ambiente, tornou-se um grave problema, sendo hoje um motivo de grande preocupação mundial. No Brasil, existem muitos casos de contaminação ambiental por organoclorados, como pentaclorofenol (PCF), um poluente de difícil degradação e altamente persistente. Entretanto, técnicas de biorremediação com a utilização de fungos basidiomicetos vem sendo adotadas, tornando-se uma alternativa tecnológica atraente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação de solo contaminado com PCF (200 mg kg^{-1}) pelo fungo basidiomiceto *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Foram estudadas quatro linhagens de *Trametes villosa* de diferentes localidades do Brasil. As linhagens foram crescidas em bagaço de cana-de-açúcar, por quinze dias a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, inoculados em 30 g de solo (base seca) contendo emulsão de óleo de soja e Tween 20 (9:1) e incubados a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. O PCF foi quantificado por CG/MS até seis dias de incubação. As linhagens apresentaram taxa de degradação entre 24 e 63%.

Palavras chave: Basidiomicetos, biorremediação, fungos, organoclorados.

Apoio financeiro: FUNDEPAG/ Rhodia do Brasil/ CAPES.

Abstract

Since the 50s, the accumulation of toxic substances to the environment, has become a serious problem and is now a major concern worldwide. In Brazil, there are many cases of environmental contamination by organochlorine compounds such as pentachlorophenol (PCP), a difficult pollutant degradation and highly persistent. However, bioremediation techniques with the use of basidiomycetes have been adopted, becoming an attractive alternative technology. The aim of this study was to evaluate the degradation of soil contaminated with PCP (200 mg kg^{-1}) by the fungus basidiomycete *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. We studied four strains of *T. villosa* from different regions of Brazil. The fungi were grown on sugarcane bagasse-cane, for 15 days at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ and inoculated in 30 g of soil (dry weight) containing emulsion of soybean oil and Tween 20 (9:1) and incubated at $28 \text{ }^\circ\text{C}$. The PCP was quantified by GC / MS for 6 days of incubation. The strains presented degradation

rates between 24 and 63%, a very interesting result when compared to previous studies with much longer periods of incubation.

Keywords: Basidiomycetes, bioremediation, fungi , organochlorine compounds.

Financial support: FUNDEPAG/ Rhodia do Brasil/ CAPES.

Introdução

O acelerado crescimento industrial e urbano das últimas décadas aumentou a quantidade e complexidade dos resíduos lançados ao meio ambiente, provocando sérios problemas ecológicos e toxicológicos. A partir da década de 50, foram sintetizados vários produtos das indústrias química e farmacêutica, sem um prévio controle dos possíveis impactos que pudessem causar ao meio ambiente, a saúde humana e a integridade dos ecossistemas (Hägglom 1992, Leisinger 1983, Boopathy 2000, Pointing 2001, Semple *et al.* 2001, Rabinovich *et al.* 2004).

Várias técnicas físico-químicas estão disponíveis para a remoção dos poluentes orgânicos, entretanto, algumas não oferecem uma solução permanente para o problema, uma vez que só transferem o poluente de um lugar para outro. Deste modo, a biorremediação é uma opção interessante pela possibilidade de obter a degradação de compostos contaminantes no próprio local contaminado, diminuindo enormemente os riscos ambientais (Matheus 2003).

O organoclorado pentaclorofenol (PCF), popularmente conhecido como Pó da China, devido ao seu grande espectro de toxicidade foi amplamente usado, durante as décadas de 1930 e 1980, como preservativo de madeira, pesticida, bactericida, herbicida, algicida, inseticida e moluscida (Lamar *et al.* 1994, Machado *et al.* 2005, McAllister *et al.* 1996, Morales & Pazos 1998, Okada 2010). Hoje está banido de vários países devido ao seu potencial carcinogênico, por ser extremamente tóxico e causar inúmeros prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente (United States 1999).

Observou-se uma capacidade diferenciada de degradação de organoclorados em solo por diferentes linhagens de *Trametes villosa* (Machado 1998) e foram selecionadas por degradar pentaclorofenol (PCF) e também hexaclorobenzeno (HCB) em solos contaminados (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação de solo contaminado com pentaclorofenol (200 mg kg^{-1}) por diferentes isolados do basidiomiceto *Trametes villosa*.

Material e métodos

Linhagens fúngicas

Foram utilizadas quatro diferentes linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel, sendo CCIBt 2513, CCIBt 2550 e CCIBt 3393 pertencentes à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) em São Paulo e a linhagem SC foi

cedida pelo Herbário FLOR da UFSC. Os fungos da CCIBt foram isolados de basidiomas encontrados em madeira de mata nos municípios de São Paulo, SP (CCIBt 2550), Cruzália, SP (CCIBt 2513) e no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo (CCIBt 3393). As linhagens CCIBt 2513 e 2550 foram anteriormente selecionadas por degradar pentaclorofenol (PCF) e hexaclorobenzeno (HCB) em solos contaminados em trabalhos de Matheus *et al.* 2000 e Machado *et al.* 2005, onde foram designadas como CCB 176 e CCB 213, respectivamente.

Preparo do pré-inóculo

Os fungos foram previamente cultivados em placas de Petri contendo BDA, a 28 °C por sete dias (Figura 1). Após o crescimento, as culturas foram mantidas a 4 °C para posterior utilização.



Figura 1: *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCIBt 2513 com sete dias de crescimento.

Inóculo

Bagaço de cana-de-açúcar picado em tamanho de 0,5 a 1,0 cm foi misturado com 10% farinha de soja (m/m). Foi realizada a determinação da umidade do bagaço e da farinha de soja em termo balança Marte (modelo ID 50) a 110 °C por 20 minutos. A pesagem consistiu em colocar três gramas de cada amostra, em triplicata, anotados os pesos iniciais e finais, assim como a porcentagem de umidade de cada uma. De acordo com Matheus (2003) foram feitos os cálculos para adequação do peso seco x umidade e a umidade foi ajustada com água

destilada até aproximadamente 70% da capacidade máxima de retenção de água – CMRA. Porções de 100 g da mistura úmida foram colocadas (Figura 2A), em triplicata, em sacos de polipropileno e esterilizadas por 90 minutos a 121 °C (Ballaminut 2007). Cinco discos de 5 mm de crescimento micelial de cada linhagem foram retirados da colônia fúngica pré-crescida em BDA e inoculados ao substrato. Os sacos foram fechados e incubados por quinze dias (Figura 2B), a 28 °C (Matheus 2003).



Figura 2: A. Substrato sólido para preparo do inóculo fúngico, antes da incubação. B. Substrato sólido colonizado por *Trametes villosa* (CCIBt 3393), após 15 dias de incubação.

Solo

Utilizou-se solo arenoso de restinga não contaminado com pentaclorofenol (solo controle), coletado no município de São Vicente, SP, de área de jazida de areia para fabricação de vidro, legalmente instalada, tendo como características como 98% areia, pH 5,07, CTC 5,5 mEq. 100 mL⁻¹, 0,13% de matéria orgânica, 0,06% de nitrogênio, 1,00 µg g⁻¹ de fósforo, 0,01 mEq. 100 mL⁻¹ potássio, 0,13 mEq. 100 mL⁻¹ alumínio, 0,20 mEq. 100 mL⁻¹ cálcio, 0,10 mEq. 100 mL⁻¹ magnésio, 13,47 µg g⁻¹ enxofre, 3,67 µg g⁻¹ sódio, 25,53 µg g⁻¹

ferro, $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ manganês, $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ cobre, $0,37 \mu\text{g g}^{-1}$ zinco, $0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ boro, determinadas pelo Laboratório Lagro em Campinas-SP.

A umidade do solo foi determinada com uso de termo balança como realizada para o solo. Misturou-se ao solo 2,5% de gesso comercial (peso seco), homogeneizado manualmente em sacos de polipropileno por 15 minutos para desfazer todos os grânulos e posteriormente esterilizado por tinalização (Pelczar *et al.* 1997).

Esterilização do solo (Tinalização)

Anteriormente, a esterilização do solo era realizada em câmara vedada, substituindo a atmosfera interna por brometo de metila, durante 48 horas (Moreira-Neto 2006), porém desde janeiro de 2007 foi proibida no Brasil a importação e a utilização deste produto. Portanto, para a esterilização optou-se pelo método de tinalização ou esterilização fracionada, que consistiu em esterilizar em autoclave o solo, antes da contaminação com PCF, em pressão atmosférica por 1 hora e 30 minutos, a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 3 dias consecutivos (Pelczar *et al.* 1997).

Os sacos foram lacrados em seladora e dispostos ocupando no máximo $1/3$ da autoclave para garantir uma boa esterilização.

Sistema de cultivo

Trinta gramas de solo (base seca), contaminado e controle, com 5% de emulsão de óleo de soja e Tween 20 (9:1) foram colocados em potes de vidro de 250 mL, autoclavados, acrescidos de 10% do inóculo de cada linhagem (base seca) e homogeneizados manualmente, conforme Matheus & Bononi (2002). Os sistemas foram umedecidos a 50% da capacidade máxima de retenção de água e a mistura foi homogeneizada manualmente com auxílio de um bastão de vidro esterilizado. Os potes foram fechados com a tampa e gaze esterilizada, para permitir as trocas gasosas. A incubação foi feita a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e a cada três dias foi realizada a correção da umidade, feita pela adição de água destilada estéril de acordo com a perda de peso dos frascos (Matheus 2003).

Para o sistema de cultivo em solo contaminado com PCF, o solo foi contaminado com 200 mg Kg^{-1} de PCF diluído em 20 mL de metanol PA, sendo que a contaminação só foi realizada após a tinalização e homogeneizado manualmente por 15 minutos para uma perfeita incorporação dos componentes. Como controles, foram usados solos nas mesmas

condições, acrescidos de substrato sólido sem fungo e adicionado o metanol P.A. nas mesmas proporções do meio contaminado com PCF.

O experimento foi montado em blocos casualizados (4 linhagens x 2 contaminações x 2 blocos).

Teste de eficiência do método de extração

Antes da extração do PCF foi testada a eficiência de diferentes solventes para utilização na extração do PCF, empregando meio de cultura BDA com PCF e fungo. Foram feitas até cinco extrações consecutivas para que fosse determinado também o número de extrações necessárias para recuperação do PCF nos experimentos futuros.

As linhagens de *T. villosa* foram crescidas em BDA + acetona + hexano, BDA + hexano e BDA + metanol. Foram então, realizados testes para verificar a eficácia dos solventes em relação aos dois métodos de extração, sendo o teste de microondas (Andréa *et al.* 2001 modificado) e o teste de ultrassom (USEPA 1983). Foram adicionados $3\text{g} \pm 0,1\text{g}$ de BDA em frascos pequenos com capacidade para 20 mL, com tampa de rosca e batoque.

Na extração pelo método de microondas, as porções das amostras foram submetidas a 16 ciclos por 20 segundos a 240 watts de potência intercalados por banhos de gelo para total resfriamento, assim como para evitar a fervura e a perda de amostra por volatilização como descrito por Ballaminut (2007).

Extração e quantificação do pentaclorofenol do solo

Retirou-se uma porção de $3,0 \pm 0,1\text{g}$ do conteúdo homogeneizado de cada frasco dos tratamentos para extração do PCF remanescente no solo e anotou-se o peso exato de cada amostra.

As porções obtidas de cada amostra foram colocadas em frascos de 24 x 65 mm com capacidade de 20 mL com tampa de rosca e batoque e adicionou-se 10 mL de metanol P.A. As amostras foram agitadas em mesa agitadora por 10 minutos, a 160 rpm e posteriormente submetidas em ultrassom por 10 minutos (USEPA 1983). O extrato foi removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o volume anotado. Após, 1 mL de cada amostra foi filtrado em membrana Millipore 0,45 μm e analisado por cromatografia gasosa (CG) aos 0, 2, 4 e 6 dias de incubação.

As análises quantitativas e qualitativas dos organoclorados foram realizadas em cromatógrafo a gás (Varian 450GC) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian 240MS), equipado com detector Ion trap, injetor Split/Spletless e coluna VF-5MS (VARIAN) composta por 5% Difenil e 95% Dimetil Polissiloxano (30m x 0.25mm x 0,25 μ m). O gás de arraste foi hélio com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com modo split de 10 vezes. A temperatura de operação foi de 260 °C no injetor. O programa de temperatura da coluna foi de 100 °C durante 3 minutos, aumento de temperatura para 250 °C a 15 °C/ min permanecendo durante 10 min, aumento novamente para 300 °C a 5 °C/ min e permanecendo assim por 1 min, resultando em uma rampa de aquecimento de 34 min.

A identificação individual dos compostos foi baseada no tempo de retenção relativo ao PCF. A quantificação do organoclorado nas amostras de solo foi calculada sobre concentrações definidas na curva padrão do PCF (Anexos 1 e 2).

Resultados

Na Figura 3 estão mostradas as porcentagens de degradação de pentaclorofenol de 0 a 6 dias de incubação das quatro diferentes linhagens de *T. villosa*.

Todas as linhagens apresentaram taxas de degradação até seis dias de incubação. A linhagem SC foi capaz de degradar 63,8%, a linhagem CCIBt 2513 degradou 42,2% e as linhagens CCIBt 2550 e CCIBt 3393 exibiram taxas de degradação de 35,9 % e 24,2% respectivamente. O controle sem fungo apresentou redução de 17,7 %, sendo menor que os tratamentos com as linhagens. Este valor não foi subtraído das porcentagens de degradação dos tratamentos.

Quanto à escolha do solvente do PCF, percebeu-se que o metanol P.A. foi melhor para a diluição do PCF. Quanto aos testes de eficiência de extração de PCF, a taxa de recuperação pelo método de ultrassom foi de 100% (Okada 2010). Esse método mostrou-se muito interessante pela sua simplicidade e eficiência.

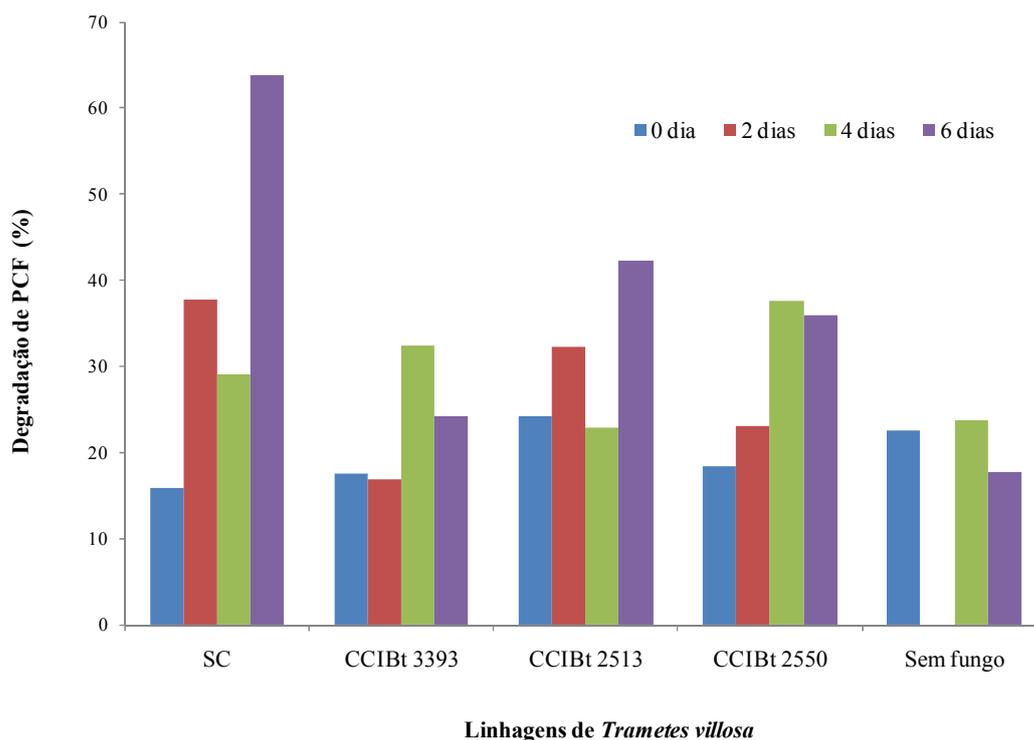


Figura 3: Porcentagem de degradação de PCF por diferentes linhagens de *T. villosa* de 0 a 6 dias de incubação.

Discussão

Em estudos anteriores com *T. villosa* já foi comprovada a capacidade em degradar compostos organoclorados (Machado 1998, Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005), entretanto, com períodos de incubação muito maiores. Nos experimentos realizados, o período foi bem menor, com até seis dias de incubação e uma redução de PCF em 63,8% para a linhagem SC, demonstrando uma rápida degradação do poluente PCF, resultante de grande eficiência do fungo em degradar o poluente empregado e da concentração do PCF usado no experimento. Pode-se afirmar que o resultado obtido foi devido a adição de óleo vegetal e tween 20 ao sistema de cultivo, melhorando as condições experimentais em relação ao trabalho de Machado (1998) e também citado por Matheus (2003), Ballaminut (2007) e Okada (2010). A adição de óleo vegetal e tween 20 ao sistema de cultivo aumentam a biodisponibilidade do poluente na solução do solo, promovendo maior crescimento fúngico e aumentando também a atividade de enzimas ligninolíticas (Matheus 2003).

T. villosa juntamente com dois outros basidiomicetos, *Peniophora cinerea* e *Psilocybe castanella* foram capazes de reduzir e mineralizar pentaclorofenol presente em solos contaminados com organoclorados (Machado 1998).

Machado *et al.* (2005) selecionaram 36 basidiomicetos de diferentes ecossistemas brasileiros, sendo que *T. villosa* CCIBt 2513 foi capaz de reduzir a quantidade de PCF no solo em 58% e *T. villosa* CCIBt 2550 em 36%, após noventa dias de incubação.

Outros trabalhos utilizando fungos basidiomicetos envolvidos na degradação de poluentes clorados também verificaram alta porcentagem de degradação em até cinco dias de incubação, porém com concentrações muito menores do que as utilizadas em nossos experimentos. Leontievsky *et al.* (2001) obtiveram 90% de remoção de 50 mg kg⁻¹ de 2,4,6-triclorofenol, aos cinco dias de incubação em culturas líquidas de *Panus tigrinus* e *Coriolus versicolor*.

Em trabalho de biodegradação de PCF por *T. versicolor* isoladas na Nova Zelândia, Walter *et al.* (2004) concluíram que concentrações acima de 200 mg kg⁻¹ foram inviáveis para avaliação da biodegradação nos ensaios desenvolvidos, devido à grande sensibilidade dos basidiomicetos quando em contato com o poluente. No entanto Matheus (1998) já havia constatado que várias espécies de basidiomicetos são sensíveis à altas concentrações de PCF, exceto as linhagens de *T. villosa* CCIBt 2513 e CCIBt 2550 que toleraram até 4.600 mg kg⁻¹ quando inoculadas em solo.

No estudo aqui apresentado, o controle sem fungo apresentou uma redução abiótica de 17,7 %. Matheus *et al.* (2000), em estudos com *Psilocybe castanella* mostraram uma redução abiótica de até 13% nos tratamentos controle sem fungo. Lamar & Dietrich (1992) constataram perdas abióticas, incluindo a adsorção à matriz sólida de cerca de 43 %. Lamar *et al.* (1994) em estudos de degradação de PCF e creosoto em solo com *Phanerochaete sordida*, observaram também uma redução abiótica de PCF em torno de 26%. Machado *et al.* 2005 constataram redução abiótica de cerca de 27 a 43% na degradação de PCF por basidiomicetos. Ballaminut (2007) constatou uma redução abiótica do PCF de 3 a 37% com 60 dias de incubação. Já foram realizados vários outros trabalhos relacionados a perdas abióticas em até 48% e aos fatores como adsorção do poluente à matriz sólida (Lamar *et al.* 1990; Lamar & Dietrich 1990; Okeke *et al.* 1993, Okeke *et al.* 1997, Matheus *et al.* 2000, Ullah *et al.* 2000a, 2000b, Ahn *et al.* 2002, Seradati *et al.* 2003).

A redução dos níveis de clorofenóis de solos não inoculados pode ser atribuída a vários fatores, como a volatilização, fotodegradação, polimerização, adsorção à matéria orgânica do solo podem contribuir para a redução dos níveis destes compostos (Apajalahti & Salkinoja-Salonen 1984, Lamar & Evans 1993, Tatsumi *et al.* 1994, Bollag & Dec 1995) e as

transformações químicas também são responsáveis pelo desaparecimento de clorofenóis em solos (Baker & Mayfield 1980, Pal *et al.* 1995).

Okada (2010) verificou que a presença dos diferentes agregantes e a idade do inóculo fúngico (10 ou 21 dias) não interferiram na quantidade do organoclorado extraído do solo, assim como a presença do fungo no sistema também não altera a eficiência do processo de extração do organoclorado. Isso foi constatado nos testes de eficiência de extração pelo método de ultrassom realizados, onde a eficiência obtida foi de 100%.

Machado (1998) mostrou capacidade de degradação de PCF muito superior pela linhagem CCIBt 2513 quando comparada com a linhagem CCIBt 2550. Neste trabalho não observou diferença tão significativa entre estas linhagens, o que pode ser explicado pelas sucessivas repicagens da cultura, principalmente da linhagem CCIBt 2513, muito estudada pelo grupo de pesquisa. Smith & Onions (1994) afirmam que frequentes transferências nas culturas são responsáveis por variações, como uma menor patogenicidade e alterações nas características fisiológicas e morfológicas. A preservação e as sucessivas transferências em meio ágar causam também instabilidade genética e a longevidade varia em torno de 6 a 12 meses em refrigerador a 4-7 °C e de 1 a 6 meses a 20-25 °C, o que é o caso das linhagens aqui estudadas.

Okada (2010) confirmou o alto nível de estresse a que os basidiomicetos foram submetidos quando incorporados ao solo e a consequente perda da viabilidade fúngica, como já descrito por Silva (2009) e também notado quando estes fungos foram expostos ao PCF, o que também pudemos observar com relação às linhagens estudadas. Assim, as variações nas taxas de degradação entre as linhagens estudadas e no comportamento das mesmas nos diferentes meios demonstram que não se pode generalizar a capacidade de uma determinada espécie em degradar algum poluente, como comumente afirma-se nos diversos trabalhos sobre o tema, sendo imprescindível especificar a linhagem ou isolado com que se está trabalhando.

Referências bibliográficas

Ahn, M.Y., Dec, J., Kim, J.E. & Bollag, J.M. 2002. Treatment of 2,4-Dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase. *Journal of Environmental Quality*. 31: 1509-1515.

- Andréa, M.M., Papini, S. & Nakagawa, L.E.** 2001. Optimizing microwave-assisted solvent extraction (MASE) of pesticides from soil. *Journal of Environmental Science and Health* 36: 87-93.
- Apajalahti, J. H., Salkinoja-Salonen, M. S.** 1984. Absorption of pentachlorophenol (PCP) by bark chips and its role in microbial PCP degradation. *Microbiol Ecology* 10: 359-367.
- Baker, M. D., C. I. Mayfield.** 1980. Microbial and Non-Biological Decomposition of Chlorophenols and Phenol in Soil. *Water, Air and Soil Pollut.* 13: 411-424.
- Ballaminut, N.** 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 176 p.
- Bollag, J. M. & Dec J.** 1995. Incorporation of halogenated substances into humic material. *In: Grimwall, A., Leer, E. W. B. (Eds), Naturally-produced organohalogens. The Netherlands: Klumer Academic Publishers, p 161-169.*
- Boopathy, R.** 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Hägglom, M. M.** 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.
- Lamar, R. T. & Dietrich, D. M.** 1990. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (10): 3093-3100.
- Lamar, R. T. & Dietrich, D. M.** 1992. Use of lignin-degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol-treated wood. *Journal of Industrial Microbiology* 9: 181-191.
- Lamar, R. T. & Evans, J. W.** 1983. Solid-phase treatment of a pentachlorophenol-contaminated soil using-degradin fungi. *Environmental Science and Technology* 27: 2566-2571.
- Lamar, R. T., Glaser, J. A. & Kirk, T. K.** 1990. Fate of pentachlorophenol (PCP) in sterile soils inoculated with the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: mineralization, volatilization and depletion of PCP. *Soil Biology and Biochemistry* 22 (4): 433-440.
- Lamar, R. T., Davis, M. K., Dietrich, D. M. & Glaser, J. A.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus

- Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1603-1611.
- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* 39: 1183-1191.
- Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Golovleva, L. A., Bucke, C. & Evans, C. S.** 2001. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 85-91.
- Machado, K. M. G.** 1998. Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados por resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 172p.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 297-301.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 415-421.
- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize 14 C-hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Monterey, CA, Paper 2B-10.*
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- McAllister, K. A., Lee, H., Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7: 1-40.
- Morales, I. C. & Pazos, C. B.** 1998. Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera Y Bosques* 4: 21-37.
- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Okada, W. S.** 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 138 p.

- Okeke, B. C., Smith, J. E., Paterson, A. & Watson-Craik, I. A.** 1993. Aerobic metabolism of pentachlorophenol by spent sawdust culture of “shitake” mushroom (*Lentinus edodes*) in soil. *Biotechnology Letters* 15: 1077-1080.
- Okeke, B. C., Paterson, A., Smith, J. E., Watson-Craik, I. A.** 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 563-569.
- Pal, M., Calvo, A. M. & Terron, M. C.** 1995. Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 541-545.
- Pelczar, M. J. Jr., Cham, E. C. S. & Krieg, N. R.** 1997. *Microbiologia, conceitos e aplicações*. 2ª edição. V.1. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill.
- Pointing, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 20–33.
- Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V. & Vasilchenco, L. G.** 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 1-17.
- Simple, K. T., Reid, B. J. & Fermor, T. R.** 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112: 269-283.
- Seradati, M. R., Keshavarz, T., Leontievsky, A. A., Evans, C. S.** 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 106-114.
- Silva, R. R.** 2009. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 187p.
- Smith, D. & Onions, A.H.S.** 1994. *The Preservation and Maintenance of Living fungi* - Commonwealth Mycological Institute, Kew. 122p.
- Tatsumi, K., Freyer, A. & Minardi, R. D.** 1994. Enzyme-mediated coupling of 3,4-dichloroaniline and ferulic acid: a model for pollutant binding to humic materials. *Environmental Science and Technology* 28: 210-215.
- Ullah, M. A., Kadhim, H., Rasatal, R. A. & Evans, C. S.** 2000a. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of

chlorophenols in aqueous effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 832-837.

Ullah, M. A., Bedford, C. T. & Evans, C. S. 2000b. Reactions of pentachlorophenol with lacase from *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 230-234.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1983. Test methods for evaluating solid wastes. SW-846. 3rd. ed. Washington, DC.

United States. 1999. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. National Toxicology Program (NTP). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Pentachlorophenol (CAS NO. 87-86-5) in F334/N Rats (Fedd Studies). Technical Report Series No. 483. NIH Publication No. 97-3973. North Carolina: Research Triangle Park, 232 p.

Walter, M., Boul, L., Chong, R. Ford, C. 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 71: 361–369.

CAPÍTULO IV: ARTIGO 3

Identificação de genes de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel induzidos pelo pentaclorofenol por hibridização subtrativa por supressão e RT-qPCR

Luciana Jandelli Gimenes¹, Dácio Roberto Matheus² & Ricardo Harakava³

¹ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, São Paulo, SP

² Professor Titular da Universidade Federal do ABC, Santo André, SP

³ Pesquisador Científico do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP

Resumo

Em estudos anteriores, duas linhagens de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel foram selecionadas por apresentarem comportamentos diferentes quanto às atividades enzimáticas e às taxas de degradação de pentaclorofenol, mostrando-se adequadas para uso em sistemas de biorremediação de solos contaminados com organoclorados. O fato de linhagens de mesma espécie mostrarem comportamento fisiológico diferente quanto à degradação de pentaclorofenol pode representar uma grande vantagem no estudo molecular dos genes e fatores que regulam a atividade enzimática e a degradação de xenobióticos. Análises moleculares em basidiomicetos relacionadas com genes de enzimas ligninolíticas estão sendo realizadas, mas, até o momento, não há estudos da correlação entre a degradação de poluentes e esses genes clonados e sequenciados. Visando identificar genes de *T. villosa* envolvidos na degradação de pentaclorofenol, foi adotada a técnica de hibridização subtrativa por supressão, por ser um eficiente método para detectar genes que são expressos diferencialmente em organismos submetidos a diferentes condições. Na biblioteca subtrativa enriquecida em genes induzidos pelo pentaclorofenol, foram encontrados genes potencialmente envolvidos na degradação desta molécula, tais como: citocromo P450, oxidases, monooxigenases e desidrogenases. Dentre estes, foram selecionados cinco genes para verificação do nível de expressão após a exposição de *T. villosa* ao pentaclorofenol, por meio de análise RT-PCR quantitativo em tempo real. Foram observados maiores níveis de expressão de um gene codificador de citocromo P450 e, com menor intensidade, de um gene codificador de monooxigenase ligada à flavina, após a exposição do fungo ao pentaclorofenol.

Palavras chave: Basidiomicetos, biodegradação, citocromo P450, hibridização subtrativa por supressão, pentaclorofenol, RT-qPCR.

Apoio financeiro: FUNDEPAG/ Rhodia do Brasil/ CAPES

Abstract

In previous studies, two strains of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel were selected for showing different behavior of enzymatic activities and PCP indexes of degradation, being appropriated in bioremediation systems in contaminated soils with organochlorines. The fact that strains of

the same species present different physiological behavior with regard to degradation of pentachlorophenol can be a great advantage in the study of genes and molecular factors that regulate enzyme activity and degradation of xenobiotics. Molecular analysis of basidiomycetes genes encoding ligninolytic enzymes are being conducted but, until now, there are no studies of the correlation between the degradation of pollutants and these genes cloned and sequenced. To identify genes from *T. villosa* involved in degradation of pentachlorophenol, were adopted the technique of suppression subtractive hybridization, because it is an efficient method to detect genes that are differentially expressed in organisms under different conditions. In the subtractive library enriched for genes induced by PCP, genes potentially involved in the degradation of this molecule, such as cytochrome P450 oxidases, monooxygenases and dehydrogenases were found. Among these, five genes were selected to verify the expression level after exposure of *T. villosa* to pentachlorophenol, using real-time quantitative RT-PCR analysis. After exposure of the fungus to pentachlorophenol, higher expression levels of a gene encoding cytochrome P450 were observed and, also of a gene encoding flavin-binding monooxygenase, but with less intensity

Key words: Basidiomycetes, biodegradation, cytochrome P450 subtractive suppression hybridization, pentachlorophenol, RT-PCR.

Financial support: FUNDEPAG/ Rhodia do Brasil/ CAPES

Introdução

O rápido crescimento industrial e urbano ocasionou um grande aumento na quantidade e complexidade dos resíduos lançados ao meio ambiente, sem um prévio controle do impacto ao meio ambiente e a saúde humana, provocando então, vários problemas ecológicos e toxicológicos, (Boopathy 2000, Leisinger 1983, Häggblom 1992, Pointing 2001, Semple *et al.* 2001, Rabinovich *et al.* 2004).

Os fungos basidiomicetos apresentam um grande potencial de aplicação em processos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (Matheus & Okino 1998, Matheus 2003) e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel é uma das várias espécies de basidiomicetos de podridão branca selecionadas para biorremediação de solos contaminados com organoclorados.

Machado *et al.* (2005) selecionaram, de um total de 125 espécies coletadas em diferentes ecossistemas brasileiros, duas linhagens de *Trametes villosa* (CCIBt 2513 e CCIBt 2550) que se apresentaram adequadas para serem avaliadas em sistema de biorremediação de solos contaminados com PCF e ambas mostraram comportamentos diferentes quanto às atividades enzimáticas e às taxas de degradação de PCF.

O fato de linhagens de mesma espécie apresentarem comportamento fisiológico diferente quanto à degradação de pentaclorofenol pode representar uma grande vantagem no estudo molecular dos genes e fatores que regulam a atividade enzimática e a degradação de organoclorados.

Estudos com análises moleculares de fungos basidiomicetos relacionadas com genes de enzimas ligninolíticas estão sendo realizados, no entanto, até o momento não há estudos da correlação entre a degradação de poluentes e esses genes clonados e sequenciados.

A técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS) é um eficiente método para detectar genes que são expressos diferentemente entre diversas células ou entre células em condições menos modificadas (Morales & Thurston 2003), devendo possibilitar a detecção dos sítios envolvidos na degradação do poluente por *Trametes villosa*.

Os objetivos do presente trabalho foram comparar a expressão dos genes envolvidos na atividade enzimática das linhagens de *T. villosa* e identificar os genes expressos na presença do pentaclorofenol e conseqüentemente envolvidos na atividade enzimática e degradação do poluente.

Material e métodos

Linhagens fúngicas

Foram utilizadas as linhagens CCIBt 2513 e CCIBt 3393 de *T. villosa* pertencentes à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) em São Paulo isoladas de basidiomas encontrados em madeira. A linhagem CCIBt 2513 foi coletada no município de Cruzália, SP e a linhagem CCIBt 3393 no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em São Paulo. As linhagens foram crescidas em placa de Petri em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a 28 °C por sete dias. O conteúdo total da placa foi triturado em liquidificador com 100 mL de água destilada esterilizada. Foram adicionados 30 mL do inóculo líquido em Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio líquido Batata-Dextrose (BD), em triplicatas, e incubados a 28 °C. Após sete dias de incubação o meio foi contaminado com 200 mg PCF L⁻¹ diluído em 5 mL de metanol P.A. Para a extração molecular foi usado meio BD com e sem adição de PCF, sendo que ao meio BD sem PCF foi também adicionado 5 mL de metanol P.A.

Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

O micélio fresco (biomassa) da linhagem CCIBt 2513 crescido em meio BD (com e sem adição de PCF) foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido resultando num pó fino ao qual foi misturado com 1 mL de reagente TRIzol[®] (Invitrogen) para a extração do RNA total seguindo as recomendações do fabricante. A extração de RNA da amostra tratada com PCF foi realizada 48 h após a adição do mesmo à cultura do fungo já crescido por sete dias.

O DNA complementar foi obtido a partir do RNA total extraído, utilizando-se o “SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit” (Clontech Laboratories Inc.).

A concentração e a pureza do RNA total foram determinadas em espectrofotômetro pela relação das absorvâncias medidas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Construção de uma biblioteca de cDNAs por hibridização subtrativa por supressão

Para a preparação de uma biblioteca de cDNA subtraída foi adotada a técnica de hibridização subtrativa por supressão (HSS). Todas as etapas da HSS foram realizadas de acordo com o manual do “PCR-Select cDNA Subtraction Kit” (Clontech Laboratories Inc.), a

partir dos cDNAs obtidos para a linhagem CCIBt 2513 de *T. villosa* crescida em meio BD, tanto para o fungo crescido em meio sem PCF (controle) quanto para o crescido em meio com PCF (tratada).

Clonagem e análise da biblioteca de cDNA subtraído

Os fragmentos de genes obtidos através da HSS foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e introduzidos em *Escherichia coli* DH10B, produzindo-se assim uma biblioteca enriquecida de genes de *T. villosa* induzidos pelo PCF.

A reação de ligação ao vetor foi realizada a 4 °C por 16 horas misturando-se 1 µL da amostra I-SF diluída cinco vezes, 2 µL de água deionizada, 5 µL de tampão de ligação 2 X, 1 µL de pGEM-T Easy e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 u/µL). Os plasmídeos de 192 clones desta biblioteca foram extraídos através de lise alcalina, para posterior sequenciamento dos mesmos.

O produto foi precipitado com 1µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 25 µL de etanol 96% durante 1 hora à - 80 °C. A amostra foi centrifugada por 20 min, 12.000 g, a 4 °C e o sedimento foi lavado com etanol 70% e seco à vácuo por 5 min. Após, o sedimento foi dissolvido em 2 µL de água deionizada esterilizada e misturado no gelo com 20 µL de células competentes de *E. coli* DH 10B.

As células de *E. coli* foram transformadas com o produto da reação de ligação utilizando-se um eletroporador (CellPorator *E. coli* Pulser, Life Technologies). Após o choque elétrico, as células foram misturadas com 1 mL de meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) e a suspensão foi mantida sob agitação a 37 °C por 50 min. Posteriormente, as células competentes de *E. coli* foram plaqueadas em LB ágar contendo ampicilina (100 mg/ 1 L), 5 µL de X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e 50 µL de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo, indutor do *operon* Lac de *E. coli*) utilizando-se alíquotas de 200 µL de suspensão por placa de Petri. Depois do plaqueamento, as culturas foram mantidas a 37 °C durante 15 horas para permitir o crescimento das colônias bacterianas. Após esse período, as colônias transformadas foram coletadas com auxílio de palitos de madeira esterilizados, sendo transferidas individualmente para blocos de 96 poços contendo meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ mL). Para o crescimento, os blocos foram mantidos a 37 °C por 22 horas a 300 rpm em agitador orbital (Forma Scientific).

Após o período das 22 horas, alíquotas foram separadas para o armazenamento permanente da biblioteca subtraída dos clones com glicerol 12,5 % em freezer - 80 °C.

Sequenciamento do DNA

Os plasmídeos extraídos dos clones da biblioteca HSS foram sequenciados empregando-se o oligonucleotídeo iniciador T7 e o reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento foram adicionados a uma microplaca para PCR contendo 96 cavidades, 2 μ L de cada plasmídeo e 8 μ L de “Big Dye Terminator” (DNA polimerase/ dNTPs/ ddNTPs) diluído 4 X no tampão de sequenciamento “save money” (Tris-HCl 50mM/ cloreto de magnésio 1,25 mM), acrescido de 3,3 picomoles de *primer forward* T7. A reação foi realizada em termociclador (PTC-200, MJ Research) utilizando-se o seguinte programa:

96 °C por 90 s para desnaturação inicial do DNA;

24 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 30 s e 60 °C durante 4 min.

Os produtos amplificados da reação de sequenciamento foram concentrados, adicionando as amostras 40 μ L de isopropanol 75 % em cada cavidade da microplaca de PCR. As placas foram vedadas com adesivo, agitadas manualmente por inversão, permanecendo à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 min. a 4.000 rpm, 20 °C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 150 μ L de isopropanol 75 %. As placas foram centrifugadas por 10 min a 4.000 rpm, 20 °C. Os sobrenadantes foram descartados e as microplacas foram novamente centrifugadas de forma invertida sobre papel absorvente (1.000 rpm, 1 min) para remover o excesso de isopropanol, sendo, em seguida, mantidas a 37 °C por 10 min para secagem. Foram adicionados 3 μ L de tampão TBE (Tris HCl/ ácido bórico/ EDTA) em cada poço da microplaca e os produtos do sequenciamento foram desnaturados em termociclador por 2 min a 95 °C. As microplacas foram imediatamente colocadas no gelo.

Os plasmídeos extraídos contendo insertos de cDNA foram separados por eletroforese capilar em gel desnaturante de poliacrilamida 5 % e posteriormente sequenciados usando ABI PRISM 377 DNA Sequencer, com ABI Big Dye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

Foram sequenciados 192 clones de cDNAs de genes isolados de fungos cultivados na presença e ausência de PCF. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados internacionais (National Center for Biotechnology Information, NCBI), através do programa BLAST X para a determinação da função dos genes presentes na biblioteca subtrativa. As funções putativas das proteínas codificadas pelos genes de *T. villosa* induzidos pelo PCF foram inferidas pela similaridade com proteínas com funções descritas presentes no NCBI.

Real time (PCR quantitativo)

Cinco genes foram identificados e escolhidos os possíveis envolvidos na degradação de PCF, a partir daí foi então realizada a técnica de RT-PCR quantitativa ou RT-PCR em tempo real para a quantificação da sua expressão. Através do programa Primer3, foram desenvolvidos pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de fragmentos dos genes codificados pelos clones HSS01-C08, HSS01-D06, HSS01-E03, HSS01-E07 e HSS01-G06 (Tabela 1). Além destes, também foi desenvolvido um par de iniciadores para o gene codificador de actina, empregado para a normalização dos níveis de expressão das amostras controle (sem PCF) e tratada (6h após adição de PCF ao meio).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR quantitativa de genes de *Trametes villosa* potencialmente envolvidos na degradação do PCF.

Clone	Função putativa	Sequências dos oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
HSS01-C08	Citocromo P450	F: CTACAGCAGCGTCACCTTCA R: ATCAAGACGGTCCTGCTCAT	150
HSS01-D06	GMC oxidoreductase	F: CCCCTTGTTCCCTAGCTTCT R: GACTGGCTCTTCCGCACTAC	192
HSS01-E03	Desidrogenase de cadeia curta	F: ATGGGTAAAGACCGACATGG R: CGAACCTCAACCTACCAAGG	156
HSS01-E07	Citocromo P450 induzida por alto teor de nitrogênio	F: TCGTGCGACCAGTGATACAT R: CGCGTCTGGCTAGACTTCTT	161
HSS01-G06	Monooxigenase ligada à flavina	F: TGTCATGCAGCTCCTTGTTT R: GTACGTGTGCGGGATGTTG	155
Actina	Citoesqueleto	F: CACGGTATCGTCACCAACTG R: CGTTGAAGGTCTCGAACATG	169

F: *forward* R: *reverse* pb: pares de bases.

Os cDNAs foram sintetizados empregando-se transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) e oligodT. Para a realização da PCR quantitativa foi empregado o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Cada gene foi amplificado em triplicata, tanto para o cDNA obtido a partir da amostra controle quanto da amostra tratada. O nível de expressão absoluta de um gene foi representado pelo Ct (cycle threshold). O nível de expressão relativa de cada gene foi calculado pelo método do $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizando-se o gene da actina como referência (Livak & Schmittgen 2001).

Quantificação relativa dos genes

O nível de expressão absoluta de um gene foi representado pelo Ct (cycle threshold). O nível de expressão relativa de cada gene foi calculado pelo método do $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001). O nível de expressão relativa R foi calculado pela fórmula $R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct tratamento} - \Delta\text{Ct controle} = [(\text{Ct gene alvo com PCP} - \text{Ct gene actina com PCF}) - (\text{Ct gene alvo sem PCF} - \text{Ct gene actina sem PCF})]$, de acordo com Livak & Schmittgen (2001). Após o término dos 40 ciclos de amplificação, foi realizada a análise de fusão (*melting*) dos produtos obtidos a fim de confirmar a sua especificidade.

Resultados

Hibridização Subtrativa por Supressão

Foram sequenciadas duas placas contendo 96 clones cada (HSS01 e HSS02). Eliminando-se os clones cujas sequências apresentaram baixa qualidade, que continham somente sequências do vetor ou que não apresentaram resultados significativos pelo Blast X, restaram setenta e dois clones cuja análise está apresentada na Tabela 2.

A função putativa da proteína codificada pelo gene sequenciado foi determinada pela função descrita para a proteína com maior nível de similaridade encontrada no GenBank. Vários clones apresentaram similaridade somente com proteínas sem função conhecida (proteínas hipotéticas), muitas das quais descritas para fungos que já tiveram seus genomas sequenciados como *Postia placenta*, *Laccaria bicolor* e *Schizophyllum commune*.

Para diversos clones, a proteína do GenBank com maior valor de E - value não apresentava função conhecida, entretanto proteínas com valores menores apresentavam uma possível função descrita. Nestes casos, estão descritos na tabela 2 tanto a proteína com maior

valor de E quanto a proteína com valor menor, mas cuja função descrita possibilita inferir a função do gene de *T. villosa*.

Dentre os diversos genes identificados, destacam-se aqueles codificadores de citocromos P450, pois diversos trabalhos indicam que estes estão envolvidos na degradação de lignina e compostos xenobióticos. Outros genes encontrados, potencialmente envolvidos nestes processos, foram as oxidases, as monooxigenases e as desidrogenases.

Tabela 2: Setenta e dois clones obtidos por hibridização subtrativa por supressão.

Clone	Função putativa	Sequência similar no GenBank	Organismo	Nível de similaridade (%)
HSS01-09	Proteína hipotética	XP_001882096	<i>Laccaria bicolor</i>	29
HSS01-10	Proteína hipotética	XP_001884054	<i>Laccaria bicolor</i>	65
HSS02-E07	Proteína hipotética	XP_001887469	<i>Laccaria bicolor</i>	31
HSS02-C01	Proteína hipotética	XP_001887469	<i>Laccaria bicolor</i>	31
HSS01-08	Proteína hipotética	XP_001887469	<i>Laccaria bicolor</i>	31
HSS02-F11	Proteína hipotética	XP_003033912	<i>Schizophyllum commune</i>	54
HSS02-04	Proteína hipotética	XP_001885860	<i>Laccaria bicolor</i>	40
HSS01-B08	Proteína hipotética	XP_002475835	<i>Postia placenta</i>	27
HSS01-B11	Proteína hipotética	XP_002471701	<i>Postia placenta</i>	45
HSS01-07	Proteína hipotética	XP_002470425	<i>Postia placenta</i>	36
HSS02-03	Proteína hipotética	XP_002470563	<i>Postia placenta</i>	47
HSS02-11	Proteína hipotética	XP_002470563	<i>Postia placenta</i>	47
HSS01-02	Proteína hipotética	XP_003038266	<i>Schizophyllum commune</i>	34
HSS01-02	Proteína hipotética	XP_003061324	<i>Micromonas pusilla</i>	50
HSS02-B06	Proteína hipotética	XP_003036827	<i>Schizophyllum commune</i>	38
HSS02-09	Proteína hipotética	XP_001835526	<i>Coprinopsis cinerea</i>	32
HSS01-09	Proteína hipotética	XP_002388773	<i>Moniliophthora perniciososa</i>	80
HSS01-10	Proteína hipotética	EDK40956	<i>Pichia guilliermondii</i>	41
HSS02-C06	Proteína hipotética	XP_002471769	<i>Postia placenta</i>	44
HSS01-09	Proteína hipotética	XP_003030151	<i>Schizophyllum commune</i>	36
HSS01-C08	Proteína hipotética	XP_002475956	<i>Postia placenta</i>	58
	Citocromo P450	XP_001836986	<i>Coprinopsis cinerea</i>	36

Continuação da tabela 2: 72 clones obtidos por hibridização subtrativa por supressão

HSS01-F06	Proteína hipotética	XP_001832250	<i>Coprinopsis cinerea</i>	40
	Citocromo P450	XP_001832850	<i>Coprinopsis cinerea</i>	38
HSS02-02	Citocromo P450	BAB59027	<i>Trametes versicolor</i>	64
HSS01-E07	Proteína hipotética	XP_0024723761	<i>Postia placenta</i>	43
	Citocromo P450 induzida por alto teor de nitrogênio	XP_001836389	<i>Coprinopsis cinerea</i>	34
HSS02-B09	Citocromo P450	AAX81445	<i>Phanerochaete</i>	45
	induzida por alto teor de nitrogênio		<i>chryso sporium</i>	
HSS02-F05	Proteína hipotética	XP_001880051	<i>Laccaria bicolor</i>	51
	Citocromo P450 induzida por alto teor de nitrogênio	AAX81444	<i>Phanerochaete</i> <i>chryso sporium</i>	55
HSS02-01	Proteína hipotética	XP_002472376	<i>Postia placenta</i>	39
	Citocromo P450 induzida por alto teor de nitrogênio	XP_001834203	<i>Coprinopsis cinerea</i>	64
HSS01-01	NADPH oxidase	XP_001828653	<i>Coprinopsis cinerea</i>	78
HSS02-07	Proteína hipotética	XP_002393314	<i>Moniliophthora pernicioso</i>	52
	oxidoreductase	XP_001886316	<i>Laccaria bicolor</i>	47
HSS02-B05	Proteína hipotética	XP_002472352	<i>Postia placenta</i>	56
	Oxidoreductase ligada ao NAD	EEH09002	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	47
HSS02-08	Proteína hipotética	XP_003032211	<i>Schizophyllum commune</i>	63
	NADH:flavina oxidoreductase	XP_002373681	<i>Aspergillus flavus</i>	65
HSS01-06	Proteína hipotética	EFQ88987	<i>Pyrenophora teres</i>	36
	Monooxigenase ligada à flavina	CBF78395	<i>Aspergillus nidulans</i>	37
HSS02-09	Proteína hipotética	XP_002476288	<i>Postia placenta</i>	56
	Monooxigenase contendo flavina	YP_003981745	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	60
HSS01-E03	Desidrogenase/reduta se de cadeia curta – carbonil redutase	YP_427032	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	58

Continuação da tabela 2: 72 clones obtidos por hibridização subtrativa por supressão

HSS02-07	Desidrogenase/redutase de cadeia curta – carbonil redutase	YP_427032	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	58
HSS02-C11	Proteína conservada	CBJ30448	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	72
	Desidrogenase/redutase de cadeia curta – carbonil redutase	ZP_06272093	<i>Streptomyces</i> sp.	56
HSS01-08	Proteína conservada	CBJ30448	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	72
	Desidrogenase/redutase de cadeia curta – carbonil redutase	ZP_06272093	<i>Streptomyces</i> sp.	56
HSS02-06	Proteína conservada	CBJ30448	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	72
	Desidrogenase/redutase de cadeia curta – carbonil redutase	ZP_06272093	<i>Streptomyces</i> sp.	56
HSS01-05	Metionina sulfoxido redutase	XP_001833847	<i>Coprinopsis cinerea</i>	78
HSS01-06	Glicose-metanol-colina oxidoreductase	XP_002469715	<i>Postia placenta</i>	50
HSS02-02	Glicose-metanol-colina oxidoreductase	XP_002469715	<i>Postia placenta</i>	69
HSS01-B04	Proteína hipotética	EFQ94937	<i>Pyrenophora teres</i>	57
	colina desidrogenase	XP_001939413	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	60
HSS02-02	Desidrogenase alcoólica	XP_001260786	<i>Neosartorya fischeri</i>	32
HSS02-08	Proteína hipotética	XP_003038277	<i>Schizophyllum commune</i>	60
	Proteína com domínio de ligação ao FAD	XP_001837398	<i>Coprinopsis cinerea</i>	50
HSS02-C05	Alquil hidroperoxido redutase/antioxidante específico ao tiol	YP_547129	<i>Polaromonas</i> sp.	40
HSS01-07	3-dehidrosphinganine redutase	XP_644366	<i>Dictyostelium discoideum</i>	80
HSS02-F01	Proteína hipotética	XP_002472351	<i>Postia placenta</i>	45
	Isoprenilcisteína carboxil metiltransferase	YP_002753804	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	30

Continuação da tabela 2: 72 clones obtidos por hibridização subtrativa por supressão

HSS01-06	Proteína hipotética	XP_002472351	<i>Postia placenta</i>	44
	Isoprenilcisteína carboxil metiltransferase	YP_002753804	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	
HSS02-05	Proteína hipotética	XP_003038485	<i>Schizophyllum commune</i>	78
	Acil-CoA tioesterase	XP_001940553	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	43
HSS02-04	Proteína eXP_ressa	XP_001841378	<i>Coprinopsis cinerea</i>	41
	Peptidase aspártica A1	XP_001876254	<i>Laccaria bicolor</i>	32
HSS02-E05	Proteína eXP_ressa	XP_001841378	<i>Coprinopsis cinerea</i>	41
	Peptidase aspártica A1	XP_001876254	<i>Laccaria bicolor</i>	32
HSS02-03	Proteína hipotética	XP_001878282	<i>Laccaria bicolor</i>	64
	Peptidase M24	XP_001833405	<i>Coprinopsis cinerea</i>	59
HSS02-F03	Proteína hipotética	XP_002474373	<i>Postia placenta</i>	84
	Deoxicidilato deaminase	NP_596442	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	68
HSS02-C02	Transportador de fosfato inorgânico	XP_001880970	<i>Laccaria bicolor</i>	73
HSS01-C02	Proteína hipotética	XP_003038205	<i>Schizophyllum commune</i>	64
	Transportador de peptídeo MTD1	XP_001834544	<i>Coprinopsis cinerea</i>	31
HSS01-B02	Proteína hipotética	XP_001877056	<i>Laccaria bicolor</i>	95
	RNA helicase dependente de ATP (fator de iniciação de tradução subunidade eIF-4a)	XP_001837040	<i>Coprinopsis cinerea</i>	95
HSS02-07	Fator de alongação 1- alpha	ABF85792	<i>Armillaria sp.</i>	74
HSS01-B03	Proteína hipotética	XP_001879030	<i>Laccaria bicolor</i>	58
	Proteína com domínio tetratricopeptídeo	XP_001837784	<i>Coprinopsis cinerea</i>	58
HSS01-B06	Proteína hipotética	XP_003032656	<i>Schizophyllum commune</i>	78
	Subunidade 34 kDa do complexo arp2/3	XP_571107	<i>CrYP_tococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	76

Continuação da tabela 2: 72 clones obtidos por hibridização subtrativa por supressão

HSS01-E01	Proteína hipotética	XP_003038800	<i>Schizophyllum commune</i>	79
	Proteína SNARE SED5/sintaxina 5	XP_001873366	<i>Laccaria bicolor</i>	68
HSS01-F05	Hidrofobina	ACM89295	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	77
HSS02-06	Hidrofobina	ACM89295	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	77
HSS02-11	Hidrofobina	ACM89288	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	60
HSS01-07	Proteína hipotética	XP_003036533	<i>Schizophyllum commune</i>	63
	Glutaminase GtaA	XP_002488333	<i>Talaromyces stipitatus</i>	57
HSS01-09	Transposase	ZP_00999958	<i>Oceanicola batsensis</i>	44
HSS01-06	Policetídeo sintase	EEQ89686	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	31
HSS02-11	Proteína hipotética	XP_001873629	<i>Laccaria bicolor</i>	79
	Subunidade 6 do signalossomo COP9	XP_001828411	<i>Coprinopsis cinerea</i>	71
HSS02-C08	ATPase tYP_o P transportadora de aminofosfolipídeo	XP_001878168	<i>Laccaria bicolor</i>	80
HSS02-F09	Profilina	XP_001879273	<i>Laccaria bicolor</i>	71
HSS02-F06	DNA-binding protein	ZP_06589090	<i>Streptomyces roseosporus</i>	56
HSS02-04	Proteína hipotética	XP_002951462	<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	31
	sintase do ácido lipóico	EEE33873	<i>Toxoplasma gondii</i>	40
HSS01-C06	Proteína hipotética	XP_003037908	<i>Schizophyllum commune</i>	85
	Subunidade sigma-2	NP_001148359	<i>Zea mays</i>	80

RT-PCR quantitativa

Foram selecionados cinco genes para verificação do nível de expressão após a exposição de *T. villosa* ao PCF (Tabela 3). Observou-se grande variação entre os dois experimentos realizados, principalmente devido à dificuldade em se obter RNA de boa qualidade a partir do fungo tratado com PCF. Entretanto, nos dois experimentos, foi possível observar que o gene codificado pelo clone HSS01-C08 (citocromo P450) foi induzido, porém com intensidades menores, o gene codificado pelo clone HSS01-G06 (monooxigenase ligada à flavina) também foi induzido pelo PCF.

Tabela 3: Verificação do nível de expressão gênica de cinco genes após 6 horas de exposição de *Trametes villosa* ao PCF.

Clone	Expressão Gênica Relativa			
	1º experimento		2º experimento	
	CCIBt 2513	CCIBt 3393	CCIBt 2513	CCIBt 3393
HSS01-C08 Citocromo P450	2,409	3,001	2,170	2,957
HSS01-D06 GMC oxidoreductase	0,161	1,560	0,114	0,643
HSS01-E03 Desidrogenase de cadeia curta	1,058	1,246	0,967	1,017
HSS01-E07 Citocromo P450 induzida por alto teor de N	0,667	2,144	0,450	0,863
HSS01-G06 Monooxigenase ligada à flavina	2,875	1,407	1,442	1,327

Discussão

Genes de lacase relacionados com basidiomicetos são objetos de estudos há alguns anos (Coll *et al.* 1993, Yaver *et al.* 1996, Mikuni & Morohoshi 1997, Karahanian *et al.* 1998, Cassland & Jonsson 1999, Hatamoto *et al.* 1999, Terrón *et al.* 2004, González *et al.* 2008, Ryu *et al.* 2008,). Entretanto, nesse trabalho não foi detectado nenhum gene do grupo das fenoloxidasas, e sim os genes codificados pelos clones HSS01-C08 citocromo P450, HSS01-D06 GMC oxidoreductase, HSS01-E03 desidrogenase de cadeia curta, HSS01-E07 citocromo P450 induzido por alto teor de nitrogênio e HSS01-G06 monooxigenase ligada à flavina.

Nos dois experimentos realizados, o gene citocromo P450 apresentou mais consistência nas duas linhagens CCIBt 2513 e 3393, mostrando ser altamente induzido quando o fungo foi tratado com PCF. Os demais clones não demonstraram muita homogeneidade nos resultados, necessitando, portanto, aprimorar mais as técnicas de extração de RNA. Isso se deve pela grande interferência do PCF na quantidade e na qualidade do RNA extraído, apresentando uma marcante diferença entre o controle e o fungo tratado com PCF.

Várias tentativas para diminuir tal interferência foram realizadas. Inicialmente as extrações de RNA total foram feitas alguns dias após a contaminação do PCF ao fungo. No entanto, sempre houve uma alteração no nível de expressão quando o fungo foi tratado com PCF. Optou-se então, pela extração aproximadamente 6 horas depois do tratamento do fungo ao PCF e conseqüentemente, foram alcançados melhores resultados. Da mesma amostra que se fez a extração de RNA após 6 horas, foi também feita extração após uma semana do tratamento do fungo com PCF e novamente foi obtido RNA de pior qualidade, confirmando a possibilidade de que o organoclorado interfere na qualidade do RNA. Embora tenham sido conseguidos melhores resultados nos experimentos de 6 horas, trata-se de algo ainda pioneiro e sem referências a serem consultadas, as técnicas precisam de adequações para obtenção de material e resultados melhores.

Até o momento não há citações sobre a interferência de xenobióticos na extração de RNA, porém a presença desses compostos em culturas fúngicas, devido à alta toxicidade, alteram processos metabólicos, como observado nos estudos das atividades enzimáticas e em crescimento dos fungos (Moreira-Neto 2006, Ballaminut 2007).

O sistema citocromo P450 em fungos é conhecido pelo envolvimento na biosíntese da parede celular, resistência antifúngica, biosíntese de micotoxinas, biotransformações químicas, desnitrificação e detoxificação poluente ou biodegradação (Van der Brink *et al.* 1998 *apud* Yadav *et al.* 2003). Vários são os exemplos de genes da família do citocromo com funções biodegradativas, entre eles o CYP53 em *Aspergillus Niger* e *Rhodotorula minuta* (Van Gorcom *et al.* 1990, Fukuda *et al.* 1994 *apud* Yadav *et al.* 2003). Estudos fisiológicos e identificação metabólica com poluentes químicos indicam o envolvimento de uma alternativa de sistemas de oxidação incluindo citocromo P450 na biodegradação de poluentes por fungos de podridão branca. Portanto, o citocromo P450 é um dos principais sistemas enzimáticos que atuam sobre os xenobióticos (Yadav *et al.* 2003).

Phanerochaete chrysosporium é o fungo de podridão branca com potencial de degradação de xenobióticos mais estudado, sendo considerado como modelo para o entendimento da fisiologia, bioquímica e genética da biodegradação da lignina e poluentes tóxicos químicos. As peroxidases e oxigenases incluindo as P450 monooxigenases têm mostrado um papel importante nos sistemas de oxidação desse fungo para a biotransformação de diferentes xenobióticos (Subramanian *et al.* 2010).

Ryu *et al.* 2008, demonstraram que o nível de transcrição dos componentes do sistema P450 monooxigenases varia de acordo com nível de nutrientes no substrato empregado. Yadav *et al.* 2003 observaram que os poluentes químicos são degradados em condições de nutrientes limitados (ligninolíticos) e nutrientes suficientes (não ligninolíticos). Peroxidases

extracelulares codificadas por famílias multigenes têm sido mostradas com papel importante nesses processos de degradação em culturas sob condições de nutrientes limitados. No entanto, pouco é conhecido sobre essas enzimas e genes envolvidos em processos de biodegradação em culturas com condições de nutrientes ricos. Estudos de identificação fisiológica e metabólica com químicos selecionados indicam haver um envolvimento nos sistemas alternativos de oxidação incluindo sistemas de citocromo P450 em biodegradação sob essas condições. A produção de lacase pode ser influenciada pela concentração de nitrogênio no meio de cultura, como fonte de carbono empregado (Gianfreda *et al.* 1999), e neste trabalho, demonstraram também que o nutriente nitrogênio foi fornecido em *Polyporus brumalis* em concentrações limitadas, entretanto induziu a produção de lacase até o nível de transcrição. Percebeu-se então, que o nitrogênio é um importante fator na regulação da expressão de lacase em fungos de podridão branca (Ryu *et al.* 2008).

O meio de cultura BD empregado nos experimentos realizados, por ser um meio rico, pode ter sido outro fator a influenciar a expressão dos genes de lacase e outras peroxidases.

Até o momento todos os estudos de genes de enzimas ligninolíticas para o gênero *Trametes* normalmente apresentam como resultados os genes do grupo de fenoloxidasas principalmente de lacases, porém, nesse trabalho mostrou-se a existência de outros genes diferentes. Doddapaneni *et al.* (2005) clonaram e caracterizaram as duas conexões dos genes P450 monoxigenases designado para a nova família CYP63 do P450 e o gene P450 oxireductase em *Phanerochaete chrysosporium*. Posteriormente, todo o genoma sequenciado deste fungo apresentou 148 diferentes genes de P450, um grande número detectado para um fungo.

Referências bibliográficas

- Ballaminut, N.** 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163 p.
- Boopathy, R.** 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Cassaland, P. & Jonsson, L.J.** 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology & Biotechnology* 52: 393-400.

- Doddapaneni, H., Subramanian, V. & Yadav, J. S.** 2005. Physiological regulation, xenobiotic induction and heterologous expression of P450 monooxygenase gene *pc-3* (CYP63A3), a new member of the CYP63 gene cluster in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Current Microbiology* 50: 292-298.
- Coll, P.M., Taberner, C., Santamaría, R. & Pérez, P.** 1993. Characterization and structural analysis of the laccase I gene from the newly isolated ligninolytic basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied Environmental Microbiology* 59: 4129-4135.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag J.** 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation* 3: 1–25.
- González, T., Terrón, M.C., Yagüe, S., Howard, J., Carbajo, J.M., Zapico, E.J., Silva, R., Arana-Cuenca, A., Téllez, A. & González, A.E.** 2008. Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. *Research in Microbiology* 159: 103-109.
- Hägglom, M. M.** 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.
- Hatamoto, O., Sekine, H., Nakano, E. & Abe, K.** 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 62: 58-64.
- Karahanian, E., Corsini, G. Lobos, S. & Vicuna, R.** 1998. Structure and expression of a laccase gene from the lignolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1443: 65-74.
- Lamar, R. T., Davis, M. K., Dietrich, D. M. & Glaser, J. A.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1603-1611.
- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotics compounds. *Experientia* 39: 1183-1191.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DDCT) method. *Methods* 25:402–408.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 297-301.

- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D. R. & Okino, L. K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In*: BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (Ed.). Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 415-421.
- McAllister, K. A.; Lee, H.; Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7: 1-40.
- Mikuni, J. & Morohoshi, N.** 1997. Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 115: 79 -84.
- Montiel, A. M., Fernández, F. F., Marcial, J., Soriano, J. Barrios-González, J. & Tomasini, A.** 2004. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorofenol degradation. *Biotechnology Letters* 26: 1353-1357.
- Morales, P. & Thurston, C. F.** 2003. Efficient isolation of genes differentially expressed on cellulose by suppression subtractive hybridization in *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 107: 401- 407.
- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Okada, W. S.** 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, USP. São Paulo. 138 p.
- Pointing, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 20–33.
- Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V. & Vasilchenco, L. G.** 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 1-17.

- Ryu, S.-H., Lee, A.-Y. & Kim, M.** 2008. Molecular characteristics of two laccase from the basidiomycetes fungus *Polyporus brumalis*. *Journal of Microbiology* 46: 62-69.
- Semple, K. T., Reid, B. J. & Fermor, T. R.** 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112: 269-283.
- Subramanian, V., Doddapaneni, H., Syed, K. & Yadav, J.S.** 2010. P 450 redox enzymes in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : gene transcription, heterologous expression, and activity analysis on the purified proteins. *Current Microbiology* 61: 306-314.
- Terrón, M. C., González T., Carbajo J. M., Yagüe S., Arana-Cuenca A., Téllez A., Dobson A. D.W. & González A. E.** 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology* 41: 954-962.
- United States.** 1999. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. National Toxicology Program (NTP). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Pentachlorophenol (CAS NO. 87-86-5) in F334/N Rats (Fedd Studies). Technical Report Series No. 483. NIH Publication No. 97-3973. Research Triangle Park, NC, 232 p.
- Van Gorcom, R. F. M., Boschloo, J. G., Kuijvenhovem, A., Lange, J., Van Varke, A. J., Bos, C. J., Van Balken, J. A. M., Pauwels, P. H. & Van den Hondel, C. A. M. J. J.** 1990. Isolation and molecular characterization of the benzoate para-hydroxylase gene (*bphA*) of *aspergillus niger*: a member of a new family of the cytochrome P450 superfamily. *Molecular Genetics and Genomics* 223: 192-197.
- Yadav, J. S., Soellner, M. B., Loper, J. C. & Mishra, P. K.** 2003. Tandem cytochrome P450 monooxygenase genes and splice variants in the white fungus *Phanerochaete chrysosporium*: cloning, sequence analysis, and regulation of differential expression. *Fungal Genetics and Biology* 38: 10-21.
- Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. & Dalboge, H.** 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 834–841.

CONCLUSÕES

Como já mencionado em diversos trabalhos, *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel é um fungo muito interessante para ser usado em degradação de poluentes orgânicos. O fungo foi capaz de promover uma redução significativa de pentaclorofenol num período bem pequeno (6 dias), podendo ser utilizado em tratamentos de biorremediação de solos contaminados.

Os resultados mostram uma significativa variação nas atividades de fenoloxidasas e nas taxas de degradação entre as linhagens, indicando que a atividade enzimática e a degradação de poluentes estão associadas à linhagem e não às espécies de basidiomicetos.

Em trabalhos anteriores nunca haviam sido realizadas comparações entre linhagens de mesma espécie. Com os resultados obtidos, foi comprovado que não se pode generalizar dizendo que determinada espécie é adequada para degradação de poluentes, já que linhagens diferentes de *T. villosa* apresentaram comportamentos completamente distintos.

A presença de pentaclorofenol promoveu estímulo nas atividades de fenoloxidasas, provavelmente seja resultado de um mecanismo de destoxificação por *Trametes villosa* em resposta a presença do poluente no meio.

Cinco genes foram identificados e houve grande diferença entre o meio controle e tratado com PCF na obtenção do RNA, indicando uma enorme interferência do poluente nas extrações de RNA, resultando na presença de PCF em cinco genes (citocromo P450, GMC oxidoreductase, desidrogenase de cadeia curta, citocromo P450 induzido por alto teor de nitrogênio e monooxigenase ligada à flavina), os quais não se manifestam na ausência de PCF.

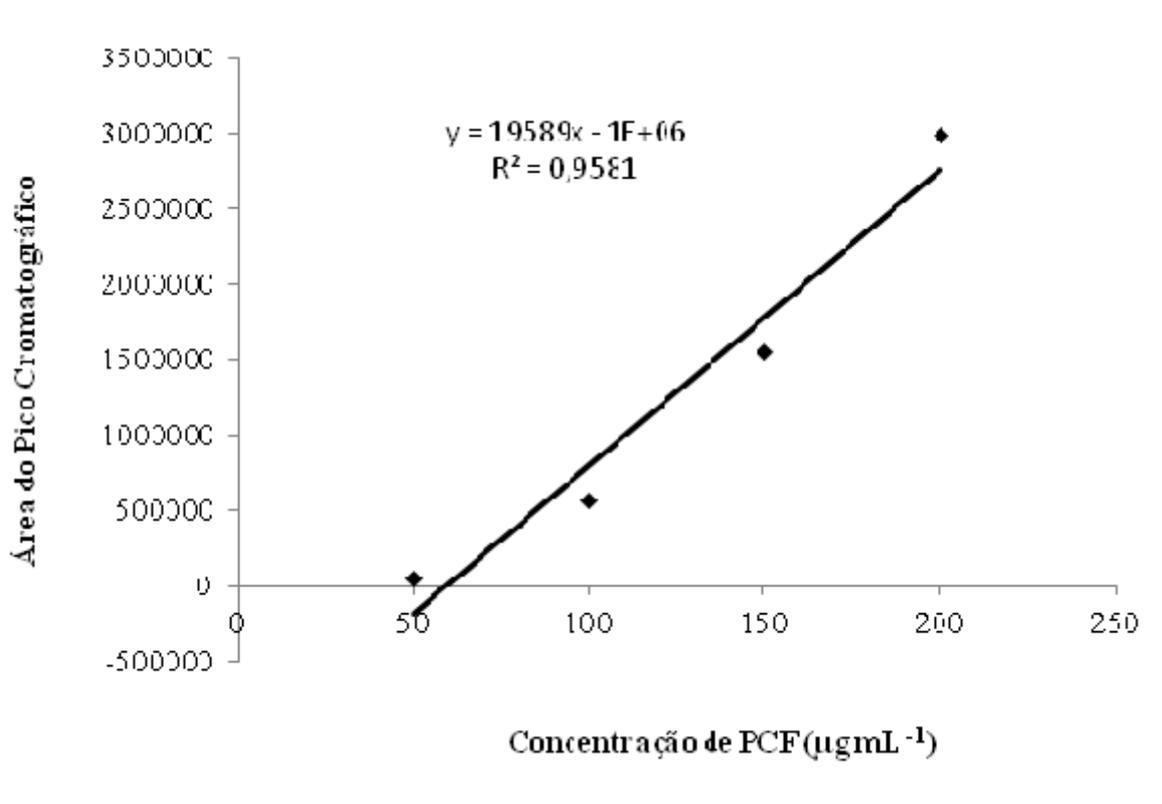
Até o momento todos os estudos de genes de enzimas ligninolíticas para o gênero normalmente apresentam como resultados os genes do grupo de fenoloxidasas principalmente de lacases. No entanto, nesse trabalho destacou-se a expressão dos genes diferenciais que só se expressam quando na presença do PCF. A maioria destes genes está relacionada aos mecanismos da cadeia respiratória e manutenção do efeito tampão de oxiredução do citoplasma, o que deve ser uma forma de compensação dos efeitos do PCF sobre as células das linhagens avaliadas. Trata-se de algo ainda pioneiro e sem referências a serem consultadas, portanto, as técnicas precisam de adequações para obtenção de material de melhor qualidade e conseqüentemente mais resultados serão obtidos.

ANEXO 1

Curva padrão de concentrações conhecidas de pentaclorofenol (PCF), utilizada para quantificação do pentaclorofenol (PCF) recuperado nos extratos do solo.

Equação da reta $y = 19589x - 1E + 06$

$R^2 = 0,9581$

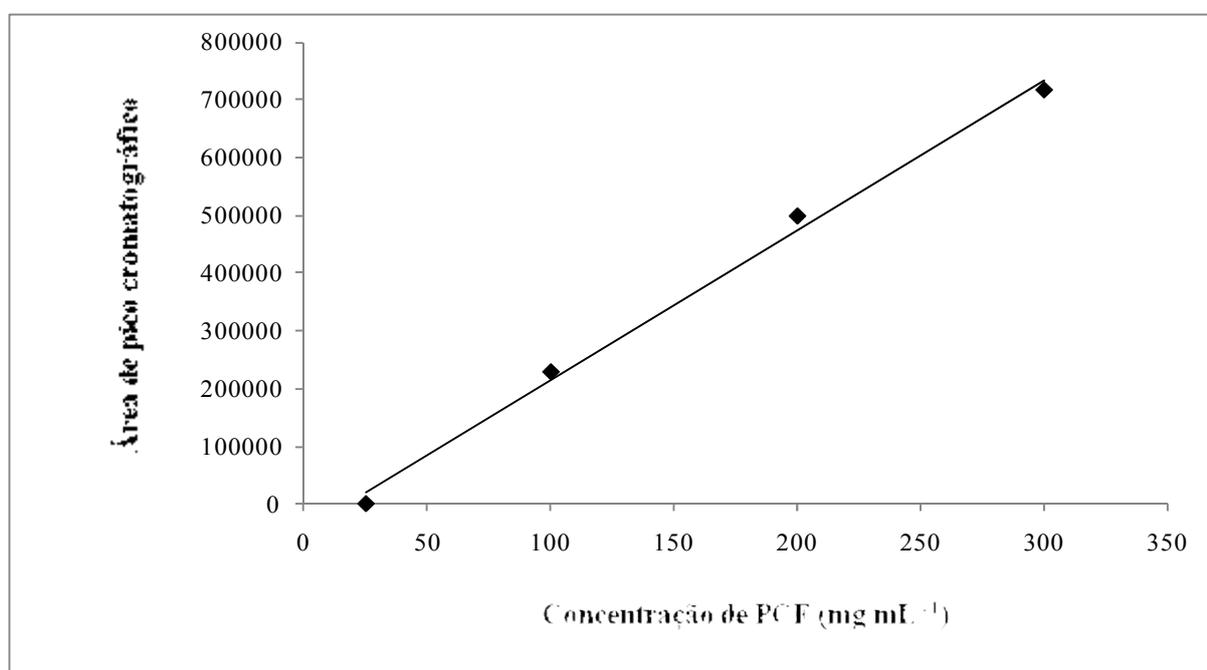


ANEXO 2

Curva padrão de concentrações conhecidas de pentaclorofenol (PCF), utilizada para quantificação do pentaclorofenol (PCF) recuperado nos extratos do solo.

Equação da reta $y = 2598,4x - 45126$

$R^2 = 0,995$



ANEXO 3

Análises de variância e comparação das médias das atividades enzimáticas (UL⁻¹) de *Trametes villosa*, crescida em meio de cultura líquido (BD) sem e com contaminação de PCF (200 mg kg⁻¹)

Delineamento experimental inteiramente casualizado

(Minitab Release 14- 2011)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	4	0, 2, 4, 7
Fungo	Fixo	3	CCIBt 2513, CCIBt 3393, SC
PCF	Fixo	2	Sem, Com

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$).

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS MÉDIAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FENOLOXIDASE, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

Fonte de Variação	GL	SQ	SQ Ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	3	117875	117875	39292	8,17	0,000 ***
Fungo	2	81307	81307	40653	8,45	0,001 **
PCF	1	162445	162445	162445	33,77	0,000 ***
Tempo * Fungo	6	58578	58578	9763	2,03	0,77
Tempo * PCF	3	38070	38070	12690	2,64	0,059 **
Fungo * PCF	2	5553	5553	2776	0,58	0,565
Erro	54	259782	259782	4811		
Total	71	723609				

TESTE TUKEY – COMPARAÇÃO ENTRE TEMPO

Variável	Subtraído de	Diferença entre As médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
0	2	-31,69	23,12	0,5230
	4	25,47	23,12	0,6901
	7	78,83	23,12	0,0066 **
2	4	57,16	23,12	0,0759
	7	110,52	23,12	0,0001 ***
4	7	53,36	23,12	0,1089

TESTE TUKEY – COMPARAÇÃO ENTRE FUNGOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
CCIBt 2513	CCIBt 3393	-42,13	20,02	0,0985
	SC	-82,31	20,02	0,0004 ***
CCIBt 3393	SC	-40,17	20,02	0,1204

TESTE TUKEY – COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTO COM E SEM PCF

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
Com PCF	Sem PCF	95,00	16,35	0,0000 ***

TESTE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 2, 4, e 7 DIAS) POR FUNGO (CCIBt 2513, SC e CCIBt 3393)

Variável (Tempo x Fungo)	Subtraído de (Tempo x Fungo)	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
0 x CCIBt 2513	0 x SC	-29,43	40,04	0,9998
	0 x CCIBt 3393	-70,06	40,04	0,8369
2 x CCIBt 2513	2 x CCIBt 2513	-65,18	40,04	0,8910
	2 x SC	-57,77	40,04	0,9491
	2 x CCIBt 3393	-71,60	40,04	0,8172
4 x CCIBt 2513	4 x CCIBt 2513	19,99	40,04	1,0000
	4 x SC	10,23	40,04	1,0000
	4 x CCIBt 3393	-53,31	40,04	0,9710
7 x CCIBt 2513	7 x CCIBt 2513	151,06	40,04	0,0188 *
	7 x SC	14,32	40,04	1,0000
	7 x CCIBt 3393	-28,39	40,04	0,9999

continuação

0 x CCIBt 3393	0 x SC	-40,63	40,04	0,9967
0 x CCIBt 3393	2 x CCIBt 2513	-35,75	40,04	0,9989
	2 x CCIBt 3393	-28,34	40,04	0,9999
	2 x SC	-42,16	40,04	0,9955
0 x CCIBt 3393	4 x CCIBt 2513	49,43	40,04	0,9835
	4 x CCIBt 3393	39,66	40,04	0,9973
	4 x SC	-23,88	40,04	1,0000
0 x CCIBt 3393	7 x CCIBt 2513	180,49	40,04	0,0020 **
	7 x CCIBt 3393	43,75	40,04	0,9938
	7 x SC	1,04	40,04	1,0000
0 x SC	2 x CCIBt 2513	4,877	40,04	1,0000
	2 x CCIBt 3393	12,285	40,04	1,0000
	2 x SC	-1,536	40,04	1,0000
0 x SC	4 x CCIBt 2513	90,053	40,04	0,5236
	4 x CCIBt 3393	80,292	40,04	0,6881
	4 x SC	16,753	40,04	1,0000
0 x SC	7 x CCIBt 2513	221,121	40,04	0,0001 ***
	7 x CCIBt 3393	84,382	40,04	0,6201
	7 x SC	41,670	40,04	0,9959
0 x CCIBt 2513	2 x CCIBt 3393	7,408	40,04	1,0000
	2 x SC	-6,413	40,04	1,0000
0 x CCIBt 2513	4 x CCIBt 2513	85,177	40,04	0,6066
	4 x CCIBt 3393	75,415	40,04	0,7639
	4 x SC	11,876	40,04	1,0000
0 x CCIBt 2513	7 x CCIBt 2513	216,244	40,04	0,0001 ***
	7 x CCIBt 3393	79,505	40,04	0,70008
	7 x SC	36,793	40,04	0,9986
2 x CCIBt 3393	2 x SC	-13,82	40,04	1,0000
2 x CCIBt 3393	4 x CCIBt 2513	77,77	40,04	0,7282
	4 x CCIBt 3393	68,01	40,04	0,8611
	4 x SC	4,47	40,04	1,0000
2 x CCIBt 3393	7 x CCIBt 2513	208,84	40,04	0,0002 ***
	7 x CCIBt 3393	72,10	40,04	0,8106
	7 x SC	29,39	40,04	0,9998
2 x SC	4 x CCIBt 2513	91,59	40,04	0,4977
	4 x CCIBt 3393	81,83	40,04	0,6629
	4 x SC	18,29	40,04	1,0000
2 x SC	7 x CCIBt 2513	222,66	40,04	0,0001 ***
	7 x CCIBt 3393	85,92	40,04	0,5940
	7 x SC	43,21	40,04	0,9944
4 x CCIBt 2513	4 x CCIBt 3393	-9,76	40,04	1,0000
	4 x SC	-73,30	40,04	0,7942
4 x CCIBt 2513	7 x CCIBt 2513	131,07	40,04	0,0719
	7 x CCIBt 3393	-5,67	40,04	1,0000
4 x CCIBt 3393	4 x SC	-63,54	40,04	0,9064
4 x CCIBt 3393	7 x CCIBt 2513	140,83	40,04	0,0382
	7 x CCIBt 3393	4,09	40,04	1,0000

continuação

	7 x SC	-38,62	40,04	0,9979
4 x SC	7 x CCIBt 2513	204,37	40,04	0,0003 ***
	7 x CCIBt 3393	67,63	40,04	0,8654
	7 x SC	24,92	40,04	1,0000
7 x CCIBt 2513	7 x CCIBt 3393	-136,7	40,04	0,0501
	7 x SC	-179,5	40,04	0,0021 ***
7 x CCIBt 3393	7 x SC	-42,71	40,04	0,9949

ANEXO 4

Análises de variância e comparação das médias das atividades enzimáticas (UL⁻¹) de *Trametes villosa*, crescida em solo contaminado com 200 mg kg⁻¹ de PCF

Delineamento experimental inteiramente casualizado

(Minitab Release 14- 2011)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	Fixo	4	0, 2, 4, 6
Fungo	Fixo	4	CCIBt 2513, CCIBt 2550, SC, CCIBt 3393
PCF	Fixo	2	Sem, Com

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$).

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS MÉDIAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FENOLOXIDASE, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

Fonte de Variação	GL	SQ	SQ Ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	3	71460	71460	23820	13,32	0,000 ***
Fungo	3	41717	41717	13906	7,77	0,000 ***
PCF	1	70839	70839	70839	39,60	0,000 ***
Tempo * Fungo	9	29780	29780	3309	1,85	0,086 *
Fungo * PCF	3	25359	25359	8453	4,73	0,006 **
Erro	44	78701	78701	1789		
Total	63	317855				

TESTE TUKEY – COMPARAÇÃO ENTRE TEMPO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
0	2	30,83	14,95	0,1817
	4	60,89	14,95	0,0011 ***
	6	89,66	14,95	0,000 ***
2	4	29,86	14,95	0,2046
	6	58,83	14,95	0,0016 ***
4	6	28,97	14,95	0,2277

TESTE TUKEY – COMPARAÇÃO ENTRE FUNGOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
CCIBt 2513	CCIBt 2550	-13,46	14,95	0,8049
	CCIBt 3393	49,20	14,95	0,0103*
	SC	-12,07	14,95	0,850
CCIBt 2550	CCIBt 3393	62,655	14,95	0,0007 ***
	SC	1,383	14,95	0,9997
CCIBt 3393	SC	-61,27	14,95	0,0010 ***

TESTE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 2, 4, e 6 DIAS) POR FUNGO (CCIBt 2513, CCIBt 3393 e SC)

Variável (Tempo x Fungo)	Subtraído de (Tempo x Fungo)	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
0 x CCIBt 2513	0 x CCIBt 2550	-0,0000	29,91	1,0000
	0 x CCIBt 3393	-0,0000	29,91	1,0000
	0 x SC	-0,0000	29,91	1,0000
0 x CCIBt 2513	2 x CCIBt 2513	14,330	29,91	1,0000
	2 x CCIBt 2550	13,103	29,91	1,0000
	2 x CCIBt 3393	61,764	29,91	0,7758
	2 x SC	34,123	29,91	0,9984
0 x CCIBt 2513	4 x CCIBt 2513	53,477	29,91	0,9076
	4 x CCIBt 2550	41,091	29,91	0,9895
	4 x CCIBt 3393	110,541	29,91	0,0422 **
	4 x SC	37,665	29,91	0,9955
0 x CCIBt 2513	6 x CCIBt 2513	89,706	29,91	0,2108
	6 x CCIBt 2550	49,495	29,91	0,9476
	6 x CCIBt 3393	182,005	29,91	0,0001 ***
	6 x SC	37,435	29,91	0,9958

continuação				
2 x CCIBt 2513	2 x CCIBt 2550	-1,227	29,91	1,0000
	2 x CCIBt 3393	47,434	29,91	0,9627
	2 x SC	19,793	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2513	4 x CCIBt 2513	39,147	29,91	0,9934
	4 x CCIBt 2550	26,761	29,91	0,9999
	4 x CCIBt 3393	96,211	29,91	0,1337
	4 x SC	23,335	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2513	6 x CCIBt 2513	75,376	29,91	0,4759
	6 x CCIBt 2550	35,165	29,91	0,9978
	6 x CCIBt 3393	167,675	29,91	0,0002 ***
	6 x SC	23,104	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2550	2 x CCIBt 3393	48,66	29,91	0,9541
	2 x SC	21,02	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2550	4 x CCIBt 2513	40,37	29,91	0,9911
	4 x CCIBt 2550	27,99	29,91	0,9998
	4 x CCIBt 3393	97,44	29,91	0,1220
	4 x SC	24,56	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2550	6 x CCIBt 2513	76,60	29,91	0,4990
	6 x CCIBt 2550	36,39	29,91	0,9969
	6 x CCIBt 3393	168,90	29,91	0,0002 ***
	6 x SC	24,33	29,91	1,0000
2 x CCIBt 3393	2 x SC	-27,64	29,91	0,9999
2 x CCIBt 3393	4 x CCIBt 2513	-8,29	29,91	1,0000
	4 x CCIBt 2550	-20,67	29,91	1,0000
	4 x CCIBt 3393	48,78	29,91	0,9533
	4 x SC	-24,10	29,91	1,0000
2 x CCIBt 3393	6 x CCIBt 2513	27,94	29,91	0,9998
	6 x CCIBt 2550	-12,27	29,91	1,0000
	6 x CCIBt 3393	120,24	29,91	0,0176 ***
	6 x SC	-24,33	29,91	1,0000
2 x SC	4 x CCIBt 2513	19,353	29,91	1,0000
	4 x CCIBt 2550	6,968	29,91	1,0000
	4 x CCIBt 3393	76,418	29,91	0,4530
	4 x SC	3,542	29,91	1,0000
2 x SC	6 x CCIBt 2513	55,583	29,91	0,8802
	6 x CCIBt 2550	15,372	29,91	1,0000
	6 x CCIBt 3393	147,882	29,91	0,0011 ***
	6 x SC	3,310	29,91	1,0000
4 x CCIBt 3393	4 x CCIBt 2550	-12,39	29,91	1,0000
	4 x CCIBt 3393	57,06	29,91	0,8583
	4 x SC	-15,81	29,91	1,0000
4 x CCIBt 3393	6 x CCIBt 2513	36,23	29,91	0,9970
	6 x CCIBt 2550	-3,98	29,91	1,0000
	6 x CCIBt 3393	128,53	29,91	0,0080 ***
	6 x SC	-16,04	29,91	1,0000
4 x CCIBt 3393	CCIBt 3393	69,450	29,91	0,6105
	SC	-3,426	29,91	1,0000
	CCIBt 3393	140,914	29,91	0,0023 ***

	SC	-3,658	29,91	1,0000
4 x CCIBt 3393	SC	-72,88	29,91	0,5322
4 x CCIBt 3393	6 x CCIBt 2513	-20,83	29,91	1,0000
	6 x CCIBt 2550	61,05	29,91	0,7896
	6 x CCIBt 3393	71,46	29,91	0,5644
	6 x SC	-73,11	29,91	0,5269
4 x SC	6 x CCIBt 2513	52,041	29,91	0,9238
	6 x CCIBt 2550	11,830	29,91	1,0000
	6 x CCIBt 3393	144,340	29,91	0,0016 ***
	6x SC	-0,231	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2513	6 x CCIBt 2550	-40,21	29,91	0,9915
	6 x CCIBt 3393	92,30	29,91	0,1768
	6 x SC	-52,27	29,91	0,9213
2 x CCIBt 2550	6 x CCIBt3393	132,51	29,91	0,0054 ***
	6 x SC	-12,06	29,91	1,0000
2 x CCIBt 2513	6 x SC	-144,6	29,91	0,0016***

TESTE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCIBt 2513, CCIBt 2550, SC e CCIBt 3393) E COM E SEM CONTAMINAÇÃO DE PCF

Variável (Fungo x PCF)	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mín. significativa	Valor-P
CCIBt 2513 x Sem	CCIBt 2513 x Com PCF	48,57	21,15	0,3183
CCIBt 2513 x Sem	CCIBt 2550 x Sem PCF	-7,87	21,15	0,9999
	CCIBt 2550 x Com PCF	29,53	21,15	0,8540
CCIBt 2513 x Sem	CCIBt 3393 x Sem PCF	5,91	21,15	1,0000
	CCIBt 3393 x Com PCF	141,05	21,15	0,0000 ***
CCIBt 2513 x Sem	SC x Sem PCF	-10,31	21,15	0,9997
	SC x Com PCF	34,74	21,15	0,7224
CCIBt 2513 x Com	CCIBt 2550 x Sem PCF	-56,44	21,15	0,1597
	CCIBt 2550 x Com PCF	-19,04	21,15	0,9845
CCIBt 2513 x Com	CCIBt 3393 x Sem PCF	-42,65	21,15	0,4826
	CCIBt 3393 x Com PCF	92,48	21,15	0,0018 ***
CCIBt 2513 x Com	SC x Sem PCF	-58,88	21,15	0,1253
	Sc x Com PCF	-13,83	21,15	0,9978
CCIBt 2550 x Sem	CCIBt 2550 x Com PCF	37,399	21,15	0,6437
CCIBt 2550 x Sem	CCIBt 3393 x Sem PCF	13,786	21,15	0,9978
	CCIBt 3393 x Com PCF	148,924	21,15	0,0000 ***
CCIBt 2550 x Sem	SC x Sem PCF	-2,442	21,15	1,0000
	SC x Com PCF	42,608	21,15	0,4840
CCIBt 2550 x Com	CCIBt 3393 x Sem PCF	-23,61	21,15	0,9497
	CCIBt 3393 x Com PCF	111,53	21,15	0,0000 ***
CCIBt 2550 x Com	SC x Sem PCF	-39,84	21,15	0,5686
	SC x Com PCF	5,21	21,15	1,0000
CCIBt 3393 x Sem	Com PCF	135,14	21,15	0,0000 ***

CCIBt 3393 x Sem	SC x Sem PCF	-16,23	21,15	0,9940
	SC x Com PCF	28,82	21,15	0,8687
CCIBt 3393 x Com	SC x Sem PCF	-151,4	21,15	0,0000 ***
	SC x Com PCF	-106,3	21,15	0,0002 ***
SC x Sem	SC x Com PCF	45,05	21,15	0,4124