

Microbiologia Ambiental



Editores Técnicos

**ITAMAR SOARES DE MELO
JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Meio Ambiente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Microbiologia Ambiental

Segunda Edição Revista e Ampliada

Editores Técnicos

**ITAMAR SOARES DE MELO
JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**



Meio Ambiente

MICROBIOLOGIA AMBIENTAL.

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

2^a edição revista e ampliada

Editores Técnicos

*Itamar Soares de Melo
João Lúcio de Azevedo*

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

*Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 - 13820-000 Jaguariúna, SP
Fone: 19-3867-8750 Fax: 19-3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br / www.cnpma.embrapa.br*

Comitê de Publicações:

Alfredo José Barreto Luiz; Heloisa Ferreira Filizola; Sandro Freitas Nunes; Maria Amélia de Toledo Leme; Ladislau Araújo Skorupa; Ariovaldo Luchiari Júnior; Luiz Antonio S. Melo

Normalização bibliográfica

Maria Amélia de Toledo Leme

Projeto gráfico/ Editoração eletrônica

Claudete Rodrigues Pereira

Capa

Itamar Soares de Melo

2^a edição

1^a impressão (2008): 1000 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n.^o 9610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo deste livro desde que citada a fonte.

CIP. Brasil. Catalogação na publicação.

Melo, Itamar Soares de

Microbiologia ambiental / editado por Itamar Soares de Melo e João Lúcio de Azevedo. -- 2^a. ed. rev. ampl. -- Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

647p.

ISBN 978-85-85771-44-7

I. Microbiologia ambiental. I. Azevedo, J.L. de. II. Título.

CDD 579

Agradecimentos

As seguintes pessoas estão entre aquelas que gentilmente dedicaram-se com empenho para revisão dos originais, trazendo contribuições substâncias para a qualidade dessa obra:

Luis Alexandre Sereda
Maria Amélia de Toledo Leme
Nilce Chaves Gattaz
Maria Cristina Tordin
Luciana Frias Reyes
Pietro Agostini
André Luís Braghini Sá
Armando Cavalcante Franco Dias
Claudete Pereira
Rosely dos Santos Nascimento
Deise Fontana Capalbo

Prefácio

A Microbiologia Ambiental é hoje uma ciência que combina a aplicação dos princípios químicos, biológicos e biotecnológicos, voltada para o maior desafio do ser humano - a manutenção da qualidade ambiental. Entretanto, tecnologias baseadas na manipulação de comunidades microbianas ainda carecem de uma base sólida de conhecimentos sobre ecologia de microrganismos. No Brasil, com problemas ambientais diversos, a microbiologia ambiental ainda está em expansão e necessita de maior integração entre geneticistas, ecologistas, químicos e biotecnologistas, com vistas à resolução dos emergentes problemas de qualidade ambiental dos ecossistemas.

As pesquisas sobre interações microbianas têm possibilitado grandes conquistas nas áreas da microbiologia aplicada. No entanto, mesmo havendo grandes progressos nas áreas de genética e fisiologia pouco ainda se sabe sobre os processos em comunidades microbianas, como também é pouco conhecida a imensidão da diversidade microbiana em diferentes habitats. A versatilidade bioquímica de microrganismos vivendo em habitats extremos apresenta uma enorme variedade de genes que são ainda desconhecidos, os quais poderão representar importantes contribuições quanto à aplicação, particularmente para biorremediação ambiental e utilização biotecnológica. Nesse sentido, são numerosos os processos biotecnológicos que utilizam microrganismos para obtenção de produtos de valor comercial, como no controle biológico de pragas agrícolas, na fixação biológica do nitrogênio atmosférico, na produção de bebidas, fármacos, antibióticos, biossurfactantes, corantes, etanol, ácidos orgânicos e muitos outros.

A Microbiologia Ambiental, definida como o estudo dos efeitos aplicados de microrganismos no ambiente e nas atividades humanas é o grande propósito desse livro-texto, que abrange assuntos de importância atual e futura em áreas emergentes da biotecnologia ambiental.

Esta segunda edição ampliada da publicação inicial “Microbiologia Ambiental” incorpora capítulos de interesse em microbiologia ambiental e ecologia microbiana, voltados para servir como referência aos cursos de graduação e pós-graduação do país. Focaliza, entre outras abordagens, o problema de contaminação ambiental, principalmente a contaminação por xenobióticos, plásticos, petróleo, tintas, corantes, metais pesados como também trata da biodeterioração de monumentos históricos e estruturas de concreto. Merecem destaque também, os capítulos sobre Biofilmes, Biossurfactantes, Rizorremediação, Biocatálise, Microbiologia Marinha, Fitorremediação, de Monoterpenos, Biodegradação Anaeróbica, de PCBs, de Cafeína, Mudanças Climáticas Globais, entre outros. Todos esses temas são apresentados por renomados profissionais, que não mediram esforços para suprir lacunas importantes de informações em nossa língua nesta fascinante área do conhecimento.

Sumário

1	Impacto de mudanças climáticas globais sobre a microbiota terrestre <i>Raquel Ghini</i>	1
2	Impacto de xenobióticos e metais pesados na microbiota do solo <i>Célia Maria Maganhotto de Souza Silva e Rosana Faria Vieira</i>	17
3	Microrganismos, minerais e metais <i>Oswaldo Garcia Jr. e Denise Bevilaqua</i>	49
4	Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável <i>Raquel Silva Peixoto, Alexandre Soares Rosado e Rodrigo Gouvêa Taketani</i>	83
5	Técnicas moleculares aplicadas aos estudos de ecologia microbiana: A PCR em tempo real <i>Paulo Teixeira Lacava e João Lúcio de Azevedo</i>	107
6	Biofilmes microbianos <i>René P. Schneider</i>	125
7	Biosurfactantes <i>Fátima Menezes Bento, Flávio A. de Oliveira Camargo e Christine Claire Gaylarde</i>	151
8	Importância ambiental da biocatálise <i>Viridiana Santana Ferreira-Leitão, Maria Antonieta Ferrara e Elba P. S. Bon</i>	185
9	Estratégias de isolamento de microrganismos envolvidos na degradação de xenobióticos <i>Itamar Soares de Melo e João Lúcio de Azevedo</i>	199
10	Biodegradação anaeróbia <i>Rosana Filomena Vazoller, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic e Juliana Calábria Araújo</i>	217
11	Biodegradação de compostos aromáticos <i>Aneli de Melo Barbosa, Ellen Cristine Giese e Luiz Gustavo Covizzi</i>	261

12	Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos <i>Vera Lúcia Ramos Bononi, Kátia Maria Gomes Machado, Dácio Roberto Matheus e Vera Maria Vitali</i>	281
13	Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos: atualização <i>Nelson Durán e Elisa Esposito</i>	303
14	Biodegradação de corantes têxteis <i>Priscila Maria Dellamatrice, Regina Teresa Rosim Monteiro e Doralice de Souza Luro Balan</i>	321
15	Biodegradação de superfícies pintadas <i>Denise de Souza Saad</i>	339
16	Biodegradação de polímeros sintéticos <i>Sandra Mara Martins Franchetti, José Carlos Marconato e Adriana de Campos</i>	351
17	Biodegradação de fungicidas <i>Célia Maria Maganhotto de Souza Silva, Elisabeth Francisconi Fay e Rosângela Blotta Abakerli</i>	377
18	Biodegradação de monoterpenos <i>Lucia Regina Durrant</i>	419
19	Degradação de cafeína por bactérias <i>Paulo Mazzafera e Dirce Mithico Yamaoka-Yano</i>	449
20	Degradação abiótica de xenobióticos <i>Elisabeth Francisconi Fay, Célia Maria Maganhotto de Souza Silva e Itamar Soares de Melo</i>	463
21	Biodeterioração no ambiente construído <i>Márcia A. Shirakawa, Vanderley M. John e Maria Alba Cincotto</i>	477
22	Biodeterioração de monumentos históricos <i>Maria Aparecida de Resende</i>	501

23	Monitoramento químico de áreas contaminadas: tecnologias de campo <i>René P. Schneider</i>	521
24	Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados <i>Paulo Negrais Seabra</i>	547
25	Fitorremediação de metais <i>Marcia Pletsch, Andrea C. A. Barros e Brancilene S. de Araujo</i>	571
26	Importância da rizosfera na biodegradação de xenobióticos <i>Itamar Soares de Melo</i>	589
27	Microbiologia aquática marinha <i>Irma Nelly G. Rivera, Claudete Rodrigues Paula e Claudiana Paula de Souza</i>	609
28	Transferência horizontal de genes de plantas geneticamente modificadas: avaliação dos riscos para as comunidades microbianas <i>Wellington Luiz Araújo, Priscilla de Barros Rossetto e Júlia Kuklinsky-Sobral</i>	629
	Índice Remissivo	641-645
	Índice Autores	647

I. Introdução

As atividades antrópicas estão alterando as concentrações de gases de efeito estufa na atmosfera, causando mudanças no clima do planeta. O efeito estufa é um processo natural que permite a manutenção da temperatura necessária para o estabelecimento e sustento da vida na Terra. O vapor de água, o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4), o óxido nitroso (N_2O), o ozônio (O_3) e outros gases presentes na atmosfera, denominados gases de efeito estufa, retêm parcialmente a radiação térmica que é emitida quando a radiação solar atinge a superfície do planeta. As atividades antrópicas, intensificadas após a Revolução Industrial, no final do século XVIII, caracterizam-se pela emissão de gases na atmosfera devido ao uso dos recursos naturais, como a queima de combustíveis fósseis e o desmatamento. Como consequência, há uma maior retenção de radiação que resulta na intensificação do efeito estufa, elevando a temperatura média da superfície do planeta, além de outros efeitos. Durante o século XX, houve um aumento significativo na temperatura média da superfície do planeta e maiores incrementos estão previstos para o próximo século (IPCC, 2001). Recentemente, o fenômeno tem se acelerado, pois as maiores temperaturas médias anuais foram registradas nos últimos anos.

A mudança climática tem se manifestado de diversas formas, dentre as quais se destaca o “aquecimento global”, termo usado para identificar o fenômeno. Porém, também está sendo observada maior freqüência e intensidade de eventos climáticos extremos, alterações na precipitação, perturbações nas correntes marítimas, retração de geleiras e elevação do nível dos oceanos. O termo “mudança ambiental global” envolve uma ampla gama de eventos, incluindo o aumento da concentração de CO_2 atmosférico, de ozônio na troposfera (da superfície do planeta até 10km de altura) e outros impactos (STADDON *et al.*, 2002). Os termos “mudança biosférica” ou “mudança global” foram também sugeridos porque envolvem o conceito de que interações complexas estão ocorrendo entre o ambiente físico e o biológico (COAKLEY, 1995). As alterações de um afetam o outro e podem resultar em efeitos aditivos ou sinergísticos no ambiente. A mudança climática pode afetar de diferentes formas um grupo de organismos, este grupo afeta outros e o conjunto de mudanças pode voltar a causar efeitos no ambiente físico.

A idéia de que a ação do homem pode modificar os processos fundamentais do planeta é relativamente nova, pois se pensava que o poder tampão dos sistemas naturais seria suficiente para eliminar esses efeitos. Agora, entretanto, sabe-se que o balanço dos sistemas naturais é, em muitos casos, extremamente delicado (ATKINSON, 1993). Alguns podem ser especialmente vulneráveis às mudanças climáticas em função da capacidade limitada de adaptação, podendo sofrer danos significativos e irreversíveis. Quanto à biodiversidade, espécies já ameaçadas terão um risco maior de extinção em função do sinergismo de pressões adversas, podendo

acarretar em graves impactos em atividades sócioeconômicas em função da alteração de serviços ambientais, como a polinização e controle natural de pragas e pestes, dentre outras (CANHOS, 2005).

A preocupação com o estudo do impacto das mudanças globais na microbiota terrestre é recente, porém o assunto vem despertando crescente interesse da comunidade científica devido à importância do tema. Os microrganismos estão entre os primeiros organismos a demonstrar os efeitos das alterações climáticas devido às numerosas populações, facilidade de multiplicação e dispersão, além do curto tempo entre gerações. Dessa forma, constituem um grupo fundamental de indicadores biológicos para o estudo dos impactos das mudanças climáticas globais.

2. Mudanças climáticas

O clima do planeta é regulado pelo fluxo de energia solar que atravessa a atmosfera na forma de radiação de ondas curtas. Parte dessa energia é devolvida pela Terra na forma de radiação infravermelha. Os gases de efeito estufa são definidos como os constituintes gasosos da atmosfera que absorvem e reemitem radiação infravermelha. A história da Terra é marcada por ciclos naturais de aquecimento e resfriamento. As atividades vulcânicas e solares são responsáveis por intensas mudanças no clima de tempos em tempos. Imensas quantidades de materiais lançados na atmosfera pelos vulcões intensificaram o efeito estufa natural. Essas alterações ocorreram em períodos de milhões de anos.

Entretanto, desde a década de 1980, evidências científicas sobre mudanças acentuadas no clima vêm despertando a atenção da sociedade (MARENGO & SOARES, 2003). O termo “mudanças climáticas globais” foi cunhado durante a Convenção Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças do Clima, aprovada em 1992, e é definida como “mudança que possa ser direta ou indiretamente atribuída à atividade humana, que altere a composição da atmosfera mundial e que se some àquela provocada pela variabilidade climática natural observada ao longo de períodos comparáveis”.

As geleiras da Antártica fornecem um importante arquivo de informações sobre o clima e a composição de gases do planeta durante os últimos 650 mil anos. Os dados obtidos a partir de amostras de bolhas de ar capturadas pelo gelo polar e retiradas em diferentes profundidades das geleiras demonstram uma alta correlação entre mudanças de temperatura do planeta e a concentração de gases de efeito estufa na atmosfera. A concentração de CO₂ não excedeu 300 ppm em volume durante esse período (SIEGENTHALER *et al.*, 2005). Por volta de 1750, iniciou-se a Revolução Industrial, marcada por um grande salto tecnológico especialmente nos setores de transportes e máquinas. Os métodos de produção se tornaram mais eficientes e a exploração dos recursos naturais pelo homem tomou proporções jamais conhecidas. Concomitantemente, os problemas de degradação ambiental pela ação antrópica assumiram grande importância. Gases de efeito estufa, dentre os quais alguns que não existiam na atmosfera (clorofluorcarbonos - CFC, hidrofluorcarbonos - HFC, hidrofluorclorocarbonos - HCFC, perfluorcarbonos - PFC e hexafluoreto de

enxofre - SF₆, por exemplo), sofreram acentuado aumento na concentração devido à ação antrópica, dificultando a eficiência com que a Terra se resfria. Outros gases, como o monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x) e outros compostos orgânicos voláteis não metânicos (NMVOC), mesmo não sendo gases de efeito estufa direto, possuem influência nas reações químicas que ocorrem na atmosfera.

Desde os primórdios da Revolução Industrial, a concentração atmosférica de CO₂ aumentou 31% e mais da metade desse crescimento ocorreu nos últimos cinqüenta anos. Desde 1760 até 1960, os níveis de concentração de CO₂ atmosférico aumentaram de 277 ppm para 317 ppm, isto é, 40 ppm em 200 anos. Nas últimas quatro décadas, de 1960 até 2001, as concentrações de CO₂ aumentaram de 317 ppm para 371 ppm, um acréscimo de 54 ppm. Este aumento nas décadas recentes corresponde ao aumento no uso de combustível fóssil durante esse período (MARENGO & SOARES, 2003).

A concentração de CH₄ aumentou de 700ppt na era pré-industrial para 1745ppt; o N₂O, de 270 para 314ppt e os CFCs, que não existiam na atmosfera, atingiram 533ppt. As projeções são para que o CO₂ atinja 540 a 970 ppm, por volta de 2100, representando um aumento de 75 a 350% em relação ao período antes da Revolução Industrial (IPCC, 2001).

Os gases de efeito estufa são fundamentais para manter as condições ambientais adequadas para a existência da vida no planeta. Nessas condições, as temperaturas permitem a existência de água tanto na forma líquida quanto na gasosa, para a manutenção do ciclo hidrológico e da vida. Sem o efeito estufa, a temperatura média da superfície do planeta seria de, aproximadamente, -18°C. Estima-se que o aumento da temperatura é de 33°C, graças à retenção de calor pelos gases, proporcionando um valor médio de 15°C. Porém, com o aumento do efeito estufa, no último século, a temperatura média da superfície do planeta aumentou 0,6°C + 0,2°C e as projeções para o próximo século são de um aquecimento no entre 1,4 a 5,8°C (IPCC, 2001).

Como consequência, a cobertura de neve e gelo diminuiu, aproximadamente, 10% desde 1960 e o nível médio do mar aumentou, assim como o teor calórico dos oceanos. Houve uma redução na freqüência de temperaturas mínimas extremas, enquanto aumentou a freqüência de temperaturas máximas extremas. As precipitações aumentaram nas médias e altas latitudes do Hemisfério Norte e diminuíram na região subtropical.

A destruição da camada de ozônio na estratosfera pela ação antrópica tem resultado no aumento da radiação ultravioleta-B (UV-B; 280 a 320 nm) que atinge a superfície do planeta. Essa camada é de extrema importância para a vida e tal dano, conhecido como “buraco na camada de ozônio”, pode apresentar sérias consequências para o planeta. Apesar das medidas adotadas pelos diversos países que assinaram o Protocolo de Montreal, com a finalidade de reduzir a emissão de gases que destroem a camada de ozônio estratosférico, algumas décadas são necessárias para que se atinjam os níveis encontrados antes de 1980 (PAUL, 2000).

Há grandes incertezas sobre os cenários de mudanças climáticas para os próximos séculos, principalmente por que há incertezas quanto aos cenários futuros de emissões de gases de efeito estufa. Além disso, é questionável a efetividade dos

modelos globais utilizados como ferramentas para estimar alterações climáticas resultantes do aquecimento global, além da dificuldade desses modelos em caracterizar o clima regional (MARIENGO & SOARES, 2003). Porém, o aumento da concentração de gases de efeito estufa e as mudanças climáticas previstas para os próximos anos certamente causarão sérios impactos nos seres vivos do planeta.

Nas discussões sobre mudanças climáticas, os termos “vulnerabilidade”, “impactos” e “adaptação” possuem conotações particulares. Vulnerabilidade refere-se ao nível de reação de um determinado sistema para uma mudança climática específica. Impactos referem-se às consequências da mudança climática nos sistemas naturais e humanos. Adaptação descreve ajustes em sistemas ecológicos ou socioeconômicos em resposta às mudanças climáticas correntes ou projetadas, resultantes de práticas, processos, medidas ou mudanças estruturais (Mudanças do clima, 2005).

3. Microrganismos do solo

O solo é um *habitat* microbiano por excelência, onde há inúmeras comunidades de microrganismos e, como consequência, constitui o principal reservatório de diversidade desse grupo. Apesar de não se conhecer a identidade da grande maioria de espécies que habita o solo, sabe-se que grupos funcionais de microrganismos regulam processos vitais nos ecossistemas. A presença desses é diretamente afetada pelas condições edafoclimáticas impostas nos diversos microssítios, como a presença de partículas de matéria orgânica, raízes, facilidade de trocas gasosas e outros (CARDOSO, 1992).

As mudanças climáticas podem alterar o equilíbrio químico, físico e biológico dos solos. Grupos funcionais de microrganismos podem ser alterados, o que resultará em mudanças nos processos dos ecossistemas. Entretanto, os efeitos indiretos serão de grande importância haja vista que a íntima relação entre a vegetação e a microbiota do solo faz com que qualquer interferência causada pelas mudanças climáticas nesses grupos resulte em significativas consequências para o funcionamento do ecossistema. A complexidade das numerosas interações entre os vários fatores ambientais que controlam as relações entre plantas e microrganismos do solo ainda não foi adequadamente elucidada. Como resultado dessa complexidade, as mudanças globais podem levar a alterações não lineares, que podem variar quanto à intensidade em diferentes regiões.

A tolerância de um sistema a uma mudança depende do grau de continuidade da característica biológica entre as espécies que desempenham a função afetada. Alterações em espécies com características que são amplamente distribuídas na comunidade terão pequeno significado, pois espécies mais tolerantes à nova condição podem compensar as que foram afetadas. Dentre os microrganismos decompositores, por exemplo, são encontradas inúmeras espécies. Por outro lado, mudanças que afetam espécies com características singulares não podem ser compensadas por outras espécies. Os microrganismos fixadores de N que desempenham relação de mutualismo com plantas, geralmente, possuem uma associação estreita e altamente específica. Alterações na ocorrência desses microrganismos podem comprometer a disponibilidade do nutriente para as plantas (WOLTERS *et al.*, 2000).

Por outro lado, mudanças na estrutura da comunidade de plantas podem afetar a disponibilidade de fontes de alimento para a microbiota do solo. Isto por que as espécies de plantas diferem quanto a características como taxa de crescimento e eficiência no uso da água e de nutrientes, que podem afetar as propriedades físico-químicas do solo, acúmulo de matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes. A elevação da temperatura e as alterações na precipitação certamente trarão sérias consequências para a vegetação, o que deve resultar em distúrbios na microbiota do solo.

A rizosfera afeta intensamente a atividade da microbiota por possuir características diferentes das do solo distante das raízes. Longe das raízes, os microrganismos dependem da incorporação de matéria orgânica como fonte de energia para seu desenvolvimento. Na rizosfera há maior concentração de nutrientes orgânicos oriundos das raízes, que propiciam o desenvolvimento da microbiota. A planta exerce tal influência devido à liberação de células mortas, mucilagens, exsudatos e outros compostos liberados pelas raízes. Assim, alterações na planta, como, por exemplo, no metabolismo de nutrientes, surtem efeito direto na microbiota da rizosfera, como estímulo ou inibição de microrganismos promotores de crescimento ou fitopatógenos.

O aumento previsto da relação C:N das plantas pode ter importantes reflexos contrários na taxa de decomposição da matéria orgânica e, assim, afetar o suprimento de nutrientes disponíveis para as plantas. Entretanto, as expectativas são de que a reciclagem de nutrientes seja acelerada, que haja maior fixação biológica do nitrogênio do ar, maior acidificação dos solos e maior perda de nitrogênio por escorramento superficial (SIQUEIRA, 2001).

Outro aspecto importante das mudanças climáticas diz respeito à alteração nas interações entre espécies devido à diferente taxa de migração entre plantas, micorrizas, fixadores de N e invertebrados com baixa capacidade de locomoção. Com a mudança no clima, as espécies tendem a reduzir a freqüência de ocorrência onde as condições não são mais favoráveis e essa modificação na distribuição geográfica pode alterar as relações entre as espécies.

A microbiota do solo também pode ser diretamente afetada pelas condições climáticas. Flutuações na umidade do solo podem refletir negativamente sobre grupos de microrganismos, como por exemplo, os decompõtores (TAYLOR *et al.*, 2004). A produção de importantes enzimas por diferentes linhagens de fungos depende da ocorrência de temperaturas ótimas. A capacidade de competição dessas linhagens é seriamente afetada com o aumento da temperatura. A elevação da temperatura pode aumentar a taxa de decomposição da matéria orgânica. Cerri *et al.*, (2005), usando modelos de simulação, concluíram que as mudanças climáticas podem alterar a dinâmica da matéria orgânica do solo cultivado com pastagens na região amazônica. O estoque de C do solo nos cenários futuros será reduzido devido ao aumento da temperatura.

Muitos efeitos podem ser transitórios e diferentes entre os sistemas, especialmente nas próximas décadas. Pequenas mudanças na microbiota serão retardadas pelo efeito tampão dos sistemas. As alterações no funcionamento de ecossistemas devem ser maiores em sistemas que possuem comunidades enfraquecidas devido à distribuição descontínua de fatores que controlam as relações entre os organismos (WOLTERS *et al.*, 2000).

A concentração de CO₂ no ar do solo possui uma ordem de grandeza muitas vezes superior à da atmosfera. Os valores podem atingir até 4% de CO₂ no solo a 10cm de profundidade, o que representa valores até 100 vezes superiores aos da atmosfera (BUENO & SOUZA, 2002). Por esse motivo, o aumento da concentração de CO₂ atmosférico deve ter poucos efeitos diretos sobre a microbiota do solo. Porém, os efeitos indiretos do aumento da concentração de CO₂ na microbiota do solo provavelmente serão mais significativos, como por exemplo, devido às alterações no crescimento de raízes.

A elevação dos teores de CO₂ promove alterações no metabolismo, crescimento e processos fisiológicos da planta. Há aumento da taxa fotossintética, a taxa de transpiração por unidade foliar decresce, enquanto a transpiração total da planta algumas vezes é aumentada, devido à maior área foliar (JWA & WALLING, 2001; LI *et al.*, 2003). Os efeitos são evidentes especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento da planta (SIONIT *et al.*, 1982). As alterações também incluem maior eficiência do uso da água, devido à menor abertura estomatal e do nitrogênio pela planta (THOMPSON & DRAKE, 1994). Como consequência, a maior interceptação da radiação solar pelo maior dossel pode reduzir a temperatura e alterar a umidade do solo. O aumento da massa vegetal pode afetar de diversas formas os microrganismos do solo, assim como a composição da matéria orgânica originária das plantas no novo ambiente.

Tais estudos possuem grandes dificuldades metodológicas. A grande maioria de bactérias do solo, por exemplo, que constituem um dos principais grupos, não pode ser cultivada ou observada microscopicamente. O método de estudo altera os resultados e as conclusões obtidas. Com o objetivo de verificar os efeitos do aumento de CO₂ atmosférico na comunidade de bactérias do solo, Bruce *et al.*, (2000) utilizaram métodos moleculares de avaliação em ambiente controlado enriquecido com 200 ppm de CO₂. Porém, não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

Além das variáveis climáticas já discutidas, o aumento da radiação UV-B representa importantes consequências para a microbiota terrestre. A exposição direta de esporos de fungos ao UV-B pode danificar o DNA, as estruturas, as fases iniciais de desenvolvimento e reprodução dos microrganismos, mas doses letais são superiores às registradas na superfície do planeta. Há uma quantidade relativamente grande de trabalhos realizados *in vitro* sobre os efeitos do UV-B na germinação de esporos, crescimento de hifas e esporulação de fungos. O efeito da luz próxima ao ultravioleta ("near-ultraviolet light", NUV, UV-A, 320 a 400 nm) na indução à esporulação é conhecido para uma ampla gama de fungos. O aumento da radiação UV poderia significar um aumento na indução à esporulação. Entretanto, a quantidade dessa radiação atualmente já é suficiente para estimular os fungos dependentes de luz, e aumentos nessa radiação podem não ter importância do ponto de vista epidemiológico (MANNING & TIEDEMANN, 1995).

Como a radiação UV-B consegue penetrar somente na profundidade de 100 µm no horizonte do solo, enganosamente se considera que a comunidade microbiana do solo não será afetada pela destruição da camada de ozônio do planeta. Porém, o aumento da UV-B pode alterar a estrutura de comunidades, a biomassa e a atividade de microrganismos terrestres. Uma revisão sobre o assunto foi publicada por Johnson (2003).

4. Microrganismos relacionados às plantas

4.1 Microrganismos fitopatogênicos

O ambiente pode influenciar o crescimento e a suscetibilidade da planta hospedeira, a multiplicação, a sobrevivência e as atividades do patógeno, assim como a interação entre a planta hospedeira e o patógeno. Por esse motivo, as mudanças climáticas globais constituem uma séria ameaça especialmente à agricultura, pois podem promover significativas alterações na ocorrência e severidade de doenças de plantas. Tais alterações podem representar graves consequências econômicas, sociais e ambientais. A análise desses efeitos é fundamental para a adoção de medidas mitigadoras, com a finalidade de evitar prejuízos futuros (CHAKRABORTY & PANGA, 2004; GHINI, 2005).

O clássico triângulo de doença ilustra um dos paradigmas da Fitopatologia, que estabelece as condições para o desenvolvimento de doenças, isto é, a interação entre o hospedeiro suscetível, o patógeno virulento e o ambiente favorável (Figura 1). Consequentemente, a doença não ocorre se houver eliminação de um dos componentes. Outro aspecto a ser considerado é que a alteração de um determinado fator climático pode ter efeitos positivos, em uma das partes do triângulo da doença, e negativos, em outra. Além disso, os efeitos podem ser também contrários nas diversas fases do ciclo de vida do patógeno (COAKLEY, 1995). Assim sendo, somente a análise completa do sistema pode definir se a doença será estimulada ou não.

O ambiente influencia todos os estádios de desenvolvimento, tanto do patógeno quanto da planta hospedeira, assim como da doença, nas diversas etapas do ciclo das relações patógeno-hospedeiro. Além desses, também pode afetar outros organismos com os quais a planta e o patógeno interagem, como microrganismos endofíticos, saprófitas ou antagonistas. Assim, numa área onde tanto a planta hospedeira como o patógeno estão presentes, o aparecimento e o desenvolvimento da doença são determinados pelo ambiente. Importantes doenças podem se tornar secundárias se as condições ambientais não forem favoráveis.

A mudança global pode ter efeitos diretos e indiretos tanto sobre os patógenos quanto sobre as plantas hospedeiras e a interação de ambos. Sobre os microrganismos fitopatogênicos, a distribuição geográfica, por exemplo, é determinada pela gama de temperaturas nas quais o microrganismo pode crescer, mas muitas espécies prevalecem somente em regiões onde a temperatura e outros fatores climáticos estão próximos aos valores ótimos para permitir um rápido desenvolvimento. A distribuição temporal também pode ser



FIGURA 1. Triângulo de doença: interação entre os elementos fundamentais que determinam a ocorrência de uma doença de planta.

afetada. Diversos patógenos, especialmente os que infectam folhas, apresentam flutuações quanto à incidência e à severidade durante o ano, que podem ser freqüentemente atribuídas às variações de clima. Muitos desses patógenos são favorecidos pelo aumento da umidade durante a estação de crescimento, devido ao aumento da produção de esporos. Por outro lado, doenças como os oídios são favorecidas por condições de baixa umidade. As condições favoráveis são específicas para cada patossistema e, assim, não podem ser generalizadas.

Em muitos casos, o aumento da precipitação permite uma maior dispersão de propágulos por gotas de chuva. A redução do número de dias de chuva durante o verão, por exemplo, pode diminuir a dispersão de diversos patógenos. Os ventos também exercem importante papel na disseminação de propágulos, tanto à curta como à longa distância. Fatores relacionados com a turbulência do ar, intensidade e direção dos ventos podem influenciar a liberação, o transporte e a deposição do inóculo.

Os efeitos diretos das mudanças climáticas também podem ser observados na fase de sobrevivência dos patógenos. Patógenos de plantas anuais ou perenes com folhas decíduas, por exemplo, necessitam suportar longos períodos de tempo sem tecido da planta hospedeira disponível. Nesses casos, a fase de sobrevivência é fundamental para garantir a presença de inóculo para o ciclo seguinte da doença. As condições durante a estação de inverno, por exemplo, são importantes para determinar o sucesso da sobrevivência saprofítica (LONSDALE & GIBBS, 1996).

As mudanças climáticas também podem ter efeitos diretos sobre a planta hospedeira. Um dos mecanismos envolvidos é a alteração da predisposição da planta, que consiste na modificação da sua suscetibilidade às doenças por fatores externos a ela, isto é, fatores não genéticos, que atuam antes da infecção (Schoeneweiss, 1975).

O desenvolvimento de uma planta é resultante da interação entre o seu genótipo e o ambiente. Assim, as mudanças no clima interferem na morfologia, fisiologia e metabolismo das plantas, resultando em alterações na ocorrência e severidade de doenças. Supostas alterações imorfológicas e fisiológicas que podem ocorrer com o aumento da concentração de CO₂ e afetar as interações patógeno-hospedeiro incluem redução da densidade de estômatos, maior acúmulo de carboidratos nas folhas, maior camada de ceras e de células epidermais, com aumento no teor de fibras, produção de papilas e acúmulo de silício, nos locais de penetração de apressórios, e aumento do número de células do mesófilo (CHAKRABORTY *et al.*, 2000). A elevação da concentração de CO₂ altera o início e a duração dos estádios de desenvolvimento do patógeno. O período latente, isto é, o período entre a inoculação e a esporulação, pode ser alterado, assim como a capacidade de multiplicação de alguns patógenos. Dessa forma, os mecanismos de resistência das plantas hospedeiras podem ser quebrados mais rapidamente, como resultado do desenvolvimento acelerado das populações dos patógenos (CHAKRABORTY, 2001).

Manning & Tiedemann (1995) analisaram os efeitos potenciais do aumento da concentração de CO₂ sobre as doenças de plantas, baseados nas respostas das plantas nesse novo ambiente. O aumento de produção de biomassa da planta, isto é, o aumento de brotações, folhas, flores e frutos, representa uma maior quantidade de tecido que

pode ser infectado pelos fitopatógenos. O aumento do teor de carboidratos pode estimular o desenvolvimento de patógenos dependentes de açúcares, como ferrugens e oídios. O aumento da densidade da copa e tamanho das plantas pode promover um maior crescimento, esporulação e disseminação de fungos foliares, que requerem alta umidade do ar, mas não chuva, como as ferrugens, oídios e fungos necrotróficos. O aumento de resíduos das culturas pode significar melhores condições para a sobrevivência de patógenos necrotróficos. A redução da abertura de estômatos pode inibir patógenos que penetram por essa abertura, como ferrugens, mísrios e alguns necrotróficos. A redução do período de vegetação da planta, com colheita e senescência precoces, pode diminuir o período de infecção de patógenos biotróficos e aumentar os necrotróficos. O aumento da biomassa de raízes amplia a quantidade de tecido a ser infectado por micorrizas ou patógenos veiculados pelo solo, mas pode compensar a perda causada pelos patógenos. A maior exsudação das raízes pode estimular tanto patógenos quanto antagonistas (promotores de crescimento da planta).

Outros organismos que interagem com o patógeno e a planta hospedeira também podem ser afetados pelas mudanças climáticas, resultando em modificações na incidência das doenças. Doenças que requerem insetos ou outros vetores podem sofrer uma nova distribuição geográfica ou temporal, que será resultante da interação ambiente-planta-patógeno-vetor (SUTHERST *et al.*, 1998). Aumentos na temperatura ou incidência de secas podem estender a área de ocorrência da doença para regiões onde o patógeno e a planta estão presentes, mas o vetor ainda não atuava.

4.2 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos, isto é, microrganismos que vivem no interior das plantas, sem causar danos, possuem grande importância ecológica, devido à evolução conjunta que realizaram com as plantas. A importância e o papel desses organismos para a biodiversidade decorrem dos benefícios que freqüentemente oferecem às plantas. Alguns fungos endofíticos produzem alcalóides tóxicos que protegem seus hospedeiros contra herbívoros. Outros benefícios incluem o maior crescimento ou aumento da capacidade competitiva das plantas, resistência à seca ou outras situações de estresse, pragas e doenças.

Apesar da grande importância do grupo, poucos trabalhos foram desenvolvidos a respeito dos impactos das mudanças climáticas globais. A escolha de uma metodologia adequada é de extrema importância para a obtenção dos resultados. Com essa preocupação e com a finalidade de verificar os efeitos da elevação do teor de CO₂ sobre *Epichloë sylvatica* em *Brachypodium sylvaticum*, Meijer & Leuchtmann (2000) utilizaram as instalações do tipo FACE ("Free Air Carbon Dioxide Enrichment"), em Eschikon (Suíça). Esse tipo de experimento promove a liberação do gás em condições de campo, porém o custo proibitivo das instalações tem restringido seu emprego. Segundo os autores, as consequências induzidas pela elevação do CO₂ parecem depender das espécies envolvidas.

Groppe *et al.*, (1999) estudaram o efeito de CO₂ nas interações entre *Epichloë bromicola* e *Bromus* spp., em estufa de topo aberto (“open-top chambers”, OTC). Esse tipo de instalação permite a liberação CO₂ em menores proporções que os experimentos FACE, porém possui a desvantagem da interferência das paredes da estufa, geralmente constituídas de plástico. Os autores verificaram que a elevação do teor de CO₂ não resultou em alteração do crescimento vegetativo de *Bromus erectus*, mas observou-se aumento das estruturas reprodutivas de plantas infectadas com *Epichloë bromicola* e um decréscimo nas não infectadas. Estes resultados demonstraram que o fungo endofítico pode estar em vantagem seletiva se ocorrer tal mudança na concentração de CO₂.

Com objetivos semelhantes, Marks & Clay (1990) estudaram o efeito do aumento da concentração de CO₂ nas interações entre *Lolium perenne* (azevém, uma gramínea do tipo C3) e *Tridens flavus* (C4) e os fungos endofíticos *Acremonium lolii* e *Balansia epichloë*, respectivamente, em experimento conduzido em câmara de crescimento com ambiente controlado. Esse tipo de experimento possui a desvantagem de nem sempre retratar os resultados que poderiam ser obtidos em campo. Além disso, apesar das relações simbióticas não terem sido alteradas nos dois casos estudados, os resultados referem-se a um período curto de tempo e, segundo os autores, poderiam apresentar diferenças, se fossem avaliados diversos ciclos das culturas.

A elevação do nível de CO₂ atmosférico pode afetar, além das relações entre a planta hospedeira e o microrganismo endofítico, também as relações entre insetos herbívoros e as plantas, e destes com os endofíticos. Tal alteração ambiente pode causar efeitos na composição nutricional e em fatores aleloquímicos das folhas, sendo que, para muitas plantas, a redução do valor nutricional resulta do aumento do conteúdo de amido e carboidratos e declínio no teor de nitrogênio. Essas alterações causam mudanças no consumo e crescimento de insetos herbívoros. Como as folhas apresentam aumento da relação carboidrato/nitrogênio em ambientes com elevado teor de CO₂, os insetos compensam parcialmente essa mudança aumentando as taxas de consumo. Marks & Lincoln (1996) realizaram estudo para verificar os efeitos da elevação do teor de CO₂ nas interações entre gramíneas, microrganismos endofíticos e insetos herbívoros, por se tratar de um interessante modelo de interação de três grupos distintos de organismos. Os autores verificaram que o consumo relativo de folhas de *Festuca arundinacea* pela lagarta *Spodoptera frugiperda* foi maior na concentração de CO₂ de 700 ppm, quando comparado com 400 ppm, tanto na presença quanto na ausência do endofítico *Acremonium coenophialum*. A lagarta teve sua taxa de crescimento relativo reduzida na presença do endofítico, como esperado. O aumento de CO₂ e a presença do endofítico reduziram a eficiência de conversão de alimento ingerido pela lagarta, isto é, a relação entre a biomassa consumida e a efetivamente produzida. Houve inclusive interação entre a presença do endofítico e o CO₂, resultando na mais baixa taxa de conversão. Isto significa que os insetos foram negativamente afetados pelo endofítico em presença de maior concentração de CO₂, o que pode ser de grande importância na nova condição climática. Com aumento do CO₂, pode ter ocorrido diluição do alcalóide tóxico produzido pelo endofítico, mas isto pode ter sido compensado pelo maior consumo de folhas.

4.3 Microrganismos simbiontes

As micorrizas constituem uma associação mutualística, na qual plantas vasculares são colonizadas por fungos específicos, ocorrendo perfeita integração morfológica e funcional entre os simbiontes. Trata-se de uma simbiose praticamente universal, não só pelo grande número de plantas suscetíveis à micorrização como também pela ocorrência generalizada na maioria dos ecossistemas (SILVEIRA, 1992). Devido à maior fixação de carbono pela fotossíntese em condições com elevado teor de CO₂ na atmosfera, há maior quantidade desse elemento disponível nas raízes para microrganismos simbiontes, como as micorrizas. Mudanças na estrutura da comunidade de micorrizas e no seu funcionamento podem ter importantes consequências para o ciclo do carbono, particularmente no fato de uma maior quantidade de carbono estar sendo transferida e estocada no solo. A resposta das micorrizas ao aumento da quantidade disponível de CO₂, também é de crucial importância para o entendimento de como os ecossistemas podem ser alterados com essa mudança climática. Para Colpaert & van Tichelen (1996), a elevação do CO₂ pode causar estresse por deficiência de nutrientes, o que pode aumentar a dependência de micorrizas na maioria dos ecossistemas naturais.

Além do aspecto nutricional, o efeito das micorrizas, especialmente das ectomicorrizas, na proteção das raízes contra o ataque de patógenos também constitui um efeito benéfico para o desenvolvimento das plantas. A presença do micélio do simbionte envolvendo a raiz cria uma barreira física que impede a penetração nas células corticais mais externas. Outro mecanismo de ação direta é a produção de substâncias químicas pelo simbionte, que são liberadas no solo e podem afetar o desenvolvimento dos patógenos. Entre os mecanismos de ação indireta estão a produção de compostos, que reduzem a atratividade das raízes aos patógenos, a alteração da microbiota da rizosfera e a indução de resistência das plantas (AUER & KRÜGNER, 1991). Apesar da destacada importância, os efeitos do aumento da concentração de CO₂ atmosférico em micorrizas foi muito pouco estudado.

Provavelmente, os fungos micorrízicos apresentam diferentes respostas à elevação da concentração de CO₂, fato que pode refletir nas associações entre as espécies e alterar a estrutura da comunidade de plantas (STADDON & FITTER, 1998). Além disso, as micorrizas são dependentes, em parte, da fotossíntese da planta hospedeira, que pode ser afetada pelo aumento do CO₂. Por esse motivo, diversos autores acreditam que há tendência de aumento da colonização micorrízica com a mudança prevista na concentração do gás.

Entretanto, trabalhos desenvolvidos com efeitos de CO₂ em ectomicorrizas demonstram que nem sempre esse resultado é obtido. Observou-se aumento de ectomicorrizas de algumas espécies de plantas, como *Quercus alba*, *Pinus echinata*, *Betula alleghaniensis*, *Betula papyrifera* e *Pinus strobus*. Porém, para *Tsuga canadensis*, *Pinus taeda* e *Pinus sylvestris* não foram observadas diferenças (STADDON & FITTER, 1998). Com carvalho (*Quercus robur*), por exemplo, notou-se efeito sinergístico da presença do CO₂ e de ectomicorrizas no crescimento da planta. A elevação da concentração de CO₂ levou ao aumento na quantidade de

carboidratos disponíveis no sistema radicular. Esse aumento pode ter beneficiado o fungo e, conseqüentemente, o carvalho, porque a micorriza tem aumentada sua capacidade de absorção de nutrientes, especialmente fósforo. Além disso, a colonização com micorrizas pode ter aumentado a capacidade de resposta da planta ao CO₂, pois elas podem atuar como reservatório para o excesso de carbono fixado, o qual pode causar problemas à fotossíntese.

Além da interferência dos efeitos da fertilidade do solo, Marks & Clay (1990) afirmam que os efeitos do CO₂ nas interações micorrízicas são também dependentes do tempo, isto é, podem ser observados durante algum estádio de desenvolvimento da planta e, depois, desaparecem. Todavia, não existem informações sobre os efeitos cumulativos, após algumas estações de cultivo.

Segundo Staddon *et al.*, (2002) diversas conclusões contraditórias se devem às comparações entre resultados obtidos em experimentos conduzidos em vasos com uma única combinação planta-fungo micorrízico. Respostas diferentes podem ser obtidas em sistemas com múltiplas espécies ou experimentos em campo, onde ocorrem interações interespecíficas (como, por exemplo, a competição) ou alteração de fatores abióticos (como disponibilidade de nitrogênio). Para estes autores, a associação simbiótica de uma determinada planta com dois fungos micorrízicos diferentes pode não ser alterada em testes conduzidos com os fungos inoculados separadamente. Entretanto, quando inoculados em conjunto, como ocorre na natureza, os efeitos do aumento da concentração de CO₂ na associação simbiótica são dependentes das interações entre os organismos, que por sua vez dependem das respostas específicas das espécies. A maior disponibilidade de carboidratos nas raízes da planta hospedeira pode resultar em alterações do balanço da competição entre as duas espécies de fungos micorrízicos se, por exemplo, uma espécie apresentar uma taxa de crescimento intrínseco ligeiramente maior que a outra.

5. Considerações finais

A avaliação das alterações no funcionamento dos ecossistemas por mudanças climáticas requer a análise detalhada de interações específicas em experimentos em campo e laboratório, e se possível o monitoramento de extensas áreas por longos períodos. Há necessidade de realização de novos trabalhos de pesquisa, especialmente em ecossistemas menos estudados, para a avaliação da vulnerabilidade.

Referências

- ATKINSON. D. *Global climate change: its implications for crop protection*. Surrey: BCPC, 1993. 102 p.
- AUER, C.G.; KRÜGNER, T.L. Potencial de controle de doenças de plantas com fungos ectomicorrízicos. In: BETTIOL, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: Embrapa/CNPDA, 1991. p.71-85.
- BRUCE, K. D.; JONES, T. H.; BEZEMER, T. M.; THOMPSON, L. J.; RITCHIE, D. A. The effect of elevated atmospheric carbon dioxide levels on soil bacterial communities. *Global Change Biology*. v.6, p.427-434. 2000.
- BUENO, C.J.; SOUZA, N.L. de. Sonda para gases de subsolo. *Summa Phytopathologica*. v.28. p.215-218. 2002.

- CANHOS, V.P. Impactos na biodiversidade. In: **Mudança do clima: volume I: Negociações internacionais sobre a mudança do clima: vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima.** Brasília. DF: Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2005. 250p. (Cadernos NAE, 3).
- CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.33-39.
- CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; CERRI, C.E.P.; PAUSTIAN, K. Impact of climate change on SOM status in cattle pasture in western Brazilian Amazon. In: R. Lal. B. Stewart, N. Uphoff, D.O. Hansen. (Org.). **Climate Change and Global Food Security.** Boca Raton, 2005, p.223-240.
- CHAKRABORTY, S. Effects of climate change. In: WALLER, J.M.L.; WALLER, S. J. (Ed.). **Plant pathologist's pocketbook.** Wallingford: CAB International, 2001. p.203-207.
- CHAKRABORTY, S.; PANGGA, I.B. Plant disease and climate change. In: Gillings, M.; Holmes, A. **Plant microbiology.** London: BIOS Scientific Publishers, 2004. cap.9, p.163-180.
- CHAKRABORTY, S.; TIEDEMANN, A.V.; TENG, P.S. Climate change: potential impact on plant diseases. **Environmental Pollution**, v.108, p.317-326, 2000.
- COAKLEY, S. M. Biospheric change: will it matter in plant pathology? **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.17, p.147-153, 1995.
- COLPAERT, J.V.; VAN TICHELEN, K.K. Mycorrhizas and environmental stress. In: FRANKLAND, J.C.; MAGAN, N.; GADD, G.M. (Ed.). **Fungi and environmental change.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.109-128.
- GHINI, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas.** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2005, 104p.
- GROPPE, K.; STEINGER, T.; SANDERS, I.; SCHMID, B.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Interaction between the endophytic fungus *Epichloë bromicola* and the grass *Bromus erectus*: effects of endophyte infection, fungal concentration and environment on grass growth and flowering. **Molecular Ecology**, v.8, n.11, p.1827-1835, 1999.
- INTERGOVERNMENTAL PAINEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2001: the scientific basis IPCC WG I.** TAR., 2001, 881p.
- JOHNSON, D. Response of terrestrial microorganisms to ultraviolet-B radiation in ecosystems. **Research in Microbiology**, v.154, p.315-320, 2003.
- JWA, N.S.; WALLING, L.L. Influence of elevated CO₂ concentration on disease development in tomato. **New Phytologist**, v.149, n.3, p.509-518, 2001.
- LI, F.; KANG, S.; ZHANG, J.; COHEN, S. Effects of atmospheric CO₂ enrichment, water status and applied nitrogen on water- and nitrogen-use efficiencies of wheat. **Plant and Soil**, v.254, n.2, p.279-289, 2003.
- LONSDALE, D.; GIBBS, J.N. Effects of climate change on fungal diseases of trees. In: FRANKLAND, J.C.; MAGAN, N.; GADD, G.M. (Ed.). **Fungi and environmental change.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.1-19.
- MANNING, W.J.; TIEDEMANN, A.V. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and Ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. **Environmental Pollution**, v.88, n.2, p.219-245, 1995.
- MARENGO, J.A.; SOARES, W.R. Impacto das mudanças climáticas no Brasil e possíveis futuros cenários climáticos: síntese do terceiro relatório do IPCC. In: TUCCI, C.E.M.; BRAGA, B. **Clima e Recursos Hídricos no Brasil.** Porto Alegre: Associação Brasileira de Recursos Hídricos/FBMC-ANA, 2003. p.209-242.
- MARKS, S.; CLAY, K. Effects of CO₂ enrichment, nutrient addition, and fungal endophyte-infection on the growth of two grasses. **Oecologia**, v.84, p.207-214, 1990.
- MARKS, S.; LINCON, D.E. Antiherbivore defense mutualism under elevated carbon dioxide levels: a fungal endophyte and grass. **Environmental Entomology**, v.25, n.3, p.618-623, 1996.
- MEIJER, G.; LEUCHTMANN, A. The effects of genetic and environmental factors on disease expression (stroma formation) and plant growth in *Brachypodium sylvaticum* infected by *Epichloë sylvatica*. **Oikos**, v.91, n.3, p.446-458, 2000.
- MUDANÇA DO CLIMA: volume I: Negociações internacionais sobre a mudança do clima: vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima. Brasília. DF: Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2005. 250p. (Cadernos NAE, 3).
- PAUL, N.D. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. **Environmental Pollution**, v.108, p.343-355, 2000.
- SCHOENEWEISS, D.F. Predisposition, stress, and plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.11, p.193-211, 1975.
- SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.

- SIQUEIRA, O.J.W. de; SALLES, L.A.B. de; FERNANDES, J.M. Efeitos potenciais das mudanças climáticas na agricultura brasileira e estratégias adaptativas para algumas culturas. In: LIMA, M.A. de; CABRAL, O.M.R.; MIGUEZ, J.D.G. (Ed.). **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p.33-63.
- STADDON, P.L.; FITTER, A.H. Does elevated atmospheric carbon dioxide affect arbuscular mycorrhizas? **Tree**, v.13, n.11, p.455-458, 1998.
- STADDON, P.L.; HEINEMEYER, A.; FITTER, A.H. Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. **Plant and Soil**, v.244, p.253-261, 2002.
- SUTHERST, R.W.; INGRAM, J.S.I.; SCHERM, H. Global change and vector-borne diseases. **Parasitology Today**, v.14, p.297-299, 1998.
- TAYLOR, A.R.; SCHRÖTER, D.; PFLUG, A.; WOLTERS, V. Response of different decomposer communities to the manipulation of moisture availability: potential effects of changing precipitation patterns. **Global Change Biology**, v.10, p.1313-1324, 2004.
- SIEGENTHALER, U.; STOCKER, T.F.; MONNIN, E.; LÜTHI, D.; SCHWANDER, J.; STAUFFER, B.; RAYNAUD, D.; BARNOLA, J. M.; FISCHER, H.; MASSON-DELMOTTE, V.; JOUZEL, J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. **Science**, v.310, p.1313-1317, 2005.
- SIONIT, N.; HELLMERS, H.; STRAIN, B. R. Interaction of atmospheric CO₂ enrichment and irradiance on plant growth. **Agronomy Journal**, v.74, n.4, p.721-725, 1982.
- THOMPSON, G.B.; DRAKE, B.G. Insects and fungi on a C3 sedge and a C4 grass exposed to elevated atmospheric CO₂ concentrations in open-top chambers in the field. **Plant, Cell and Environment**, v.17, p.1161-1167, 1994.
- WOLTERS, V.; SILVER, W. L.; BIGNELL, D.E.; COLEMAN, D.C.; LAVELLE, P.; VAN DER PUTTEN, W.H.; DE RUITER, P.; RUSEK, J.; WALL, D.H.; WARDLE, D.A.; BRUSSAARD, L.; DANGERFIELD, J.M.; BROWN, V.K.; GILLER, K.E.; HOOPER, D.U.; SALA, O.; TIEDJE, J.; VAN VEEN, J.A. Effects of global changes on above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: implications for ecosystem functioning. **Bioscience**, v.50, n.12, p.1089-1098, 2000.

*Impacto de Xenobióticos e
Metais Pesados na Microbiota
do Solo*

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva e Rosana Faria Vieira

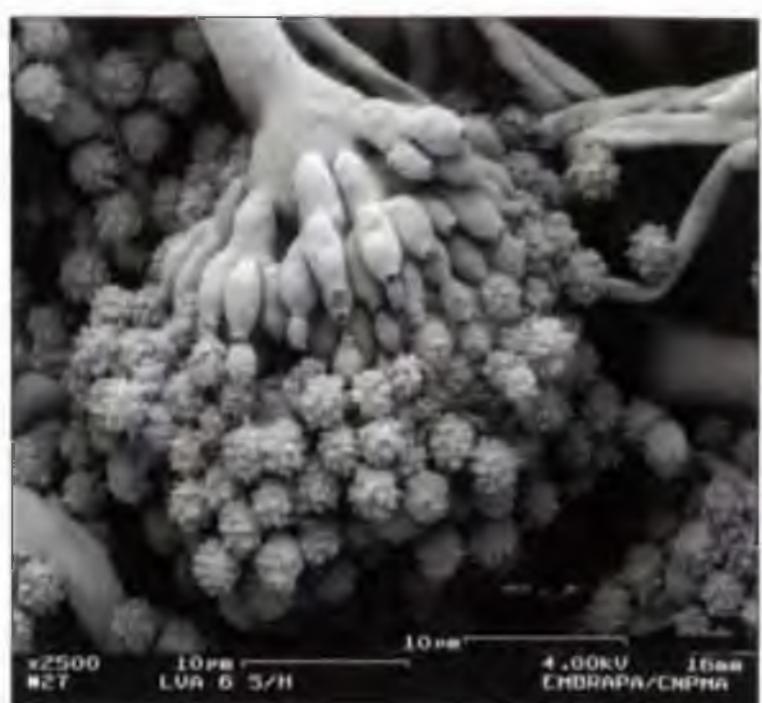


Foto: I.S. Melo

I. Introdução

Xenobióticos são compostos químicos antropogênicos, sintéticos, com atributos estruturais não naturais. Esse termo é derivado das palavras gregas *xeno* (estranho) e *bios* (vida) e, portanto, são literalmente, substâncias químicas estranhas à vida.

A disseminação destes compostos, após a sua descarga no ambiente, é determinada pela sua partição entre as fases sólida/líquida/gasosa do sistema solo e por seu potencial para concentrar na biota. Esses processos são determinantes do grau de extensão do impacto biológico do produto e sua distribuição nos diferentes compartimentos do sistema. Os compostos e seus metabólitos considerados persistentes podem permanecer quimicamente ativos no solo por muitos anos, e ter efeitos negativos sobre a biota e a saúde humana, enquanto que, aqueles não persistentes tendem a desaparecer em pouco tempo após a aplicação.

O solo é um sistema vivo, dinâmico e um recurso não renovável, cuja condição influencia a produção de alimentos, a eficiência ambiental e o balanço global (DORAN & PARKIN, 1994; DICK, 1997; DORAN & ZEISS, 2000). É o habitat para diversos organismos de importância para a sua fertilidade, atua como depósito para os agrotóxicos aplicados e é fonte de diversidade microbiana. As suas funções ainda incluem processos de suporte à vida, isto é, ancoragem para as plantas e suprimento de nutrientes, retenção e mobilidade de água, suporte à cadeia alimentar, funções regulatórias ambientais como a ciclagem de nutrientes, remediação de poluentes e seqüestro de metais pesados (BEZDICEK *et al.*, 1996).

A qualidade do solo é dependente de sua composição natural e, também, das modificações causadas pelo uso e manejo feito pelo homem (PIERCE & LARSON, 1993). O manejo incorreto do solo, como por exemplo, o cultivo intensivo, sem rotação de culturas, ou a contaminação accidental/deliberada por resíduos industriais e/ou municipais, são as maiores causas de sua degradação e redução de sua produtividade (REEVES, 1997; EDWARDS, 2002).

As propriedades do solo, físicas, químicas e biológicas, são sensíveis às modificações causadas pelas práticas de manejo e estresse ambiental e a determinação da qualidade relacionada a estas propriedades, pode ajudar a monitorar as modificações em sua sustentabilidade e qualidade. Isso é especialmente verdadeiro para o manejo agrícola e recuperação do solo e para auxiliar no estabelecimento de políticas para o uso da terra.

Podem ser distinguidos três tipos de fatores de estresse do solo: químico, físico e biológico. No estresse físico, os fatores mais importantes são temperaturas e umidades extremas, potenciais osmóticos e alta pressão (por exemplo, por equipamentos agrícolas). Os químicos incluem pH, excesso ou escassez de nutrientes orgânicos e inorgânicos, anoxia, salinidade e biocidas, tais como metais pesados, poluentes radioativos, agrotóxicos e hidrocarbonetos. Já nos fatores de estresse biológico podem

ser considerados novamente a deficiência ou excesso de nutrientes, introdução de organismos exógenos com grande capacidade competitiva e crescimento não controlado de patógenos e predadores. Esses fatores de estresse dificilmente operam individualmente.

A importância dos processos biológicos para a função dos agroecossistemas é inequívoca. Os microrganismos não são somente essenciais para o crescimento da planta, mas são também importantes como auxiliares na formação da complexa estrutura do solo e para sua fertilidade. Atividades antropogênicas que levam à deposições de contaminantes podem ser prejudiciais ao solo, podendo afetar as populações microbianas e suas atividades em diferentes níveis funcionais.

As propriedades biológicas e bioquímicas, incluindo respiração do solo medida pela taxa de liberação de CO₂ ou consumo de O₂, biomassa microbiana e atividade das enzimas do solo, são consideradas indicadores sensíveis da contaminação por causa da sua importância na ciclagem da matéria orgânica e de regulador do *pool* de nutrientes ativos no solo e são os parâmetros mais utilizados para a descrição da condição geral da microbiota do solo (SCHINNER *et al.*, 1996; MARGESIN & SCHINNER, 1997; VAN BEELEN & DOELMAN, 1997; MARGESIN *et al.*, 2000a e b). Essa microbiota sofre acentuada influência do ambiente, sendo que os microrganismos ou seus processos podem ser inibidos em até 100% por diversos fatores estressantes como, por exemplo, a deposição de metais pesados, a utilização excessiva de agrotóxicos, entre outros.

Os metais pesados e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são os poluentes do solo que mais causam preocupação ambiental (SMRECZEK *et al.*, 1999). A presença de metais pesados no solo pode afetar os processos bioquímicos pelo efeito sobre a proliferação microbiana e as atividades enzimáticas. Eles podem inibir a atividade enzimática por encobrir cataliticamente os grupos ativos, tendo efeito desnaturante na conformação das proteínas, assim como podem competir com os íons metálicos envolvidos na formação dos complexos enzimas-substratos (GIANFREDA & BOLLAG, 1996).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são considerados perigosos contaminantes do solo e nessa matriz eles podem ter diferentes destinos. A adsorção aos colóides naturais do solo (orgânicos e inorgânicos) freqüentemente limita sua biodisponibilidade como substrato, afetando assim a taxa de degradação microbiana (GROSSER *et al.*, 2000). Quando biodisponíveis, os PAHs podem afetar fortemente a atividade microbiana do solo.

É comum acreditar que a maioria dos agrotóxicos, quando aplicados nas doses e intervalos recomendados, é inócuas aos microrganismos benéficos dos solos. Mas, há relatos de efeitos inibitórios (RAY *et al.*, 1980) ou estimulatórios (PATNAIK *et al.*, 1995) de certos agrotóxicos nas transformações bioquímicas de importância para a fertilidade do solo, mesmo quando a dose usada é a recomendada. Apesar dos agrotóxicos serem aplicados na intenção de proteger as culturas, eles podem alterar o equilíbrio dos processos do solo, por ação direta ou indireta sobre a microflora, em períodos curtos ou longos, dependendo da intensidade, espectro de atividade e persistência do composto parental ou de seus metabólitos (SIMON-SYLVESTRE & FOURNIER, 1979).

2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)

Os PAHs são sub-produtos da combustão ou pirólise de substâncias orgânicas como carvão, óleo, petróleo, madeira, entre outros. As principais fontes antropogênicas incluem processos industriais, geração de calor, incineração e tráfego de lixo (WILD & JONES, 1995). A poluição por esses compostos é um problema sério em vários países, principalmente na vizinhança de áreas industriais, refinarias de petróleo, rodovias, aeroportos, postos de gasolina e estações de tratamento de efluentes. Também são contaminantes comuns em solo e água subterrânea como resultado da atividade industrial. O maior problema relacionado a esta contaminação reside na mutagenicidade, carcinogenicidade e características tóxicas destes contaminantes. Além disso, solos contaminados com PAHs freqüentemente contêm altas quantidades de outros elementos, tais como metais pesados que, em geral, são originários das mesmas fontes.

A indústria petroquímica gera uma série de efluentes líquidos durante o processo de refinamento do petróleo. Esses efluentes precisam ser tratados através de processos de depuração, uma vez que possuem alto conteúdo de hidrocarbonetos, principalmente, alcanos e parafina de 1-40 átomos de carbono, junto com cicloalcanos e compostos aromáticos (OVERCASH & PAL, 1979). Portanto, o efluente é um resíduo potencialmente perigoso e seu lançamento ao solo ou a sua queima, com tratamento prévio, tem sérias consequências ambientais e apresenta risco para a saúde humana e para o ecossistema.

Compostos originários do óleo cru, incluindo PAHs, exibem propriedades que, na maioria dos casos, inibem o desenvolvimento e atividade metabólica dos microrganismos (GIANFREDA & BOLLAG, 1996; KANALY & HARAYAMA, 2000; ANDREONI *et al.*, 2004). Contudo, esta influência depende principalmente da composição e concentração dos poluentes introduzidos no ambiente, bem como das propriedades do solo (FINE *et al.*, 1997; BOOPATHY, 2000). Em alguns casos pode ser observado o efeito estimulatório das substâncias originárias do óleo cru, como resultado da adaptação gradual dos microrganismos aos poluentes e à utilização dos xenobióticos como fonte de carbono e energia. Após o período de estresse há um aumento na intensidade respiratória e na atividade enzimática, desenvolvimento de microrganismos e decomposição gradual dos poluentes (SONG & BARTHA, 1990; BOOPATHY, 2000; MARGESIN *et al.*, 2000b). Assim, a contaminação com hidrocarbonetos, pode levar a modificações nas condições do solo. O conhecimento prévio desses processos é considerado necessário para a escolha e para o desenvolvimento de metodologias mais apropriadas à remediação de solos contaminados.

Com o objetivo de predizer o potencial das áreas semi-áridas para a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos, Caravaca & Roldan (2003) avaliaram as modificações nas propriedades físicas e biológicas destes solos, quando contaminados com resíduos de óleo. Concluiu-se que a contaminação por hidrocarbonetos aumentou as atividades microbiológicas e bioquímicas e melhorou a estrutura do solo. Contudo, a taxa de mineralização foi baixa, em virtude, provavelmente, da alta complexidade química dos hidrocarbonetos, que poderiam necessitar de um maior período de tempo para a adaptação microbiana e posterior degradação.

A biodegradação pelas populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelos quais poluentes como petróleo ou outros hidrocarbonetos podem ser eliminados do ambiente (LEAHY & COLWELL, 1990). O *landfarming* é freqüentemente escolhido como o método de tratamento para solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, em razão da sua retenção, relativo baixo custo e alto potencial de sucesso (HARMSEN, 1991). No estudo sobre a evolução da atividade microbiana, em solos com *landfarming*, foi observado que durante os primeiros meses do processo, os resultados obtidos para a fração lábil do carbono (C), quociente metabólico, respiração basal e ATP, demonstraram valores mais altos quando comparados aos do solo controle. No entanto, estes valores diminuíram no final do período experimental, quando os hidrocarbonetos foram degradados até a mineralização. O mesmo comportamento foi observado para as atividades enzimáticas estudadas (desidrogenase, β -glicosidase, protease e urease) (MARIN *et al.*, 2005).

Em solos com poluição pontual e difusa, a relação entre o conteúdo de PAHs e atividades enzimáticas (desidrogenase, fosfatase, urease e protease) pode ser dependente das propriedades do solo, como por exemplo, o conteúdo de carbono orgânico e o pH (BARAN *et al.*, 2004). Nesse trabalho observou-se que em solos com poluição difusa havia predominância de PAHs com três anéis, decomposto mais facilmente pelos microrganismos, enquanto na poluição pontual dominavam os PAHs de 5 anéis. Nas áreas de poluição pontual os PAHs estimularam as atividades enzimáticas estudadas, porém, em área de poluição difusa, caracterizada pelo alto conteúdo de PAHs (1.986 kg ha^{-1}) as atividades enzimáticas foram muito baixas, relacionando-se com o pH do solo. O baixo pH inibe as bactérias e estimula o desenvolvimento de fungos (MALISZEWSKA-KORDYBACH & SMRECZAK, 2003) que podem gerar compostos intermediários tóxicos em ambientes poluídos com produtos do óleo cru (KANALY *et al.*, 2000; KANALY & HARAYAMA, 2000), favorecendo dessa maneira, a decomposição de PAHs em epoxi, que são formas tóxicas intermediárias (KANALY *et al.*, 2000). Verificou-se também correlação positiva ($P \leq 0,05$) entre a atividade da desidrogenase e o conteúdo de fenantreno, fluoranteno, criseno e dibenzo[ah]antraceno, ao contrário do verificado em outros trabalhos (MARGESIN *et al.*, 2000a). Os resultados levaram à conclusão que a atividade da desidrogenase depende não somente do tipo de PAH, mas também dos outros compostos deste grupo e de sua concentração. Da mesma forma, foi observada relação entre as atividades da urease e protease e o conteúdo de fenantreno. Essas diferenças foram, em grande parte, determinadas pelas propriedades como salinidade, umidade, temperatura e conteúdo de oxigênio (BOOPATHY, 2000) que geralmente influenciam a função dos microrganismos (MARGESIN *et al.*, 2000b). No caso da fosfatase não foram observadas relações na vizinhança das fontes de poluição pontual, no entanto, na área de poluição difusa houve uma relação negativa entre os PAHs selecionados e a atividade da fosfatase.

No enfoque entre a relação das atividades enzimáticas e a degradação de PAH, foi considerada a diferenciação entre as propriedades físico-químicas dos compostos, resultante principalmente do variado número de anéis na partícula (peso molecular). Alguns dos compostos (≤ 4 anéis) foram moderadamente tóxicos e degradáveis pelos microrganismos, enquanto o grupo remanescente (> 4 anéis) teve

caráter fortemente tóxico, mutagênico e carcinogênico, sendo sua decomposição somente possível via co-metabolismo (CERNIGLIA, 1984; KANALY & HARAYAMA, 2000). Também foi atribuído um papel significativo à matéria orgânica (como uma fonte de carbono adicional) e aos nutrientes, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). Outros trabalhos têm demonstrado que a suplementação do solo com matéria orgânica diminui consideravelmente a influência negativa dos PAHs na atividade enzimática (MALISZEWSKA-KORDYBACH & SMRECZAK, 2003).

Além da influência estimulatória da matéria orgânica no desenvolvimento do metabolismo de microrganismos e no nível da atividade enzimática (DZOMBAK & LUTHY, 1984; BOOPATHY, 2000), vários estudos apontam para o papel da matéria orgânica nos processos de sorção dos poluentes orgânicos (PIGNATELLO & XING, 1996; MURPHY *et al.*, 1998). Em alguns casos específicos, podem ser formadas combinações muito estáveis de poluentes orgânicos com a matéria orgânica. Os xenobióticos ficam então indisponíveis aos microrganismos, diminuindo seu efeito tóxico (ROBERTSON & ALEXANDER, 1998). Por exemplo, em solos de região semi-árida, o baixo conteúdo de matéria orgânica pode afetar diretamente a sorção dos hidrocarbonetos pelo solo e, consequentemente, afetar a sua biodegradação (MOHN & STEWART, 2000).

A biodisponibilidade dos PAHs aos microrganismos é reduzida pela sorção destes compostos aos minerais do solo e microrganismos. Esta sorção, em sedimentos e solo está relacionada diretamente ao conteúdo de C da sorcente (DZOMBAK & LUTHY, 1984). No entanto, quando se cita a sorção às células bacterianas, fala-se de um processo mais complexo, possivelmente envolvendo dissolução e reações da superfície ativa. Por exemplo, a sorção do fenantreno variou de acordo com o gênero e espécie bacteriana, sendo que os Nocadiformes se destacaram pela maior capacidade de sorção. A biosorção diminuiu a capacidade de degradação dos PAHs em curto espaço de tempo (STRINGFELLOW & ALVAREZ-COHEN, 1999).

O conhecimento da biodisponibilidade e outros efeitos interativos dos PAHs sobre os microrganismos é importante, uma vez que estes compostos, em última instância, determinam a atividade e diversidade dos microrganismos. As comunidades microbianas podem ser unidades funcionais caracterizadas pela soma de suas propriedades metabólicas. Assim, o modelo de utilização do substrato pela comunidade resulta na diversidade taxonômica e abundância de cada taxon. Pelo estudo desses parâmetros RATHBONE *et al.* (1998) verificaram que na presença de pireno e fenantreno foram observadas diferenças na estrutura da comunidade, que resultaram na modificação da capacidade decompositora dos microrganismos do solo. Os compostos podem ter induzido modificações no tipo e qualidade das enzimas ou na composição das populações microbianas.

3. Metais pesados

As primeiras observações sobre os efeitos dos metais pesados nos processos microbianos dos solos datam do início do século XX (BROWN & MINGES, 1916),

mas somente nas décadas de 1960/1970 os seus reais efeitos sobre a microflora do solo começaram a ser observados e estudados. As elevadas contaminações de metais nos locais vizinhos às mineradoras, com concomitante acúmulo da matéria orgânica do solo decorrente da inibição da atividade dos microrganismos e da fauna, impulsionaram as pesquisas sobre os efeitos dos metais pesados na microbiota e nos processos microbianos do solo. Atualmente, embora os efeitos tóxicos sejam bem reconhecidos, tendências contrastantes são relatadas na literatura. A princípio existem dois fatores que podem contribuir para as discrepâncias entre os resultados, ou seja:

- fatores que modificam a toxicidade de metais como tipo de solo e fonte de contaminação (p. ex. lodo de esgoto e sais solúveis de metais), que afetam a química do elemento e;
- diferenças na sensibilidade dos microrganismos.

É extremamente difícil separar esses fatores quando os estudos sobre a toxicidade dos metais é realizada em solo, em virtude das dificuldades em se determinar a biodisponibilidade dos metais nesse sistema e também da complexidade das comunidades microbianas. Espécies de microrganismos dentro de um mesmo gênero ou mesmo estirpes dentro de uma mesma espécie, podem diferir nas suas sensibilidades aos metais (Figura 1). Ademais, a maioria dos estudos de campo envolve mais de um metal, o que muitas vezes torna difícil a interpretação dos resultados. Nesse caso, a toxicidade dos metais sobre os microrganismos do solo dependerá das interações sinergísticas ou antagonísticas entre os elementos. Por exemplo, o Zn e o Cd podem ter efeitos antagônicos ou sinérgicos dependendo de suas respectivas concentrações e do microrganismo alvo investigado (ADRIANO, 2001). A presença

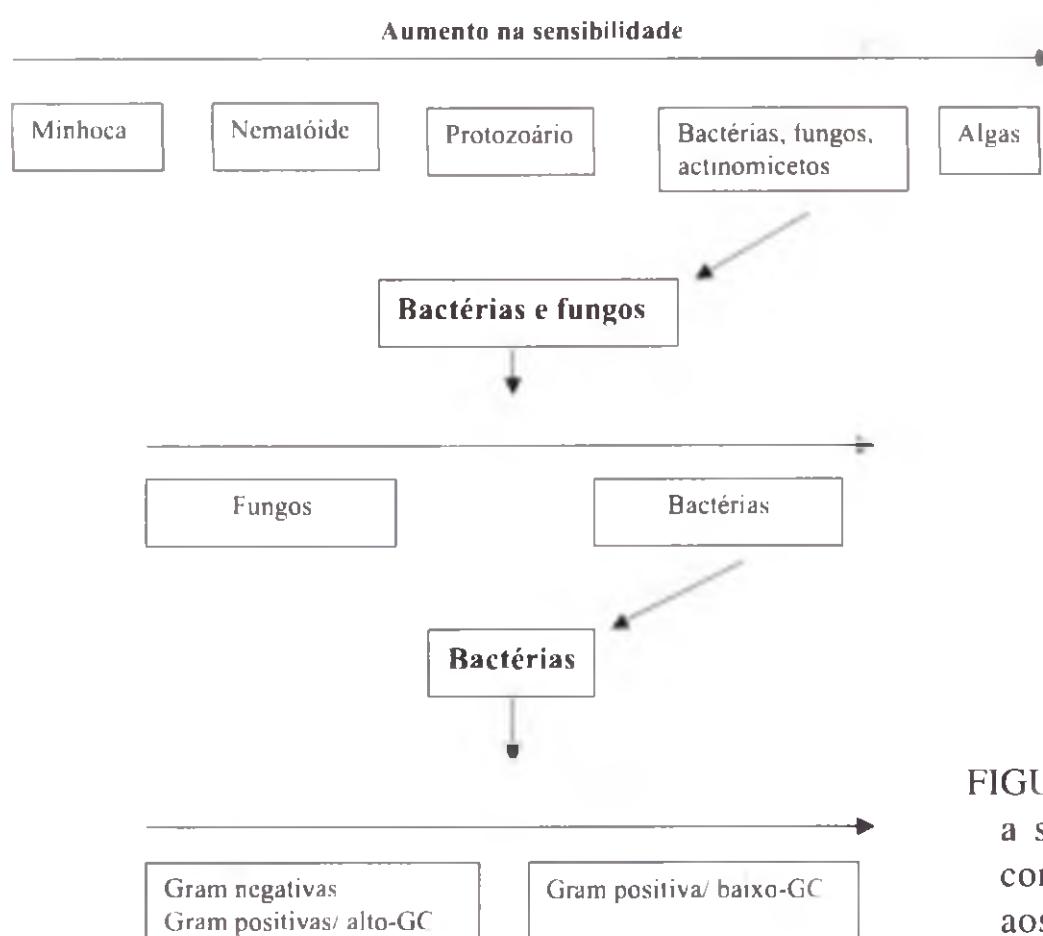


FIGURA 1. Diagrama mostrando a sensibilidade de diferentes componentes da biota do solo aos metais pesados.

de metais em combinação pode ter maior efeito sobre os parâmetros microbiológicos (KHAN & SCULLION, 1999) e atividades enzimáticas (RENELLA *et al.*, 2003) do que metais específicos em altas concentrações.

Muitos metais são essenciais para o metabolismo microbiano (p. ex. Zn e Cu), enquanto outros não apresentam função metabólica (p. ex. Pb, Cr e Cd). Todavia, esses elementos tornam-se tóxicos acima de uma concentração mínima, embora os efeitos sejam geralmente dependentes da especificidade dos microrganismos em mediar um processo particular. Por exemplo, a nitrificação é geralmente mais sensível aos metais pesados do que à amonificação, em razão do número restrito de microrganismos capazes de conduzi-la.

A contaminação do solo com metais pesados diminui a respiração (HATTORI, 1992), a biomassa microbiana (CHANDER *et al.*, 1995), as atividades enzimáticas (MATHUR & SANDERSON, 1980) e o número de microrganismos no solo (PENNANEN *et al.*, 1996). Isso pode levar a um distúrbio no sistema solo, uma vez que a população microbiana sensível tende a diminuir, enquanto a população resistente tende a aumentar (KUNITO *et al.*, 1997).

A decomposição microbiana do C pela microflora é também sensível à presença de metais pesados no solo e é, geralmente, dependente do substrato. Freqüentemente, a decomposição de palha, amido e celulose é sensível à presença de metais, enquanto o mesmo não é observado quando se considera a decomposição de adubo orgânico ou lodo de esgoto. Brynhildsen *et al.* (1988) relataram que as diferenças na disponibilidade de carbono no meio teve profundo efeito sobre a toxicidade de Cd, Cu e Zn em determinadas espécies microbianas.

Solos contaminados com metais podem também conter uma maior percentagem de isolados bacterianos resistentes a antibióticos do que solos não contaminados (CAMPBELL *et al.*, 1995). Essas observações pressupõem que a poluição com metais pode contribuir para uma maior resistência dos microrganismos aos antibióticos por meio de uma seleção indireta, que é mais duradoura à medida que os metais não tenham sido degradados (ALONSO *et al.*, 2001).

Os metais pesados estão presentes nos solos em várias formas por causa das interações que ocorrem entre esses elementos e aquele sistema. As concentrações totais de metais nos solos podem, portanto, não fornecer uma precisa avaliação de sua influência sobre os microrganismos. Do mesmo modo, os bioindicadores não respondem de forma concisa àqueles elementos, quando solos diferentes são estudados. Chew *et al.* (2001) não observaram efeitos dos metais pesados na atividade celulolítica de um determinado solo com teores elevados de Pb, Cu e Zn. Os autores relacionaram esses resultados à adaptação dos microrganismos aos metais presentes no solo e à reduzida biodisponibilidade dos elementos em função da capacidade de troca de cátions do solo.

Outras propriedades do solo tais como pH, conteúdo de matéria orgânica e de óxido de ferro alteram o efeito de um determinado metal sobre a microflora. Desses o pH apresenta a maior influência em razão do seu forte efeito sobre a solubilidade e especiação de metais no solo como um todo e, particularmente, na solução. Cada unidade de decréscimo no pH resulta em aumento de duas vezes na concentração de metais como Zn, Ni e Cd na solução do solo, onde os metais poderão não estar

completamente biodisponíveis devido à quelação por moléculas orgânicas e à ocorrência de formas químicas, que não podem ser diretamente absorvidas. Assume-se, geralmente, que o íon livre nas espécies químicas é a forma absorvida e que, quando presente em excesso, causa toxicidade. Todavia, a literatura sobre esse assunto e sobre microrganismos do solo é escassa. Como as bactérias estão presentes em colônias ou protegidas pelas argilas elas poderiam não estar expostas aos metais pesados. Os microrganismos podem também alterar a disponibilidade de metais ao seu redor devido à acidificação localizada do ambiente ou produção de compostos que complexam metais. Por exemplo, bactérias oxidantes do ferro que reduzem peritas de ferro para FeSO_4 e H_2SO_4 podem causar extrema acidificação causando aumento na disponibilidade de metais. Muitos são os trabalhos que utilizam solos contrastantes e estabelecem firme relação entre a magnitude dos efeitos adversos causados aos processos microbianos, pela adição de sais de metais ao solo, e as propriedades do solo, tais como, pH, conteúdo de argilas e matéria orgânica (HAANSTRA & DOELMAN, 1991).

3.1 Fatores metodológicos que podem influenciar a resposta microbiana aos metais pesados

Os estudos sobre a toxicidade de metais nos microrganismos do solo envolvem diferentes enfoques que, muitas vezes, evitam comparações significativas entre os experimentos. Esses estudos podem ser classificados em três grupos (GILLER *et al.*, 1998):

- estudos ecotoxicológicos em laboratório;
- estudos ecotoxicológicos de campo;
- monitoramento ambiental.

Os ensaios em laboratório incluem o estudo da toxicidade de diferentes metais em populações microbianas ou processos particulares. Isso é mais comumente feito por meio da adição de metais pesados ao substrato, na forma de sais mais ou menos solúveis, com posterior monitoramento do efeito sobre funções particulares ou sobre o número ou grupos de microrganismos no solo. O enfoque é simplístico e possui pouca relação com as reais situações dos solos a campo, onde as concentrações de metais são gradualmente modificadas por meio da deposição atmosférica, uso de fertilizantes, pesticidas ou compostos orgânicos ricos em metais.

Nos estudos ecotoxicológicos de campo, amostras de solo são coletadas de áreas contaminadas e não contaminadas com metais e submetidas a um teste de toxicidade. O solo é inoculado com um microrganismo teste cuja sobrevivência e atividade é acompanhada ao longo do tempo.

No monitoramento ambiental, solos do campo são amostrados e a população de um grupo funcional particular ou espécie de microrganismo é monitorado. Tais estudos podem ser conduzidos em áreas sujeitas a contaminação intencional ou em áreas sujeitas à poluição ambiental por elementos metálicos, como por exemplo, áreas

suplementadas com lodo de esgoto. Tipicamente, em estudos ecotoxicológicos de campo e laboratório é estudado a resposta da comunidade ou populações microbianas que estão se adaptando a concentrações elevadas de metais, enquanto em estudos com solos poluídos, por um longo período, estuda-se comunidades ou populações microbianas adaptadas a elevadas concentrações de metais.

3.2 Efeito da toxicidade por metais pesados nas células microbianas e processos microbianos do solo

Efeito dos metais pesados nas células microbianas: Os metais são tóxicos porque, em função de suas naturezas fortemente iônicas, eles se ligam a muitos constituintes celulares e deslocam metais essenciais de seus sítios de ligação (Figura 2). Eles podem romper proteínas e ácidos nucléicos, por meio da ligação aos grupos sulfidril, no primeiro caso, e aos grupos hidroxil e fosfato, no segundo caso. Os metais podem também afetar a fosforilação oxidativa e a permeabilidade da membrana, quando na presença de mercúrio. Os microrganismos geralmente utilizam vias de transporte específicas para levar aqueles elementos da membrana celular para o citoplasma.

Efeito dos metais pesados nos microrganismos e processos microbianos do solo: mineralização do C orgânico nativo e do carbono adicionado - A taxa de mineralização da matéria orgânica medida pela evolução do CO₂ (respiração básica), sob condições padronizadas, tem fornecido resultados conflitantes em solos agrícolas contaminados com metais (MINNICH & McBRIDE, 1986). Muitas vezes observa-se apenas um leve aumento ou decréscimo daquele parâmetro, embora o tamanho da biomassa microbiana seja consistentemente diminuída (FLIEBACH *et al.*, 1994; YEATES *et al.*, 1994).

Ademais, a taxa de mineralização do C na presença de metais é dependente da natureza do substrato disponível, o que poderá explicar algumas das discrepâncias entre os resultados obtidos em diferentes estudos (FLIEBACH & REBER, 1992; OBBARD & JONES, 1993). Estes também podem ser afetados por outros fatores, tais como variações nos níveis de contaminação pelos metais, nas fontes de contaminação, no período de tempo em que as respostas são monitoradas e nos tipos de solos.

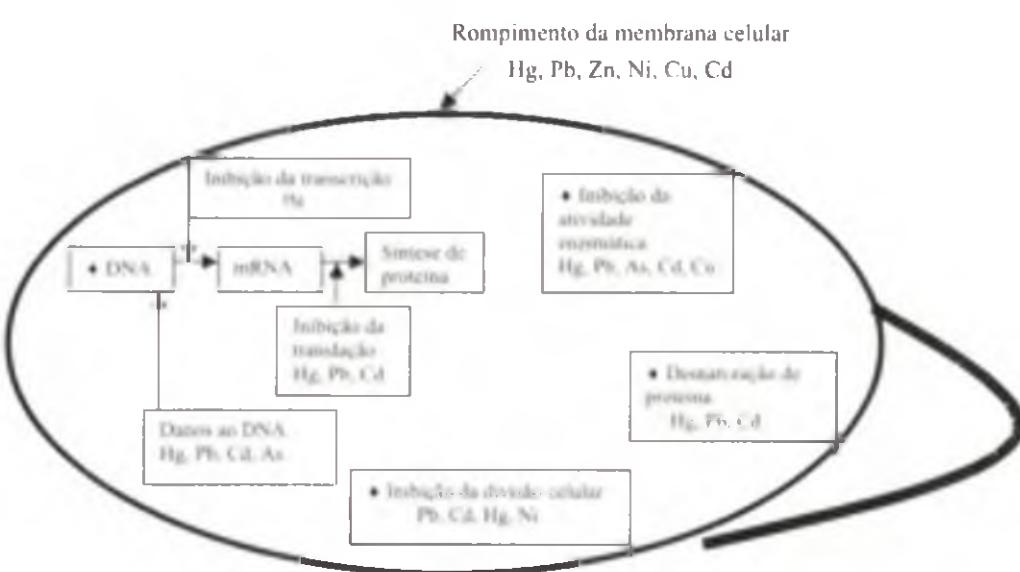


FIGURA 2. Sumário das várias influências tóxicas dos metais sobre as células microbianas. (Fonte: ROANE & PEPPER, 2000).

Biomassa microbiana: Os microrganismos diferem na sua sensibilidade à toxicidade pelos metais sendo que a exposição a esses elementos poderá resultar em decréscimo na quantidade da biomassa microbiana (KANDELER *et al.*, 1996; KNIGHT *et al.*, 1997). Doelman (1986) relata que dentre vários metais testados, o Hg, o Cd e o Cu causaram efeitos mais significativos sobre a biomassa microbiana do que o Pb. Bäath (1989) encontrou tendências similares, ou seja, o efeito negativo dos metais na biomassa microbiana diminuiu na seguinte ordem Cd > Cu > Zn > Pb. Trabalhos mais recentes, por outro lado, demonstraram que a biomassa microbiana medida pelo método de extração-fumigaçāo não é afetada pelo Cd mesmo a concentrações anormalmente altas como 500 – 1000 mg kg⁻¹ de solo (FRITZE *et al.*, 2000, LANDI *et al.*, 2000). Na concentração de 500 mg kg⁻¹, o Cd, apesar de inócuo para a biomassa microbiana, causou um decréscimo no conteúdo de ATP do solo (LANDI *et al.*, 2000). Esses resultados demonstram que a biomassa microbiana nem sempre pode ser um indicador adequado de estresse de metal (MEGHARAJ *et al.*, 2000). Bäath *et al.* (1998) não encontraram mudanças significativas no conteúdo de C da biomassa microbiana em solo suplementado com lodo rico em Zn e Ni (359 e 89 mg kg⁻¹ de solo, respectivamente), apesar de constatarem mudanças na estrutura da comunidade microbiana. Kandeler *et al.*, (1996) demonstraram que a biomassa microbiana diminuiu com o aumento da poluição com Cu em três solos da Áustria. Do mesmo modo, Banu *et al.*, (2004) mostraram decréscimo consistente na biomassa microbiana com o aumento das concentrações de Cu em solos da Austrália.

Estrutura da comunidade microbiana: Os diferentes grupos de microrganismos do solo reagem de forma diferente à presença de metais (DU PLESSIS *et al.*, 2005). Os protistas, por exemplo, são sensíveis a pequenos aumentos nos níveis de Cu no solo. Se considerarmos a importância destes microrganismos como um *link* no fluxo de energia, entre os níveis tróficos, fica evidenciada a vulnerabilidade do sistema solo à contaminação por aquele metal. Estudos de campo sugerem que ocorrem mudanças na estrutura genética da comunidade, em solos submetidos a longos períodos de estresses por elementos metálicos, sem que haja, necessariamente, qualquer aumento na tolerância da microbiota aos metais (GILLER *et al.*, 1998). Griffiths *et al.*, (1997) relataram quedas nas comunidades microbianas por meio de várias técnicas moleculares, em um solo argilo-arenoso suplementado com 1800 mg de CdSO₄ kg⁻¹ de solo. Geralmente, os actinomicetos são mais resistentes ao Cd do que as bactérias Gram negativas e Gram positivas, nessa ordem.

A exposição a metais também leva ao estabelecimento de populações microbianas tolerantes, que são freqüentemente representadas por várias bactérias Gram positivas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium* e por bactérias Gram negativas tais como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* e *Burkholderia* (KOZDRÓF & VAN ELSAS, 2001; ELLIS *et al.*, 2003). Nos solos contaminados essas populações podem estar envolvidas na alteração da mobilidade dos metais, por meio de redução, acumulação e imobilização *in situ* por precipitação extracelular (ROANE, 1999). A tabela 1 mostra alguns exemplos de gêneros e espécies de bactérias que têm sido isoladas de áreas contaminadas com metais.

TABELA 1. Bactérias isoladas de diferentes áreas contaminadas com metais (PIOTROWSKA-SEGET *et al.*, 2005).

Bactérias Gram negativas	Bactérias Gram positivas
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Comamonas</i>	
<i>Variovorax</i>	
<i>Methylobacterium</i>	
<i>Flavobacterium</i>	

Transformações do nitrogênio: Dentro das diferentes etapas do ciclo do nitrogênio, a nitrificação é potencialmente a mais sensível à poluição por metais pesados. Pequenas concentrações de Cd no solo podem estimular a mineralização de N, estimulando tanto a amonificação quanto a nitrificação, enquanto doses mais elevadas podem inibir estes dois processos. As bactérias nitrificadoras são mais sensíveis à presença de Cd do que as bactérias desnitrificadoras. Comparando Cd, Cu e Cr(VI), na concentração de 20 mg kg⁻¹ de solo, verificou-se que o Cd é o inibidor mais efetivo da amonificação e desnitrificação, enquanto o Cr(VI) teve maior efeito inibitório na atividade da nitrificação (YANG *et al.*, 2005).

Poucos estudos têm sido conduzidos sobre o efeito de metais pesados na desnitrificação. Do ponto de vista agronômico a inibição deste processo não seria considerada como um problema em potencial. Ocorre, porém, que os diferentes passos na redução do NO₃ para N₂ diferem nas suas tolerâncias aos metais pesados. Tais inibições seletivas poderiam agravar as consequências ecológicas da poluição com metais pesados. Por exemplo, a redução do NO₃ parece ser mais sensível do que a redução do NO₂, o mesmo ocorrendo com a redutase do óxido nitroso (BOLLAG & BARABASZ, 1979). Tais fatos poderiam levar ao acúmulo de níveis tóxicos de NO₂ no solo e a um aumento na emissão de óxido nitroso.

Fixação biológica do nitrogênio: O estudo sobre o efeito tóxico dos metais pesados na fixação simbiótica do nitrogênio somente foi reconhecido após a constatação de ausência daquele processo simbiótico em *Trifolium repens* L., em solo com concentrações moderadas de metais, em Woburn (UK) (McGRATH *et al.*, 1988). A sobrevivência de rizóbios de vida livre no solo é sensível a elevados teores de metais e pode explicar os efeitos adversos desses elementos na fixação simbiótica do N₂ (GILLER *et al.*, 1998). Broos *et al.* (2005) obtiveram dados que demonstram que a fixação simbiótica do nitrogênio é afetada pelo Zn, uma vez que este elemento diminui a população de rizóbio no solo abaixo de um nível considerado adequado ao processo simbiótico. Os metais podem não somente diminuir o tamanho da população de rizóbios no solo, mas também a sua diversidade genética (GILLER *et al.*, 1989, LAKZIAN *et al.*, 2002). As estirpes que sobrevivem em solos contaminados com metais pesados têm o menor número de tipos de plasmídeos e o maior número de bandas plasmidiais por isolado (i.e. complexidade dos perfis de

plasmídeos) (LAKZIAN *et al.*, 2002). Portanto, embora pareça que os plasmídeos estejam envolvidos na tolerância dos rizóbios aos metais, as suas reais funções ainda são desconhecidas.

Atividades enzimáticas: Os metais pesados podem reduzir as atividades das enzimas interagindo com seus sítios ativos (NANNIPIERI, 1994) ou afetando as suas sínteses dentro das células microbianas. Mudanças induzidas pelos metais na estrutura da comunidade podem também modificar as atividades enzimáticas (NANNIPIERI, 1994).

A exposição da microbiota do solo a altas concentrações de Cd, por um longo período, pode diminuir a síntese de hidrolases, como resultado de uma reduzida eficiência metabólica decorrente da adaptação fisiológica dos microrganismos às altas concentrações do metal (RENELLA *et al.*, 2005a). Do mesmo modo, este metal em doses elevadas ($800 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ de solo) pode afetar a atividade da desidrogenase, mas não da β -glucosidase, urease e fosfomonoesterase (MORENO *et al.*, 1999). O efeito danoso do Cd na atividade da desidrogenase pode ocorrer a uma concentração 10 vezes maior do que aquela que afeta a atividade da fosfatase ácida (LANDI *et al.*, 2000). Renella *et al.* (2005b) relataram que as atividades das enzimas fosfomonoesterase, arilsulfatase e β -glucosidase foram significativamente inibidas pelo Cd e Ni a concentrações de $13,1$ e $52,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo, respectivamente. Moreno *et al.* (2003) demonstraram que a atividade da fosfomonoesterase foi mais sensível à contaminação por Cd e Ni do que as atividades da urease e protease, com o Cd sendo mais inibitório que o Ni. O Cu pode causar decréscimo na atividade da desidrogenase a concentrações tão baixas como $0,16 \mu \text{ mol g}^{-1}$ de solo (solo arenoso, pH 6,9, %C 1,1). Esta inibição pode diminuir mesmo a maiores concentrações de Cu, como por exemplo, $7,87 \mu \text{ mol g}^{-1}$ de solo, em solo aluvial (pH 7,1, 1,8% C) (MALISZEWSKA *et al.*, 1985). Os diferentes efeitos de metais nas atividades enzimáticas pode ser devido ao fato que íons metálicos divalentes tais como Mn^{2+} , Zn^{2+} ou Ni^{2+} são co-fatores funcionais para glicosilhidrolases (BOUMA *et al.*, 1997), fosfohidrolases (COLEMAN, 1992) e enzimas amidohidrolases (HOLM & SANDER, 1997), enquanto o Cd^{2+} não é requerido para qualquer reação bioquímica conhecida.

3.3 Resistência e adaptação dos microrganismos do solo aos metais pesados

A adaptação microbiana é um importante mecanismo de resposta à presença de contaminantes no solo e pode resultar na compensação de um efeito adverso por meio do aumento na atividade da microbiota restante. Os microrganismos do solo podem também resistir à toxicidade por metais transformando-os em formas menos tóxicas, imobilizando-os na superfície das células ou em polímeros intracelulares, por precipitação ou biometilação (DOELMAN, 1986).

Desde a década de 1970, trabalhos de pesquisa têm identificado microrganismos resistentes a metais. A pressão seletiva de ambientes contendo estes elementos tem levado ao desenvolvimento desta resistência para todos os metais

tóxicos (ROUCH *et al.*, 1995). Os sistemas de resistência são, na maioria, mediados pelos plasmídeos e têm sido encontrados em todos os grupos de eubactérias estudados (SILVER & MISRA, 1984, JI & SILVER, 1995). A presença de íons metálicos pode induzir os genes para iniciar a resistência ao metal pela detoxificação enzimática. O exemplo mais proeminente é a resistência ao mercúrio Hg(II) codificada pelo operon *mer*. Existem diferenças entre os sistemas plasmidiais e cromossomais de resistência aos elementos metálicos. Os sistemas de resistência aos metais essenciais são usualmente localizados nos genes cromossomais e são mais complexos do que os sistemas plasmidiais. Os sistemas codificados por plasmídeos, por outro lado, são usualmente mecanismos de efluxo de íons tóxicos (BRUINS *et al.*, 2000). Seis mecanismos estão envolvidos na resistência dos microrganismos aos metais (Tabela 2) (SILVER, 1992; ROUCH *et al.*, 1995). A seguir são fornecidos exemplos de microrganismos que apresentam os mecanismos de resistência citados.

Exclusão do metal por uma barreira de permeabilidade: algumas bactérias formam uma camada de polissacarídeos extracelulares que apresentam sítios de ligação dos cátions metálicos (*Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter viscosus*).

Transporte ativo do metal para fora da célula/organismo: o transporte ativo ou sistemas de efluxo representa a maior categoria dentro dos sistemas de resistência a metais. O microrganismo usa o mecanismo de transporte ativo para exportar metais tóxicos do seu citoplasma (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Alcaligenes eutrophus*).

Seqüestro intracelular do metal por meio da ligação em proteína: o seqüestro intracelular é a acumulação de metais dentro do citoplasma para prevenir exposição a componentes celulares essenciais. Dois exemplos existem para esta forma de resistência a metal, ou seja, produção de metalotioneína em *Synechococcus* sp. e de proteínas ricas em cisteína em *Pseudomonas* sp. (ROUCH *et al.*, 1995; SILVER & PHUNG, 1996).

Destoxificação enzimática do metal para uma forma menos tóxica: o mercúrio é um exemplo modelo de sistema de destoxificação enzimática. Alguns microrganismos contêm um conjunto de genes que formam um operon *mer* de resistência ao Hg(II) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Thiobacillus ferrooxidans*).

TABELA 2. Mecanismos postulados de resistência a metais em microrganismos.

-
- Exclusão do metal por uma barreira de permeabilidade
 - Transporte ativo do metal para longe da célula/organismo
 - Seqüestro intracelular do metal por meio da ligação em proteína
 - Seqüestro extracelular
 - Destoxificação enzimática do metal para uma forma menos tóxica
 - Redução da sensibilidade dos alvos celulares ao metal
-

Redução da sensibilidade dos alvos celulares ao metal: alguns microrganismos adaptam-se à presença de metais tóxicos alterando a sensibilidade de componentes celulares essenciais, o que fornece um grau de proteção natural (ROUCH *et al.*, 1995). Esta proteção é alcançada por mutações que diminuem a sensibilidade, mas não alteram as funções básicas.

4. Agrotóxicos

A indústria mundial de agrotóxicos apresenta um faturamento global de cerca de US\$ 26,0 bilhões ano⁻¹, sendo que o Brasil ocupa o 3º lugar com US\$ 2,0 bilhões ano⁻¹, depois dos Estados Unidos e Japão. Entre as principais classes de agrotóxicos usados na agricultura brasileira em 2002, a dos herbicidas destacou-se, respondendo por 51% do valor das vendas totais, seguido dos inseticidas (24%), fungicidas (18%), acaricidas (4%) e outros, que incluem antibrotantes, reguladores de crescimento, óleos minerais e espalhantes adesivos (3%) (Figura 3).

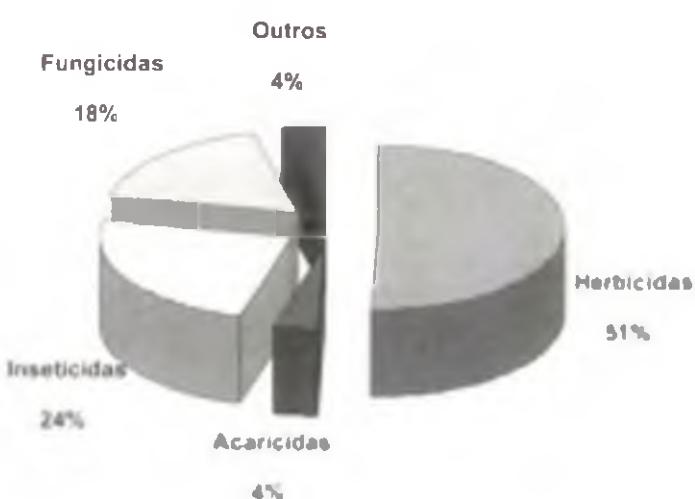


FIGURA 3. Porcentagem da venda de agrotóxicos em 2002, por classe, no Brasil.
Fonte: www.desenvolvimento.gov.br

Os agrotóxicos são compostos orgânicos de grande complexidade molecular e, pelo modo de ação, podem afetar processos específicos nos organismos-alvo, minimizando o efeito colateral das moléculas, ou afetando processos gerais. Por exemplo, na Europa, entre os agrotóxicos mais usados, estão os herbicidas sulfonilureas que possuem um anel triazina e um anel aromático, ligados por uma ponte urea. Os alvos desses compostos são as enzimas envolvidas na síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Assim, as sulfonilureas têm baixa toxicidade para todos os organismos que não sintetizam

estes aminoácidos, isto é, mamíferos e microartrópodos. No entanto, organismos não-alvo como bactérias e fungos podem ser prejudicados pelo composto quando aplicado em altas concentrações (BOLDT & JACOBSEN, 1998) e, segundo Rebecchi *et al.* (2000), também foi observada redução de algumas espécies colembolanas em solos agrícolas, após a aplicação de triassulfurom. Os autores não explicaram o efeito, mas os resultados demonstraram que a complexidade das medidas dos efeitos colaterais geralmente é problemática no ambiente.

Da mesma forma, espera-se que os fungicidas sintetizados para suprimir fungos patogênicos, não ajam sobre os fungos não-alvo do solo. No entanto, o fenpropimorfe apesar de não ter efeito tóxico imediato forma, durante a sua degradação, o metabólito ácido fempropimórfico, mais biodisponível, que pode afetar negativamente os fungos saprofíticos (BJORLÜND *et al.*, 2000). Segundo esses autores a atividade biológica

do fungicida pode estar associada tanto ao composto parental quanto à de seu metabólito, que pode ter maior mobilidade no solo.

As triazinas são outro grupo de compostos orgânicos bastante utilizados, com alvo em enzimas específicas envolvidas na fotossíntese das plantas C₃. Esses compostos teoricamente seriam específicos para as plantas devido ao seu modo de ação. No entanto, a cloração do anel triazina torna as moléculas tóxicas não somente para as plantas C₃, mas também para uma ampla variedade de organismos.

Alguns agrotóxicos apresentam estruturas moleculares similares e podem atacar o mesmo sistema biológico, mas apresentam comportamentos diferenciados no solo. Para o efeito esperado, a sua biodisponibilidade aos microrganismos é de grande importância e é determinada por muitos fatores dependentes da cultura e do solo, incluindo porcentagem de área coberta pela planta, lixiviação e degradação do composto. Também é dependente do composto orgânico utilizado (GEVAO *et al.*, 2000). A direta sorção das moléculas decresce significativamente com a concentração disponível da mesma na solução do solo. Após longos períodos o agrotóxico pode ser incorporado à matéria orgânica pelo envelhecimento.

A porcentagem de cobertura do solo é importante quando se calcula a dose efetiva de agrotóxico que o alcançou. Por exemplo, os herbicidas são utilizados quando a cobertura está ausente ou muito pequena, resultando em alta proporção do agrotóxico alcançando o solo exposto. Ao contrário, os fungicidas e inseticidas são geralmente utilizados em cultivos densos, sendo menor a exposição do solo. Por outro lado, os fatores edáficos incluindo nutrientes e pH, temperatura e umidade, diferem em importância de acordo com o composto envolvido. A temperatura e umidade do solo afetam diretamente muitos processos biológicos, incluindo o metabolismo da planta e a degradação microbiana e, portanto, influenciam a bioatividade e persistência dos compostos químicos (WEBER *et al.*, 1993).

Nas últimas décadas, houve grande aumento nos relatos sobre os efeitos dos agrotóxicos nos microrganismos não-alvo, em áreas agrícolas e, entre os organismos da superfície do solo, foi dada muita atenção aos decompositores devido a sua importância na ciclagem de nutrientes (EDWARDS & THOMPSON, 1973; INGHAM, 1985; EDWARDS & BOHLEN, 1992). Muitos trabalhos foram direcionados para o entendimento da complexidade das interações agrotóxicos-microrganismos do solo. Foram empregadas culturas puras, isoladas do solo e cultivadas em placas de Petri e, normalmente, foram testados efeitos de agrotóxicos específicos, como por exemplo, em estudos de dose-resposta. No entanto, na prática, mais de um agrotóxico é aplicado em um determinado tempo, ou as aplicações são repetidas em curtos intervalos de tempo. Assim, os organismos podem estar expostos a vários contaminantes simultaneamente e isso pode alterar os efeitos tóxicos.

Na literatura, o efeito dos compostos orgânicos sobre os organismos e processos do solo é extremamente diverso, variando de relatos sobre o efeito dos compostos em espécies individuais ou em populações e em sistemas biológicos, utilizando grande diversidade de métodos para os testes, tanto em laboratório quanto em campo (EDWARDS & BATER, 1990). Os efeitos sobre as populações microbianas são geralmente estudados por métodos dependentes de cultivo e baseados em grupos bacterianos com papel funcional específico no solo. Os mais utilizados são os grupos

bacterianos de crescimento lento como os actinomicetos, que degradam fontes complexas de carbono (LACEY, 1973; BANERJEE & BANERJEE, 1987), enquanto as bactérias de crescimento rápido, como o gênero *Pseudomonas*, que degradam fontes simples de C, são menos estudadas (THIRUP *et al.*, 2000). Da mesma forma, há um foco sobre os agrotóxicos que afetam grupos bacterianos com funções nas transformações de N no solo. Como exemplo cita-se a fixação de N₂ por *Rhizobium* em leguminosas, bem como por *Azospirillum* e *Azotobacter*, que são bactérias fixadoras de N, de vida livre (BANERJEE & BANERJEE, 1987; MARTENSSON, 1992; REVELIN *et al.*, 1992; RAMOS & RIBEIRO, 1993). Ademais, as bactérias nitrificadoras que apresentam papel chave no ciclo do N no solo, podem também ser severamente afetadas pelos agrotóxicos (DONECHE *et al.*, 1983).

A grande quantidade de biomassa microbiana na superfície do solo influencia continuamente a estrutura e o metabolismo bioquímico dos agrotóxicos, e interage diretamente com a ciclagem de matéria orgânica total. A fertilidade natural dos ecossistemas depende quase que totalmente dos processos microbianos naturais como a fixação biológica de N, mineralização das formas orgânicas de C, N, e P e transformação da matéria orgânica, todos mediados pela biomassa microbiana. Assim, qualquer declínio na fertilidade natural do solo pela entrada de poluentes, terá, portanto, proporcionalmente, grandes efeitos no ecossistema natural. A cada ano, cerca de 10 t de substâncias orgânicas (suplementação orgânica com adubos orgânicos, resíduos de culturas, exsudatos de raízes e biomassa morta) são adicionadas ao solo, para manter estável o conteúdo de carbono orgânico em sua camada superficial.

As frações da matéria orgânica natural sofrem conversões químicas e biológicas, bem como interações físico-químicas com os constituintes orgânicos e minerais do solo. A própria conversão dos compostos orgânicos nativos é governada pela respectiva comunidade microbiana. Ela produz e usa diferentes fontes de carbono em um processo dinâmico (FRANZLUEBBERS & ARSHAD, 1997; HU *et al.*, 1999; KENNEDY, 1999; BUCKLEY & SCHMIDT, 2003; BURAUEL & BAbMANN, 2005). Um produto final importante, do metabolismo da matéria orgânica natural, é o CO₂, que é liberado dinamicamente do sistema solo, com picos durante a estação de crescimento. Os agrotóxicos na ordem de 1 a 4 kg de carbono por hectare por ano podem ser introduzidos neste processo de conversão dinâmico, devido a sua deposição e aplicação (BURAUEL *et al.*, 1998). As fontes de carbono com várias características físico-químicas são associadas aos componentes minerais. A ligação dos agrotóxicos a estes componentes organo-minerais de estruturas complexas influencia, decisivamente, os processos como a mobilização, imobilização, biodisponibilidade e transporte (PICCOLO *et al.*, 1998; GEVAO *et al.*, 2003). Dessa forma, a matéria orgânica natural do solo influencia as funções do solo de armazenamento, filtro, tampão e inativação para os agrotóxicos.

Em sistemas de plantio direto a adição de resíduos de culturas na superfície do solo pode adsorver os herbicidas e diminuir o seu efeito (SANFORD, 1982). Exemplo deste fato foi relatado por Harris *et al.* (1995) que não observaram efeito dos herbicidas metolacloro, metribuzim, norflurazona e orizalina sobre a microbiota do solo, em solos com plantio direto, ou que receberam resíduos de queimada. Estes autores também observaram que os compostos metolacloro e metribuzim foram

relativamente não persistentes no solo, enquanto o norflurazona e orizalina foram mais persistentes, sendo facilmente detectados sete dias após o tratamento, mas tiveram pouco efeito sobre os microrganismos. Os resultados apresentados, junto aos obtidos por Moorman & Dowler (1991) e Anderson (1978), levaram à conclusão de que poucos herbicidas, quando aplicados em doses de campo, têm efeito prejudicial na microbiota do solo.

Mesmo que o metabolismo do N e do C não seja afetado, a estrutura da comunidade bacteriana no solo pode ser modificada pelo agrotóxico. Alguns microrganismos podem ser suprimidos, enquanto outros podem proliferar em nichos ecológicos vagos. Isso pode levar a sucessões na comunidade microbiana e alterar as atividades durante um período de tempo. Portanto, é necessário nas avaliações de risco dos agrotóxicos, incorporar medidas da diversidade microbiana, refletida na distribuição imediata dos organismos pelo efeito a curto e longo prazo.

A comunidade microbiana é uma mistura complexa de inter-relações entre organismos de diferentes níveis tróficos, o que ocasiona muitos efeitos indiretos. Há duas implicações importantes em se avaliar a diversidade microbiana, uma delas é que o decréscimo na diversidade geral resultará em risco de diminuição da capacidade do sistema biológico em responder às perturbações (EHSCHEMANN & GRIFFITHS, 1998). A outra, é que a diversidade microbiana reflete o histórico da influência no microambiente. Alguns grupos microbianos são capazes de utilizar o agrotóxico aplicado como fonte de energia e nutrientes, contudo ele pode ser tóxico a outros organismos. A própria diversidade indica o quanto o ecossistema foi estressado.

Ao monitorar o impacto do efeito dos herbicidas dinoterbe e metamitrom por meio da respiração induzida pelo substrato, atividade da desidrogenase, mineralização de C e N, *fingerprint* da comunidade usando Biolog e TGGE do DNA das bactérias, Engelen *et al.* (1998) observaram efeito significativo dos herbicidas, principalmente no *fingerprint* da comunidade bacteriana pelo Biolog. Esse demonstrou maior efeito significativo do dinoterbe e um efeito leve, porém, também significativo, do metamitron. Igualmente, os géis de TGGE de 16S DNA demonstraram maior efeito do dinoterbe na diversidade microbiana, enquanto quase não foi observado efeito do metamitron. Pelo corte e seqüenciamento das bandas nos géis TGGE, nos solos tratados com dinoterbe, foi encontrada uma banda associada à bactéria que oxida nitrito (*Nitrospina*, *Nitrospira*), que não foi observada no solo controle.

O efeito de diferentes métodos para a avaliação ecotoxicológica foi também demonstrado por El Fantroussi *et al.* (1999), na avaliação do efeito, a longo prazo, de três herbicidas (diurom, diurom + linurom e cloroturom). O impacto dos herbicidas na comunidade microbiana foi demonstrado pela contagem de microrganismos em placa (UFC) e confirmado pelos resultados do *fingerprint* resultante do Biolog GN e do DGGE. No solo não tratado foram encontradas duas bandas associadas a *Pseudomonas*, que estiveram ausentes nos solos tratados com linurom.

Outro exemplo, enfocando a diversidade taxonômica vem da avaliação da comunidade microbiana de um solo arenoso, exposto ao herbicida 2,4,5-T (2,4,5-ácido triclofenoxiacético), na concentração de 100 µg g⁻¹ (ATLAS *et al.*, 1991). Foram determinadas, aproximadamente, 40 características fenotípicas para cada linhagem isolada. Pelo Índice de Shannon os autores verificaram que a diversidade das

comunidades perturbadas foi significativamente menor. O distúrbio levou à sobrevivência de relativamente poucas espécies definidas taxonômica mente. As comunidades desenvolvidas demonstraram aumento na tolerância fisiológica e versatilidade metabólica. Também foi observado que essas comunidades sobreviveram sob diferentes temperaturas, pH e concentrações de sal. Segundo os autores, o número limitado de populações sobreviventes apresentou propriedades específicas que possibilitaram a sua sobrevivência dentro das comunidades perturbadas.

A aplicação de herbicidas como 2,4-D e ou de seu análogo 2,4,5-T provoca um aumento do conteúdo de C da biomassa microbiana (RATH *et al.*, 1998). No entanto, o que chama atenção é o estímulo da biomassa pelo 2,4,5-T em condições sob inundação. Esse composto é conhecido como mais tóxico aos microrganismos e suas atividades, do que o 2,4-D. Um cloro extra no 2,4,5-T torna-o mais tóxico aos organismos não-alvo e mais recalcitrante à biodegradação do que o 2,4-D (ALEXANDER & SCOW, 1989). Este efeito foi mais pronunciado na concentração de 1,5 µg g⁻¹ quando comparada à dose de 0,75 µg g⁻¹. Em doses mais altas como 7,5 e 15 µg g⁻¹ o efeito torna-se inibitório.

Por outro lado, os herbicidas 2,4-D, tiobencarbe e flucoralina inibiram as populações fúngicas, mas este efeito foi transitório na presença de 2,4-D (SHUKLA, & MISHRA, 1997). Segundo alguns autores, a população microbiana do solo é normalizada em aproximadamente 6 semanas após a aplicação deste herbicida. Outro exemplo da ação de herbicidas sobre os fungos é dado pela aplicação do composto fluazifope-butílico. Esse, quando em altas concentrações (3 e 6 µg g⁻¹) pode inibir temporariamente a comunidade fúngica (ABDEL-MALLEK *et al.*, 1996). Segundo Sapoundjieva & Kouzmanova (1987), o efeito de fluazifope-butílico sobre os fungos depende da dose aplicada. Os autores observaram que na dose 4 L ha⁻¹, a molécula estimula o crescimento fúngico. Quando aplicado na dose de campo, não teve efeito na contagem de fungos ou em outra atividade microbiana testada (ABDEL-MALLEK *et al.*, 1998). O peso miceliano produzido por *A. niger* e *T. harzianum* não foi significativamente afetado pela aplicação do herbicida, mas *A. flavus* e *A. alternata* tiveram seu peso reduzido na concentração de 24 µg mL⁻¹, enquanto *C. echinulata* foi estimulado na mesma concentração (ABDEL-MALLEK *et al.*, 1998).

Os microrganismos heterotróficos do solo adquirem C e N para sua manutenção e crescimento dos resíduos da decomposição das plantas e outros materiais orgânicos adicionados ao solo. Os herbicidas com baixa relação C:N (<15) têm potencial para ser facilmente mineralizados, sendo que o N que está em excesso da demanda microbiana é liberado na forma inorgânica (ALEXANDER, 1977). O glifosato tem uma relação C:N de 3:1 e pode ter um efeito imediato na atividade microbiana do solo. Estudos já relataram que as aplicações de glifosato não tiveram efeito significativo na atividade microbiana quando medida a mineralização de C ou, somente apresentava efeito transitório, quando aplicado em altas doses (HART & BROOKES, 1996; OLSON & LINDWALL, 1991; WARDLE & PARKINSON, 1990; 1992). Os solos, em alguns desses trabalhos, foram amostrados de 1 a 4 semanas após a aplicação de glifosato e podem ter perdido os efeitos dos primeiros dias sobre a atividade microbiana. Como a persistência de glifosato nos solos tem sido relatada entre um mês a vários anos (TORSTENSSON, 1985), a avaliação da mineralização

do C e N imediatamente após a sua aplicação pode fornecer resultados mais realísticos do verdadeiro efeito deste herbicida na atividade microbiana do solo, como observado por Haney *et al.* (2000). O aumento da mineralização do C ocorreu logo no primeiro dia após a adição de glifosato e foi contínuo por 14 dias. O herbicida estimulou significativamente a atividade microbiana, medida pela mineralização do C e N, mas não afetou a biomassa microbiana. A mineralização cumulativa de C aumentou com a concentração do composto orgânico, e foi significativamente maior em todas as aplicações quando comparado ao controle. Uma forte relação linear entre C e N mineralizado e a quantidade de C e N adicionado como glifosato, indicaram que o herbicida foi diretamente responsável pela atividade microbiana.

Como pode ser visto, vários estudos foram realizados considerando os efeitos colaterais da aplicação de herbicidas sobre os microrganismos do solo ou sobre as atividades microbianas. No entanto, poucos são os que se referem ao efeito dos fungicidas nas populações microbianas e em suas atividades. Como outros agrotóxicos, estes compostos são biotóxicos e interferem não somente com as reações bioquímicas e fisiologia dos fitopatógenos, mas também influenciam populações ou atividades de outros microrganismos não-alvo (TU, 1993). O efeito inicial já descrito, após a aplicação destas moléculas, é o aumento da atividade microbiana e da dinâmica de nitrogênio no solo (CHEN *et al.*, 2001a e b; TU, 1993; VIEIRA *et al.*, 2000; ZELLES *et al.*, 1985;). A explicação para alguns resultados é de que a aplicação de fungicidas mata ou inibe a atividade de certos grupos de fungos, o que poderia levar a uma imediata redução na respiração e biomassa microbiana. Todavia, os microrganismos mortos ou o próprio fungicida poderiam servir como substrato para os organismos vivos, liberando-os da competição ou da inibição antagonista, via substâncias produzidas pelos fungos. Estes efeitos podem levar a um rápido aumento da atividade bacteriana e na mineralização do nitrogênio, aumentando a sua disponibilidade (CHEN *et al.*, 2001a e b; FAY *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2000). Em decorrência do efeito dos fungicidas sobre a razão bactérias/fungos e os efeitos potenciais sobre os microrganismos não-alvo, outras transformações do nitrogênio, como nitrificação e desnitrificação, podem também ser afetadas, com impacto na composição e atividade das comunidades microbianas (VYAS, 1988; CHEN *et al.*, 2001a e b).

Aplicações do fungicida metalaxil em solos cultivados com uva inibiu significativamente o número e a atividade dos microrganismos do solo (USATAYA *et al.*, 1993). Sua aplicação sistêmica induziu a uma breve estimulação com subsequente supressão dos fungos e actinomicetos do solo (DVORNIKOVA *et al.*, 1988). Outros autores, no entanto, relataram que os fungicidas fenilamidas como metalaxil e mefenoxam, bem como seus metabólitos, em baixas concentrações, não inibem o crescimento dos microrganismos do solo, hipótese esta, confirmada pelo estímulo da amonificação e nitrificação após a aplicação dos dois fungicidas (MONKIEDGE *et al.*, 2002 a e b). Esta afirmação também está em concordância com as observações de Finkelstein & Golovleva (1988) que demonstraram que baixas concentrações de metalaxil estimularam o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, enquanto altas concentrações inibiram o processo de nitrificação. Da mesma forma, baixas concentrações de metalaxil aumentaram as atividades enzimáticas e as inibiram em doses altas (SHETTY & MAGU, 2001). De todas as hidrolases estudadas, as

fosfatasas ácida e alcalina, em geral, não foram sensíveis ao efeito do metalaxil, provavelmente, devido à complexa interação destas enzimas com o solo, mas a atividade da desidrogenase foi bastante sensível (MONKIEDGE *et al.*, 2002 a).

Parâmetros como a respiração induzida pelo substrato (SIR) e atividade enzimática da desidrogenase (DHA), utilizados normalmente como índices de toda a atividade microbiana do solo, apresentaram respostas diferenciadas à aplicação de três fungicidas: benomil, captam e clorotalonil. A DHA foi estimulada com benomil (18 a 21%) e clorotalonil (8-15%), exceto em solo suplementado com alfafa, mas inibida pelo captam (40-58%). Os solos tratados com os três fungicidas apresentaram menor concentração de N na biomassa microbiana. (CHEN *et al.*, 2001a).

O captam é extensivamente usado na proteção de sementes, portanto, entra em contato direto com o solo após o plantio, com possibilidade de alcançar altas concentrações nos microsítios e influenciar os processos bioquímicos do solo. Resultados obtidos por Martinez-Toledo *et al.* (1998) confirmaram este efeito. Segundo esses autores, o captam, quando aplicado nas doses recomendadas, aumentou o número total de bactérias, principalmente, após a segunda aplicação, mas reduziu, significativamente, os fungos cultiváveis. Os resultados demonstraram que o fungicida afetou negativamente as bactérias nitrificadoras e as diazotróficas aeróbias, efeito fortemente correlacionado com a dose do fungicida, mas aumentou o número de bactérias desnitrificadoras.

Estudo sobre o efeito do captam, em três solos diferentes, revelou que o fungicida influenciou a hidrólise da uréia, e o aumento da concentração do fungicida diminuiu consideravelmente a oxidação de NH_4^+ para NO_3^- . A nitrificação foi inibida de acordo com a dose aplicada e foi maior nos solos ácidos e mais arenosos (PARAMA *et al.*, 1997). É provável que em solos arenosos, a menor disponibilidade para adsorção dos agrotóxicos, resulte em maior biodisponibilidade da molécula e, consequentemente, seja a causa para a maior inibição. Assim, é possível que as aplicações freqüentes de captam resultem em concentrações do fungicida no solo que causem um impacto negativo na economia do nitrogênio e também no equilíbrio microbiano no solo. No entanto, outros trabalhos relatam que quando comparado a outros fungicidas, o captam tem efeito relativamente limitado nos organismos não-alvo (ANDERSON, 1978; INGRAM *et al.*, 1991). Entretanto, CHEN *et al.* (2001b), verificaram que a aplicação de captam e benomil, em solos suplementados com folhas de alfafa fenada e palha de trigo, reduziram a atividade microbiana avaliada pela respiração induzida pelo substrato (SIR) e pelas atividades enzimáticas da desidrogenase (DHA) e fosfatase, mas quase não modificaram a biomassa microbiana. A possível explicação para esse fato é que os fungicidas podem ter mudado a dominância da comunidade microbiana do solo, de fúngica para bacteriana. Este súbito incremento da atividade bacteriana foi, provavelmente, responsável pelas modificações bioquímicas que ocorreram, principalmente em relação à mineralização de nitrogênio.

Na avaliação do efeito do captam, clorotalonil e benomil na dinâmica do nitrogênio foi observado que os solos tratados com captam apresentaram concentrações mais altas de NH_4^+ do que os solos controle, enquanto, benomil e clorotalonil tiveram pouca influência na concentração de NH_4^+ . As taxas de mineralização líquida de N e a nitrificação foram influenciadas pelos três fungicidas e

pela suplementação orgânica. A mineralização foi mais alta nos solos tratados com captam e a dinâmica do N foi influenciada pelo clorotalonil da mesma forma que com o captam, mas alcançou o pico da nitrificação mais cedo nos solos suplementados com alfafa. Os modelos do efeito dos fungicidas nos processos de ciclagem de nutrientes não foram grandes e foram específicos para cada fungicida. O captam apresentou efeitos mais pronunciados do que o clorotalonil e o benomil (CHEN *et al.*, 2001a).

Outros trabalhos relataram que em solos suplementados com palha, tratados com os fungicidas epoxiconazol e triadimefom, houve aumento da inibição transiente da biossíntese do ergosterol. Porém, a adição de folhas de alfafa fenadas resultou em maior atividade e biomassa microbiana (HART & BROOKES, 1996). Segundo Zelles *et al.* (1985), a adição de 5% de alfafa acabou com as pequenissimas diferenças entre solos tratados com fungicidas e solos controle. Isso foi possível porque a adição de alfafa não somente melhorou o ambiente para os microrganismos, mas também encorajou uma certa seleção entre eles. A suplementação orgânica do solo promoveu alguma reversibilidade nos efeitos causados pelos agrotóxicos.

Da mesma forma, como já descrito para herbicidas e fungicidas, não há uma conclusão definitiva sobre o efeito dos inseticidas sobre os microrganismos e, consequentemente, sobre as transformações de nutrientes no solo, uma vez que os diferentes grupos de inseticidas exibem variações em sua toxicidade (SIMON SYLVESTER & FOURNIER, 1979; DAS & MUKHERJEE, 2000; DAS *et al.*, 2005).

A aplicação do inseticida forato aumentou a mineralização de C orgânico no solo, o conteúdo de N total, a desnitrificação e a mineralização microbiana de N orgânico no solo (MURTHY *et al.*, 1991). Já para Das & Mukerjee (1998), a influência estimulatória do forato e carbofurano na mineralização microbiana do N orgânico influenciou a redução significativa do conteúdo de N total, a qual foi mais pronunciada com forato (17,9%) seguida por carbofurano (14%). A mineralização de N, resultou em maior aumento na quantidade de NH_4^+ e NO_3^- no solo, sendo o aumento mais pronunciado para o primeiro com forato e carbofurano após 15 e 30 dias, respectivamente, enquanto ambos os inseticidas registraram um incessante aumento em NO_3^- no final do experimento. Isto indica que os inseticidas, provavelmente estimularam o crescimento e a atividade de microrganismos amonificadores e nitrificadores que, por sua vez, liberaram grandes quantidades de N mineral no solo (DAS & MUCKHERJEE, 1994). Em geral, o solo retém maior quantidade de NH_4^+ do que NO_3^- , indicando que os processos de amonificação foram mais rápidos do que o de nitrificação. Entre os dois inseticidas, o forato liberou maior quantidade de N mineral do que o carbofurano.

A incorporação dos inseticidas também trouxe aumento significativo na disponibilidade de P solúvel, em razão da maior estimulação das atividades dos microrganismos solubilizadores/mineralizadores de fosfato no solo. Entre os dois inseticidas, o forato liberou maior quantidade de P disponível, quando comparado ao carbofurano (DAS & MUKHERJEE, 1998).

Os fatores naturais e antropogênicos podem afetar também, direta ou indiretamente, as atividades enzimáticas no solo. As enzimas contribuem para a

atividade biológica total do ambiente solo-planta e ajudam os microrganismos do solo em seus esforços para satisfazer suas necessidades nutricionais e a degradação e humificação do material orgânico, principalmente os originários dos polímeros vegetais presentes no solo (KISS *et al.*, 1986; LÄDESMÄKI, & PIISPANEN, 1988 e 1992). Elas catalisam várias reações nos próprios organismos vivos e na fase aquosa do material orgânico do solo, e esta eficiência catalítica pode ser influenciada pela composição do meio circundante, no qual elas agem como catalizadores.

O comportamento das diferentes atividades enzimáticas do solo, na presença de agrotóxicos, é variável e, apesar dos relatos sobre o efeito destes compostos bem revisado e sumarizado por Schaffer (1993), e os esforços realizados para encontrar inter-relações confiáveis entre os efeitos medidos e as propriedades dos solos, características dos agrotóxicos e/ou classes das enzimas, não há conclusões gerais. São freqüentemente relatados resultados contraditórios e algumas vezes confusos sobre a ação de um agrotóxico na atividade de certas enzimas. Por exemplo, a adição de glifosato e paraquate ativaram as atividades da invertase e urease em alguns solos, mas inibiram a atividade da fosfatase (de 5 a 98%) (SANNINNO & GIANFREDA, 2001). No entanto, outros trabalhos demonstraram que o glifosato não afeta as atividades da fosfatase e da urease (DAVIES & GREAVES, 1981; LETHBRIDGE *et al.*, 1981), mas estimula a atividade da invertase (TU, 1982; GIANFREDA *et al.*, 1995).

A inibição da fosfatase pelo glifosato (SANNINNO & GIANFREDA, 2001), poderia ser atribuída à presença do grupo fosfórico na molécula do herbicida. Vários trabalhos já demonstraram que a fosfatase do solo é fortemente inibida pelo fosfato inorgânico e fertilizante fosfatado (SPEIR & ROSS, 1978; DICK, 1997).

Já o herbicida atrazina inibiu a atividade da invertase, quando comparado aos efeitos do metanol, porém, para urease, teve efeito consistente de ativação (61 a 10,217%) apenas com metanol e/ou para a mistura do agrotóxico com metanol (SANNINNO & GIANFREDA, 2001). Este efeito pode ser explicado pelo aumento significativo na permeabilidade da célula ou pela lise celular, e consequentemente aumento na acessibilidade das moléculas do substrato para a urease intracelular (GIANFREDA *et al.*, 1994). Resultados contraditórios foram observados para a fosfatase.

Já a aplicação de fungicidas, como o captam, inibiu as atividades da urease desidrogenase e fosfatase, proporcionalmente às doses aplicadas. Os diferentes níveis de inibição foram, aparentemente, decorrentes do fenômeno adsorção/dessorção e também ao efeito dos compostos e/ou seus metabólitos formados durante a incubação dos solos (PARAMA *et al.*, 1997). Da mesma forma, a adição de metalaxil e fenarimol afetou negativamente a atividade da desidrogenase, mas não demonstrou efeito adverso sobre a hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) e atividade enzimática da fosfatase. Foi observado que o fenarimol foi mais tóxico que o metalaxil e que o efeito de ambos foi transitório no solo (SILVA *et al.*, 2005).

Resultados semelhantes, isto é, efeitos dependentes da dose, foram obtidos para os inseticidas organofosforados monocrotofós e quinalfós e para os piretróides sintéticos, cipermetrina e fenvalerato (RAGASWAMY *et al.*, 1994). A aplicação de quinalfós (acima de 5 kg ha⁻¹) ou monocrotofós (acima de 7,5 kg ha⁻¹) e cipermetrina

ou fenvalerato (acima de 10 kg ha⁻¹), aumentou a atividade da protease nos solos. No caso da desidrogenase, a aplicação dos inseticidas ao solo levou ao aumento inicial na atividade, mas ao final de cinco semanas de inculbação, este efeito não foi mais observado. Ao contrário, a aplicação de turbufós, triazofos, triclornato na concentração de 5 e 10 µg g⁻¹, em solo orgânico, inibiu inicialmente a atividade da desidrogenase, mas ao final de duas semanas apresentou um efeito estimulatório (TU, 1981). De forma semelhante, o carbaril na concentração de 10, 50 e 100 µg g⁻¹ inibiu a atividade da desidrogenase em solos suplementados com glicose (NARAYANA RAO, 1988), mas um aumento significativo foi associado às baixas concentrações de inseticidas piretróides (0,5 e 5 µg g⁻¹) (TU, 1980). Segundo Sannino & Gianfreda (2001), as metodologias disponíveis para estudo de enzimas não discriminam entre os vários componentes que contribuem para a atividade enzimática total do solo. Conseqüentemente, é particularmente difícil explicar a modificação na atividade enzimática em resposta a um determinado fator, ou estabelecer a relação causa-resposta entre o fator aplicado e a variação obtida na atividade.

Entre os trabalhos citados na literatura são escassos os que enfocam o efeito de reguladores de crescimento na microbiota do solo. Silva *et al.* (2003) demonstram que a aplicação do regulador paclobutrazol ao solo pode interferir na atividade microbiana requerendo observações constantes quanto ao funcionamento de grupos importantes de microrganismos responsáveis por processos chaves, como a ciclagem de nutrientes. Conforme mostrado pelos autores, a aplicação deste produto em solos agrícolas pode afetar tanto a atividade enzimática microbiana (como demonstrado pela desidrogenase) como mais especificamente os fungos, evidenciado pela atividade de hifas fúngicas e conteúdo de ergosterol do solo. Embora a aplicação de paclobutrazol, nas doses recomendadas, tenha mostrado efeitos mínimos nas propriedades biológicas do solo, a sua aplicação seqüenciada, ao longo de anos, deve ser considerada, principalmente em decorrência de sua alta persistência.

5. Considerações finais

Os ciclos biogeoquímicos e a adaptação dos microrganismos aos diferentes estresses do solo dependem da diversidade e das funções metabólicas da microbiota presente no solo. Portanto, no solo onde não há modificação em outros parâmetros químicos, um aumento numérico nas unidades formadoras de colônia de bactérias e fungos produzirá um desequilíbrio químico-biológico. Este se manifesta não somente em termos de população microbiana, mas também sobre a sua diversidade e altera o equilíbrio ecológico das interações entre populações e comunidades. A microbiota existente no solo que sofreu estresse ambiental, pode tolerar ou pode desenvolver mecanismos de resistência como a secreção de exopolissacarídeos, ativada por fatores desconhecidos no meio. O tipo de solo e suas características, bem como a climatologia, determinam a estrutura das populações microbianas e sua capacidade de responder ao impacto dos poluentes, como por exemplo, altas doses de substâncias tóxicas. O impacto ambiental na biologia do solo afeta fundamentalmente a biodiversidade e a sucessão das populações majoritárias de bactérias e fungos, mais do que a atividade

enzimática. As enzimas parecem manter, no solo que sofreu impacto ambiental, um nível de atividade básica. Normalmente, o aumento na atividade enzimática parece depender mais das características físico-químicas do nicho ecológico, onde os microrganismos residem, do que das características biológicas específicas do próprio solo. Atualmente, o solo sofre as consequências do super uso agrícola, levando à perda de nutrientes e estrutura e sua utilização para depósito de resíduos tóxicos. Esta intensificação de uso, com a acumulação de compostos, levam a uma série de modificações nas propriedades do solo, que tem repercussão na diversidade catabólica. Portanto, há necessidade de proteger e conservar o solo para assegurar as características físico-químicas e biológicas necessárias para manter o equilíbrio do sistema. Quando se fala em conceitos como qualidade, saúde, recuperação ou remediação dos solos, a atividade microbólica desta matriz tem um papel importante. Sob ela depende a dissipação de vários contaminantes e a estimulação da degradação de compostos orgânicos. Assim, é importante conhecer a atividade microbólica do solo quando se aplicam medidas de remediação ou quando se avalia o grau de desorganização do sistema solo.

Referências

- ABDEL-MALLEK, A.Y.; ABDEL-KADER, M.I.A.; OMAR, S.A. Effect of the herbicide fluazifop-butyl on fungal populations and activity in soil. *Water, Air and Soil Pollution*. v.86, p.151-157, 1996.
- ADRIANO, D.C. *Elements in the terrestrial environments*: biogeochemistry, bioavailability and risk of metals. New York: Springer, 2001. 866p.
- ALEXANDER, M. *Introduction to soil microbiology*. 2. ed. New York: Wiley, 1977. 225p.
- ALEXANDER, M.; SCOW, K.M. Kinetics of biodegradation in soil. In: SAWHNEY, B.L.; BROWN, K. *Reactions and movement of organic chemicals in soil*. Madison: SSSA: ASA. 1989. p.243-269 (SSSA Special Publication, 22).
- ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*. v.3, p.1-9, 2001.
- ANDERSON, J.R. Pesticide effects on non-target soil microorganisms. In: HILL, J.R.; WRIGHT, L. (Ed.). *Pesticide microbiology*. New York: Academic Press, 1978. p. 313-533.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*. v.57, n.5, p.401-412, 2004.
- ATLAS, R.M.; HOROWITZ, A.; KRICHEWSKI, M.; BEJ, A.K. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology*. v.22, p.249-256, 1991.
- BAATH, E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. A review. *Water, Air, and Soil Pollution*. v.47, p.335-379, 1989.
- BAATH, E.; DIAZ-RAVINA, M.; FROSTEGARD, A.; CAMPBELL, C. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, p.238-245, 1998.
- BANERJEE, A.; BANERJEE, A.K. Influence of captan on some microorganisms and microbial process related to the nitrogen cycle. *Plant and Soil*. v.102, p.239-246, 1987.
- BANU, N.A.; SINGH, B.; COPELAND, L. Influence of copper on soil microbial biomass and biodiversity in some NSW soils. In: AUSTRALIAN NEW ZEALAND SOILS CONFERENCE, 3., 2004, Sidney. *SuperSoil 2004*. Sidney: University of Sydney, 2004. 1 CD-ROM. Disponível em: www.regional.org.au/au/asssi
- BARAN, S.; BIELINSKA, J.; OLESZCZUK, P. Enzymatic Activity in an airfields soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma*. v.18, n.3-4, p.221-232, 2004.
- BEZDICEK, D.F.; PAPENDICK, R.I.; LAL, R. Importance of soil quality to health and sustainable land management. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (Ed.). *Methods for assessing soil quality*. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p.1-8.

- BJORNLUND, L.; EKELUND, F.; CHRISTENSEN, S.; JACOBSEN, C.S.; KROGH, P.H.; JOHSEN, K. Interactions between saprotrophic fungi, bacteria and Protozoa on decomposing wheat roots in soil influenced by the fungicide fenpropimorph [Corbel (R)]: a field study. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.967-975, 2000.
- BOLDT, T.S.; JACOBSEN, C.S. Different toxic effects of the sulphonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. **FEMS Microbiology Letters**, v.161, p.29-35, 1998.
- BOLLAG, J.M.; BARABASZ, W. Effect of heavy metals on the denitrification process in soil. **Journal of Environmental Quality**, v.8, p.196-201, 1979.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v.74, p.63-67, 2000.
- BOUMA, C.L.; REIZER, J.; REIZEER, A.; ROBRISH, S.A.; THOMPSON, J. 6-phospho-alpha-D-glucosidase from *Fusobacterium mortiferum*: cloning, expression, and assignment to family 4 of the glycosylhydrolases. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.4129-4137, 1997.
- BROOS, K.; BEYENS, H.; SMOLDERS E. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.573-579, 2005.
- BROWN, P.E.; MINGES, G.A. The effect of some manganese salts on ammonification and nitrification. **Soil Science**, v.1, p.67-85, 1916.
- BRYNHILDSEN, L.; LUNDGREN, B.V.; ALLARD, B.; ROSSWALL, T. Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1689-1693, 1988.
- BUCKLEY, D.H.; SCHMIDT, T.M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, v.5, n.6, p.441-452, 2003.
- BURAUEL, P.; BABMANN, F. Soils as filter and buffer for pesticides – experimental concepts to understand soil functions. **Environmental Pollution**, v.133, p.11-16, 2005.
- BURAUEL, P.; WAISS, A.; FUHR, F. Soil-bound residues. In.: FUHR, F.; HANCE, R.J.; PLIMMER, J.R.; NELSON, J.O. (Ed.). **The lysimeter concept**. Washington: American Chemical Society, 1998. p.177-188. (ACS Symposium Series, 699).
- CAMPBELL, J.I.A.; JACOBSEN, C.S.; SÆRENSEN, J. Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.18, p.51-62, 1995.
- CARAVACA, F.; RÓLDAN, A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. **Geoderma**, v.117, p.53-61, 2003.
- CERNIGLIA, C.E.; MILLER, D.W.; YANG, S.K.; FREEMAN, J.P. Effects of a fluoro substituent on the fungal metabolism of 1-fluoronaphthalene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.2, p.294-300, 1984.
- CHANDER, K.; BROOKS, P.C.; HARDING, S.A. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.1409-1421, 1995.
- CHEN, S.-K.; EDWARDS, C.A.; SUBLER, S. Effects of fungicides benomil, captan and chlorothalomil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.1971-1980, 2001a.
- CHEN, S.-K.; EDWARDS, C.A.; SUBLER, S. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. **Applied Soil Ecology**, v.18, p.69-82, 2001b.
- CHEW, I.; OBBARD, J.P.; STANFORTH, R.R. Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals. **Environmental Pollution**, v.111, p.367-375, 2001.
- COLEMAN, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysiology and Biomolecular Structure**, v.21, p.441-483, 1992.
- DAS, A.C.; MUKHERJEE, D. Effect of insecticides on the availability of nutrients, nitrogen fixation, and phosphate solubility in the rhizosphere soil of rice. **Biology and Fertility of Soils**, v.18, p.37-41, 1994.
- DAS, A.C.; MUKHERJEE, D. Persistence of phorate and carbofuran in relation to their effect on the mineralization of C, N and P in alluvial soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.61, p.709-715, 1998.
- DAS, A.C.; MUKHERJEE, D. Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. **Applied Soil Ecology**, v.14, p.55-62, 2000.
- DAS, A.C.; CHAKRAVARTY, A.; SEN, G.; SUKUL, P.; MUKHERJEE, D. A comparative study on the didipation and microbial metabolism of organophosphate and carbamate insecticides in orchard and fluvaquent soils of West Bengal. **Chemosphere**, v.58, p.579-584, 2005.
- DAVIES, H.A.; GREAVES, M.P. Effects of some herbicides on soil enzymes activities. **Weed Research**, v.21, p.205-209, 1981.

- DICK, R.P. Soil enzymes activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, B.M.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. (Ed.). **Biological indicators of soil health**. Wallingford: CAB International, 1997. p.127-156.
- DOELMAN, P. Resistance of soil microbial communities to heavy metals. In: JENSEN, V.; KJOLLER, A.; SORENSEN, C.H. (Ed.). **Microbial communities in soil**. London: Elsevier, 1986. p.369-398.
- DONECHE, B.; SEGUIN, G.; RIBEREAU-GAYON, P. Mancozeb effect on soil microorganisms and its degradation in soil. **Soil Science**, v.135, p.361-366, 1983.
- DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W. (Ed.). Defining soil quality for sustainable environment. Madison: SSSA; ASA, 1994. p.30-23. (SSSA Special Publication, 35).
- DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.3-11, 2000.
- DU PLESSIS, K.R.; BOTHA, A.; JOUBERT, L.; BESTER, R.; CONRADIE, W.J.; WOLFAARDT, G.M. Response of the microbial community to copper oxychloride in acidic sandy loam soil. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.901-909, 2005.
- DVORNIKOVA, T.P.; GRANATSKAYA, T.A.; FINKELSHTEIN, Z.I.; TOLOCHKINA, S.A.; PESTEREVA, N.S.; NESHINSKII, A.A. Behavior of Ridomil in soil and its effect on soil microflora. **Agrokhimiya**, v.11, p.116-118, 1988.
- DZOMBACK, D.A.; LUTHY, R.G. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. **Soil Science**, v.137, p.292-308, 1984.
- EDWARDS, C.A. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. **European Journal of Soil Biology**, v.38, p.225-231, 2002.
- EDWARDS, C.A.; BATER, J.E. An evaluation of laboratory and field studies for the assessment of the environmental effects of pesticides. In: **Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases**, v.8C-3, p.963-968, 1990.
- EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. The effect of toxic chemicals on earthworms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.125, p.23-99, 1992.
- EDWARDS, C.A.; THOMPSON, A.R. Pesticides and the soil fauna. **Residue Reviews**, v.45, p.1-79, 1973.
- EHSCHMITT, K.; GRIFFITHS, B.S. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. **Applied Soil Ecology**, v.10, p.201-215, 1998.
- EL FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16SrRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.982-988, 1999.
- ELLIS, R.J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. Cultivation-dependent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.3223-3230, 2003.
- ENGELEN, B.; MEINKEN, K.; VON WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H.P.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2814-2821, 1998.
- FAY, E.F.; SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F. Degradção do fungicida clorotalonil por *Arthrobacter* spp. **Fitopatologia Brasileira** (in press).
- FINE, P.; GRABBER, E.R.; YARON, B. Interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic process. **Soil Technology**, v.10, p.133-153, 1997.
- FINKELSTEIN, Z.I.; GOLOVLEVA, L.A. effect of regular application of pesticides on nitrogen bacteria. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v.143, p.453-456, 1988.
- FLIEBACH, A.; REBER, H.H. Effects of long term sewage sludge applications on soil microbial parameters. In: HALL, J.E.; SAUERBECK, D.R.; L'HERMITE, P. (Ed.). **Effects of organic contaminants in sewage sludge on soil fertility, plants and animals**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Community, 1992. p.184-192. (Document EUR 14236).
- FLIEBACH, A.; MARTENS, R.; REBER, H.H. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1201-1205, 1994.
- FRANZLUEBERS, A.J.; ARSHAD, M.A. Soil microbial biomass and mineralizable carbon of water-stable aggregates. **Soil Science Society of American Journal**, v.4, p.1090-1097, 1997.
- FRITZE, H.; PERKIOMAKI, J.; SAARELA, U.; KATAINEN, R.; TIKKA, P.; YRJALA, K.; KARP, M. Effect of Cd-containing wood ash on the microflora of coniferous forest humus. **FEMS Microbiology Ecology**, v.32, p.43-51, 2000.

- GEVAO, B.; SEMPLE, K.T.; JONES, K.C. Bound pesticide residues in soils: a review. **Environmental Pollution**, v.108, p.3-14, 2000.
- GEVAO, B.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T.; CRAVEN, A.; BURAUER, P. Nonextractable pesticide residues in soil. **Environmental Science and Technology**, v.1, p.139-144, 2003.
- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.M. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: STOTSKY, G.; BOLLAG, J.M. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. v.9, p.123-193.
- GIANFREDA, L.; SANNINO, F.; ORTEGA, N.; NANNIPIERI, N. Activity of free and immobilized urease in soil: effects of pesticides. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.777-784, 1994.
- GIANFREDA, L.; SANNINO, F.; VIOLANTE, A. Pesticide effects on activity of free, immobilized and soil invertase. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.1201-1208, 1995.
- GILLER, K.E.; McGRATH, S.P.; HIRSCH, P.R. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.841-848, 1989.
- GILLER, K.E.; WITTER, E.; McGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1389-1414, 1998.
- GRIFFITHS, B.S.; DIAZ-RAVINA, M.; RITZ, K.; McNICOL, J.W.; EBBLEWHITE, N.; BAATH, E. Community DNA hybridisation and %G+C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.24, p.103-112, 1997.
- GROSSER, R.J.; FRIEDRICH, M.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2695-2702, 2000.
- HAANSTRA, L.; DOELMAN, P. An ecological dose-response model approach to short-and long-term effects of heavy metals on arylsulphatase activity in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p.18-23, 1991.
- HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, F.M.; ZUBERER, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, v.48, p.89-93, 2000.
- HARMSEN, J. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. In: OLFENBUTTEL, R.F.H. (Ed.). **On-site bioremediation process for xenobiotic and hydrocarbons treatment**. Stoneham: Butterworth-Hetmann, 1991. p.255-272.
- HARRIS, P.A.; SCHOMBERG, H.H.; BANKS, P.A.; GIDDENS, J. Burning, tillage and herbicide effects on the soil microflora in a wheat-soybean double-crop system. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, n.2, p.153-156, 1995.
- HART, M.R.; BROOKES, P.C. Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. **Soil Biology and Biochemistry**, v.12, p.1641-1649, 1996.
- HATTORI, H. Influence of heavy metals on soil microbial activities. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.38, p.93-100, 1992.
- HOLM, L.; SANDER, C. An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. **Protein**, v.28, p.72-82, 1997.
- HU, S.J.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; GRÜNWALD, N.J. Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue amended soil. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.21-30, 1999.
- INGHAM, E.R. Review of the effects of 12 selected biocides on target and non-target soil organisms. **Crop Protection**, v.4, p.3-32, 1985.
- INGRAM, E.R.; PARMELEE, R.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY JR., D.A. Reduction of microbial and faunal groups following application of streptomycin and captan in Georgia no-tillage agroecosystems. **Pedobiology**, v.35, p.297-304, 1991.
- KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.8, p.2059-2067, 2000.
- KANALY, R.A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; HARAYAMA, S. Rapid mineralization of benzo [a] pyrene by a consortium growing on diesel fuel. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4205-4211, 2000.
- KANDELER, E.; KAMPICHLER, C.; HORAK, O. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, p.299-306, 1996.
- KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, n.1, p.65-76, 1999.
- KHAN, M.; SCULLION, J. M. Microbial activity in grassland soil amended with sewage sludge containing varying rates and combinations of Cu, Ni and Zn. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.202-209, 1999.
- KISS, S.; DRAGAN-BULARDA, M.; PASCA, D. Acitivity and stability of enzyme molecules following their contact with clay mineral surfaces. **Studia Universitaria Babes-Bolyai. Biologia**, v.31, p.3-19, 1986.

- KNIGHT, B.; McGRATH, S.P.; CHAUDRI, A.M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper or zinc. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.39-43, 1997.
- KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p.197-212, 2001.
- KUNITO, T.; NAGAOKA, K.; TADA, M.; SAEKI, K.; SENOO, K.; OYAZU, H.; MATSUMOTO, S. Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.43, p.709-717, 1997.
- LACEY, J. Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: SYKES, G.; SKINNER, F.A. (Ed.). **Actinomycetales: characteristics and practical importance**. London: Academic Press, 1973. p.231-251.
- LÄHDESMÄKI, P.; PIISPAANEN, R. Degradation products and the hydrolytic enzyme activities in the soil humification process. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.287-292, 1988.
- LÄHDESMÄKI, P.; PIISPAANEN, R. Soil enzymology: Role of protective colloid systems in the preservation of exoenzyme activities in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.11, p.1173-1177, 1992.
- LAKZIAN, A.; MURPHY, P.; TURNER, A.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.519-529, 2002.
- LANDI, L.; RENELLA, G.; MORENO, J.L.; FALCHINI, L.; NANNIPIERI, P. Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-, D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity microbial biomass ratio under laboratory conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v.32, p.8-16, 2000.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v.54, p.305-315, 1990.
- LETHBRIDGE, G.; BULL, A.T.; BURNS, R.G. Effects of pesticides on 1,3- β -glucanase and urease activities in soil in the presence and absence of fertilizers, lime and organic materials. **Pesticide Science**, v.12, p.147-155, 1981.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH, B.; SMRECZAK, B. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. **Environment International**, v.28, p.719-728, 2003.
- MALISZEWSKA, W.; DEC, S.; WIERZBICKA, H.; WOZNIAKOWSKA, A. The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil micro-organisms. **Environmental Pollution**, v.37, p.195-215, 1985.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.462-468, 1997.
- MARGESIN, R.; WALDER, G.; SCHINNER, F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbon) on enzyme activities and microbial properties of soil. **Acta Biotechnologica**, v.20, p.313-333, 2000a.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v.40, p.339-346, 2000b.
- MARIN, J.A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on microbial activity. **Environmental Research**, v.98, p.185-195, 2005.
- MÄRTENSSON, A.M. Effect of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.435-445, 1992.
- MARTINEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERÓN, V.; RODELAS, B.; POZO, C.; GONZÁLEZ-LOPEZ, J. Effects of fungicide captan on some groups of soil microflora. **Applied Soil Ecology**, v.7, p.245-255, 1998.
- MATHUR, S.P.; SANDERSON, R.B. The partial inactivation of degradative enzymes by residual fertilizer copper in Histosols. **Soil Science Society of America Journal**, v.44, p.750-755, 1980.
- McGRATH, S.P.; BROOKES, P.C.; GILLER, K.E. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.415-424, 1988.
- MEGHARAJ, M.; SINGLETON, I.; MCCLURE, N.C.; NAIDU, R. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.38, p.439-445, 2000.
- MINNICH, M.M.; McBRIDE, M.B. Effect of copper activity on carbon and nitrogen mineralization in field-aged copper-enriched soils. **Plant and Soil**, v.91, p.231-240, 1986.
- MOHN, W.W.; STEWART, G.R. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Artic soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1161-1172, 2000.

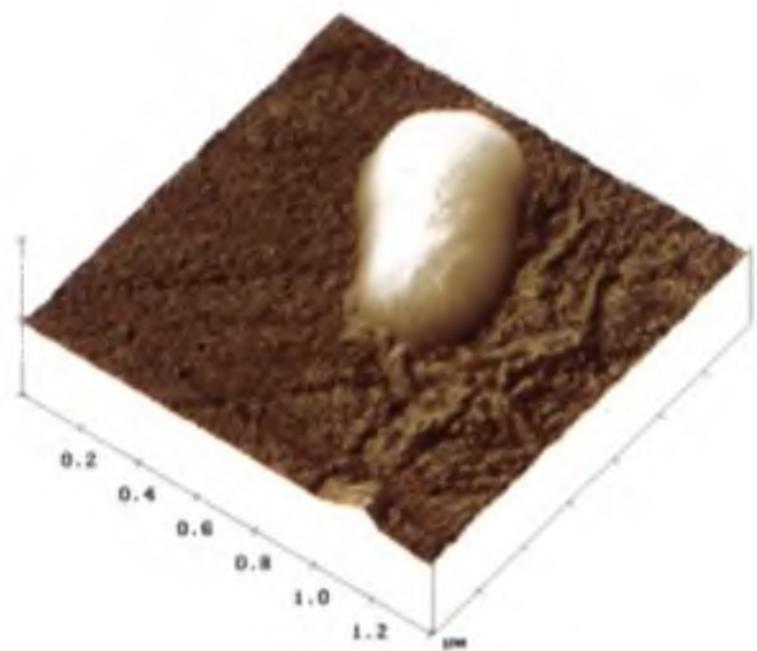
- MONKIEDJE, A.; ILORI, M.O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxil to a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.1939-1948, 2002a.
- MONKIEDJE, A.; SPITELLER, M. Effects of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxil on the microbial properties of a sandy loam and a sandy clay soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.393-398, 2002b.
- MOORMAN, T.B.; DOWLER, C.C. Herbicide and rotation effects on soil and rhizosphere microorganisms and crop yields. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.35, p.311-325, 1991.
- MORENO, J.L.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Effects of cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.230-237, 1999.
- MORENO, J.L.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. **European Journal of Soil Science**, v.54, p.377-386, 2003.
- MURPHY, D.V.; SPARLING, G.P.; FILLERY, I.R.P. Stratification of microbial biomass C and N and gross mineralization with soil depth in two contrasting Western Australian agricultural soils. **Australian Journal of Soil Research**, v.36, p.45-55, 1998.
- MURTHY, N.B.K.; KALE, S.P.; RAGHU, K. Mineralization of ¹⁴C-labelled rice straw in aerobic and anaerobic clay soils as influenced by insecticide treatment. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.857-859, 1991.
- NANNIPIERI, P. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA V.V.S.R.; GRACE, P.R. (Ed.). **Soil biota management in sustainable farming systems**. Melbourne: CSIRO Publications, 1994. p.238-244.
- NARAYANA RAO, V.V.S. Effects of pesticides on ammonification. In: LAL, R. (Ed.). **Pesticides and nitrogen cycle**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.2, p.2-41.
- OBARD, J.P.; JONES, K.C. The use of the cotton-strip assay to assess cellulose decomposition in heavy metal-contaminated sewage sludge-amended soils. **Environmental Pollution**, v.81, p.173-178, 1993.
- OLSON, B.M.; LINDWALL, C.W. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effects of 2,4-D and glyphosate. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.1071-1075, 1991.
- OVERCASH, M.R.; PAL, D. **Design of land treatment system for industrial wastes: theory and practice**. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 1979. p.159-219.
- PARAMA, V.R.R.; NAGARAJA, M.S.; SIDDARAMAPPA, R. Mineralization of urea-N and some soil enzymes in three captan treated soils. **Pesticide Research Journal**, v.9, n.2, p.169-174, 1997.
- PATNAIK, G.K.; KANUNGO, P.K.; MOORTHY, B.T.S.; MAHANA, P.K.; ADHYA, T.K.; RAO, V.R. Effect of herbicides on nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) associated with rice rhizosphere. **Chemosphere**, v. 30, p.339-343, 1995.
- PENNANEN, T.; FROSTEGARD, A.; FRITZE, H.; BAATH, E. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.420-428, 1996.
- PICCOLO, A.; CONTE, P.; SCHEUNERT, I.; PACI, M. Atrazine interactions with soil humic substances of different molecular structure. **Journal of Environmental Quality**, v.27, p.1224-1333, 1998.
- PIERCE, F.J.; LARSON, W.E. Developing criteria to evaluate sustainable land management. In: KIMBLE, J.M. (Ed.). **Utilization of soil survey information for sustainable land use: Proceedings of the VIII International Soil Management Workshop**, 1993, Sacramento. p.7-14.
- PIGNATELLO, J.J.; XING, B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. **Environmental Science and Technology**, v.30, p.1-11, 1996.
- PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CYCÓN, M.; KOZDRÓJ, J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavy polluted soil and mine spoil. **Applied Soil Ecology**, v.28, p.237-246, 2005.
- RAMOS, M.L.G.; RIBEIRO, W.O.J. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v.152, p.145-150, 1993.
- RANGASWAMY, V.; REDDY, B.R.; VENKATESWARLU, K. Activities of dehydrogenase and protease in soil as influenced by monocrotophos, quinalphos, cypermethrin and fenvalerate. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, v.47, p.319-326, 1994.
- RATH, A.K.; RAMAKRISHNAN, A.K.; RATH, S.; KUMARASWAMY, K.; BHARATY, P.S.; SETHUNATHAN, N. Effect of pesticides on microbial biomass of flooded soil. **Chemosphere**, v.37, p.661-671, 1998.
- RATHBONE, K.; FUCHS, J.; ANDERSON, K.; KARTHIKEYAN, R.; NURHIDAYAT, N. Effects of PAHS on microbial activity and diversity in freshly contaminated and watered soils. In: CONFERENCE ON HAZARDOUS WASTE RESEARCH, 1998, Honolulu. **Proceedings...** Honolulu, 1998. p.338-342.

- RAY, R.C.; RAMAKRISHNA, C.; SETHUNATHAN, N. Nitrification inhibition in a flooded soil by hexachlorocyclohexane and carbofuran. **Plant and Soil.** v.56, p.165-168, 1980.
- REBECHI, L.; SABATINI, M.A.; CAPPI, C.; GRAZIOSO, P.; VICARI, A.; DINELLI, G.; BERTOLINI, D. Effects of a sulphonylurea herbicide on soil microarthropods. **Biology and Fertility of Soils.** v.30, p.312-317, 2000.
- REEVES, D.W. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. **Soil and Tillage Research.** v.433, p.131-167, 1997.
- RENELLA, G.; REYES ORTIGOZA, A.L.; LANDI, L.; NANNIPIERI, P. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED_{50}). **Soil Biology and Biochemistry.** v.35, p.1203-1210, 2003.
- RENELLA, G.; MENCH, M.; LANDI, L.; NANNIPIERI, P. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry.** v.37, p.133-139, 2005a.
- RENELLA, G.; MENCH, M.; GELSOMINO, A.; LANDI, L.; NANNIPIERI, P. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. **Soil Biology and Biochemistry.** v.37, p.1498-1506, 2005b.
- REVELLIN, C.; CANSON, B. de; CATROUX, G. Effect of a mixture of chlorpyrifos and lindane on the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean (*Glycine max* (L.) Merril). **Pesticide Science.** v.36, p.69-74, 1992.
- ROANE, T.M. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils. **Microbial Ecology.** v.37, p.218-224, 1999.
- ROANE, T.M.; PEPPER, I.L. Microorganisms and metal pollutants. In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. (Ed.). **Environmental microbiology.** San Diego: Academic Press, 2000. p.403-423.
- ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Sequestration of DDT and dieldrin in soil: disappearance of acute toxicity but not the compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v.17, n.6, p.1034-1038, 1998.
- ROUCH, D.A.; LEE, B.T.D.; MORBY, A.P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Indian Microbiology.** v.14, p.132-141, 1995.
- SANFORD, J.O. Straw and tillage management practices in soybean-wheat double cropping. **Agronomy Journal.** v.74, p.1032-1035, 1982.
- SANNINO, F.; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. **Chemosphere.** v.45, p.417-425, 2001.
- SAPOUNDJIEVA, K.; KOUZMANOVA, Y. **Pochnoznanie, Agrokhimiya; Rastitelna zakhita,** v.22, n.6, p.35-38, 1987.
- SCHÄFFER, A. Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G. (Ed.). **Soil biochemistry.** New York: Marcel Dekker, 1993. v.8, p.273-340.
- SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. **Methods in soil biology:** Springer laboratory manual. Berlin: Springer, 1996. 426p.
- SHETTY, P.K.; MAGU, S.P. Metalaxyl effect on nitrogenase activity (acetylene reduction) and yield of mungbean (*Vigna radiata* (L.) wilzek). **Journal of Environmental Biology.** v.19, n.2, p.141-144, 2001.
- SHULA, A.K.; MISHRA, R.R. Influence of herbicides on microbial population and enzyme activity in potato (*Solanum tuberosum*) – field soil. **Indian Journal of Agricultural Sciences.** v.67, n.12, p.610-611, 1997.
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente,** v.15, p.93-104, 2005.
- SILVA, C.M.M.S.; VIEIRA, R.F.; FAY, E.F.; OLIVEIRA, C. DE S. Efeito do paclobutrazol sobre a microbiota do solo. In: SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Impacto ambiental do regulador de crescimento paclobutrazol.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. (Documentos).
- SIMON-SYLVESTRE, G.; FOURNIER, J.C. Effects of pesticides on the soil microflora. **Advances in Agronomy.** v.31, p.1-92, 1979.
- SMRECZEK, B.; MALISZEWSKA-KORDYBUCH, B.; MARTYNIAK, S. Effect of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. In: BAVEYE, P.; BLOCK, J.C.; GONCHARUK, V.V. (Ed.). **Bioavailability of organic xenobiotics in the environment.** Dordrecht: Kluwer, 1999. p.377-380.
- SONG, H.G.; BARTHA, R. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. **Applied and Environmental Microbiology.** v.56, p.646-651, 1990.
- SPEIR, T.W.; ROSS, D.F. Soil phosphatase and sulphatase. In: BURNS, R.G. (Ed.). **Soil enzymes.** London: Academic Press, 1978. p.197-250.
- STRINGFELLOW, W.T.; ALVAREZ-COHEN, L. Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. **Water Research.** v.33, n.11, p.2535-2544, 1999.
- THIRUP, L.; EKELUND, F.; JOJNSEN, K.; JACOBSEN, K. Population dynamics of the fast-growing sub-populations of *Pseudomonas* and total bacteria, and their protozoan grazers, revealed by fenpropimorph treatment. **Soil Biology and Biochemistry.** v.32, p.1615-1623, 2000.

- TORSTENSSON, L. Behavior of glyphosate in soils and its degradation. In.: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.137-150.
- TU, C.M. Influence of five pyrethroid insecticides on microbial population and activity in soil. **Microbial Ecology**, v.5, p.321-327, 1980.
- TU, C.M. Effects of pesticides on activities of enzymes and microorganisms in a clay soil. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B16, p.179-191, 1981.
- TU, C.M. Influence of pesticides on activities of invertase, amylase and level of adenosine triphosphate in organic soil. **Chemosphere**, v.11, p.909-914, 1982.
- TU, C.M. Effect of fungicides, captafol and chlorothalonil, on microbial and enzymatic activities in mineral soil. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B28, p.67-80, 1993.
- USATAYA, A.S.; MERENYUK, G.V.; KATRUK, E.A. Biological activity of vineyard soils under the application of fungicides. **Bulletin Acad. Stiint Repub. Moldova Stiint Biol. Chim.**, v.6, p.40-42, 1993.
- VAN BEELEN, P.V.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediments. **Chemosphere**, v.43, p.455-499, 1997.
- VIEIRA, R.F.; SILVA, C.M.M.S.; MAIA, A.H.N.; FAY, E.F. An appraisal of five methods for the measurements of the fungal population in soil treated with chlorothalonil. **Pest Management Science**, v.56, p.431-440, 2000.
- VYAS, S.C. **Non-target effects of agricultural fungicides**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.258-268.
- WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**, v.122, p.21-28, 1990.
- WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Influence of the herbicides 2,4-D and glyphosate on soil microbial biomass and activity: a field experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.185-186, 1992.
- WEBER, J.B.; BEST, J.A.; GONESE, J.U. Bioavailability and bioactivity of sorbed organic chemicals. In: LINN, D.M. (Ed.). **Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil**. Madison: American Society of Agronomy: Soil Science Society of America, 1993. p.153-196.
- WILD, S.R.; JONES, K.C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. **Environmental Pollution**, v.88, n.1, p.91-108, 1995.
- YANG, Y.; CHEN, Y.X.; TIAN, G.M.; ZHANG, Z.J. Microbial activity related to N cycling in the rhizosphere of maize stressed by heavy metals. **Journal of Environmental Science-China**, v.17, p.448-451, 2005.
- YEATES, G.W.; ORCHANRD, V.A.; SPEIR, T.W.; HUNT, J.L.; HERMANS, M.C.C. Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic and timber preservative on soil biological activity. **Biology and Fertility of Soils**, v.18, p.200-208, 1994.
- ZELLES, L.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. Side effects of some pesticides on non-target soil microorganisms. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B20, p.457-488, 1985.

*Microrganismos, Minerais
e Metais*

Oswaldo Garcia Jr. e Denise Bevilaqua



I. Introdução

Os microrganismos de uma maneira geral, estão largamente distribuídos em nosso planeta mesmo em ambientes de características extremas e presumivelmente adversas. Estão descritas e plenamente caracterizadas, espécies que vivem em temperaturas elevadas ou extremamente baixas, em altas concentrações salinas, submetidas a pressões elevadas, em valores extremos de pH (ácido ou básico), entre outros. A “Ecologia Microbiana” estuda a interrelação entre os microrganismos, plantas e animais no meio em que vivem, não só em ambientes, digamos normais, como também naqueles extremos citados acima.

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

Pode-se dizer que o estudo da associação de microrganismos e geologia (geomicrobiologia) começou no século passado com algumas descobertas marcantes que revelaram a participação de microrganismos em processos geoquímicos. Como destacado por Ehrlich (1981) e Rossi (1990), a descoberta da bactéria *Gallionella ferruginea* como agente responsável por depósitos ocres de ferro em pântanos, feita por C. S. Ehrenberg em 1838 pode ser considerada como o marco inicial dessa área da ciência.

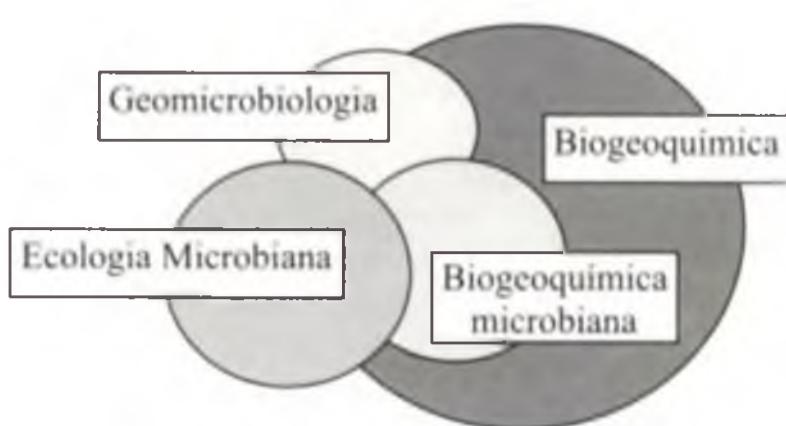


FIGURA 1. Diagrama de Venn-Euller mostrando a relação entre várias áreas envolvendo microrganismos e a geoquímica.

Conforme citado também por esses autores, um destaque especial deve ser dado aos estudos de microbiologia de solo realizados no final do século passado pelo microbiologista russo S. N. Winogradsky. As evidências que o mesmo obteve sobre a oxidação do H₂S e deposição de enxofre elementar na bactéria filamentosa *Beggiatoa* sp. e sobre a oxidação de FeCO₃, a óxido férrico pela espécie *Leptothrix ochracea*, levaram-no a formulação

do modo **quimiolitolítico** de vida. Isto é, os organismos quimiolitolíticos obtêm energia para fixação do CO₂ atmosférico, através de reações de oxidação de compostos estritamente inorgânicos.

Nessa mesma época, o cientista Beijerinck descobria o processo bacteriano de redução do sulfato a enxofre elementar que associado ao processo de oxidação de H₂S, formaram o alicerce experimental da teoria da ativa participação de microrganismos na formação dos depósitos de enxofre na litosfera, a despeito da teoria “inorgânica da gênese dos depósitos de enxofre” ser predominante na época.

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

Desde então, um número enorme de trabalhos experimentais de natureza multidisciplinar envolvendo microbiologistas, geólogos, químicos e outros, vem consolidando e dando um contorno de ciência para a geomicrobiologia. Obviamente muitos processos ainda não estão completamente explicados, mas de qualquer forma muitos já estão elucidados, permitindo até o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento racional desses processos microbianos naturais.

2. Ciclos biogeoquímicos - O ciclo do enxofre

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

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

O termo **mineral** é usualmente definido como compostos inorgânicos, normalmente cristalinos, mas às vezes amorfos, com composição e estrutura definidas.

O carvão e o asfalto são considerados também minerais, porém são de origem orgânica. Os minerais inorgânicos podem ser simples como, por exemplo, o enxofre (S^0), mais complexos como a calcopirita ($CuFeS_2$) ou muito complexos como a biotita [$K(Mg, Fe, Mn)_3 AlSi_3O_{10} (OH)_2$].

As rochas e os minerais estão sendo constantemente intemperizados em maior ou menor intensidade, devido a ação de agentes físicos, químicos e biológicos (sobretudo pela ação dos microrganismos). Devido à natureza das rochas ígneas ou magmáticas, os microrganismos praticamente não tiveram participação na origem (formação) desse tipo de rocha. Entretanto, é inegável a sua participação ativa na formação e decomposição dos outros tipos de rochas e nos minerais. Os ciclos biogeoquímicos descrevem as conversões desses materiais, decorrentes da atividade bioquímica na biosfera. Os ciclos biogeoquímicos englobam as transformações físico-químicas, tais como dissolução, precipitação, volatilização e fixação, essencialmente através de reações de óxido-redução. Todos os organismos vivos participam desses ciclos, mas os microrganismos devido a sua quase onipresença e a diversidade de suas atividades metabólicas desempenham um papel central nos ciclos biogeoquímicos.

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

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

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

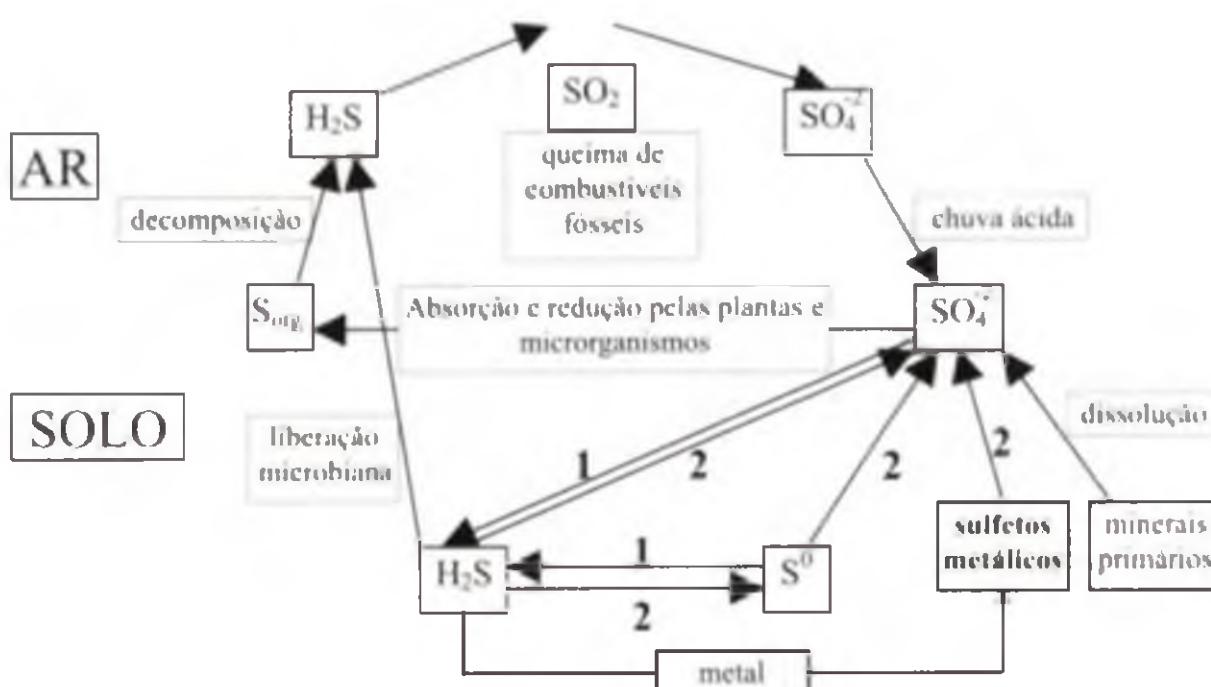


FIGURA 2. Esquema simplificado das transformações do enxofre na biosfera. 1 - redução por microrganismos; 2 - oxidação por microrganismos.

2.1 Redução biológica assimiladora do sulfato

Pode-se observar pela Figura 2 que o SO_4^{2-} presente no solo, é basicamente assimilado pelas plantas e microrganismos. Após sua assimilação por transporte ativo através das membranas desses organismos, o enxofre que está em sua forma mais oxidada [+6], sofre uma série de reações enzimáticas de redução para ser incorporado ao material celular na sua forma reduzida (GARCIA, 1992). Os passos dessas transformações têm sido estudados em várias espécies de microrganismos tais como *Escherichia coli*, *Salmonela typhimurium* e *Aspergillus niger*. Em linhas gerais o enxofre na forma de sulfato é reduzido inicialmente à sulfeto o qual reage com o aminoácido serina para formar o aminoácido sulfurado cisteína. Conforme Gottschalk (1979) pode-se resumir essa redução e incorporação do enxofre, segundo as reações mostradas abaixo:



Esse enxofre orgânico (S_{or}) que participa de várias moléculas biológicas, sobretudo na estrutura das proteínas (aminoácidos cisteína e metionina) é então liberado para a atmosfera como H_2S , por microrganismos decompositores da matéria orgânica morta.

2.2 Redução biológica não assimiladora de sulfato

Outra fonte importante da liberação de H_2S para a atmosfera, é a redução não assimiladora de sulfato por bactérias redutoras, tais como *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*. Essa redução não assimiladora ocorre praticamente em todo ambiente contendo sulfato e matéria orgânica na ausência de oxigênio; o sulfato é usado por esse tipo de microrganismo como o acceptor final de elétrons do processo

oxidativo da matéria orgânica. Uma vez na atmosfera, o sulfeto de hidrogênio se transforma em SO₂ (que também é liberado através da queima de combustíveis fósseis e tratamento pirometalúrgico de sulfetos metálicos) e depois retorna à superfície terrestre na forma da conhecida “chuva ácida”.

Uma outra característica que merece ser salientada na redução não assimiladora do sulfato é sua grande importância geológica, visto que o H₂S liberado pode reagir com os metais presentes nesse ambiente e formar depósitos de sulfetos metálicos. Como exemplo pode ser citado a formação de depósitos de pirita (FeS₂), cujos mecanismos estão bem caracterizados (ZEHNDER & ZINDER 1980); as reações mostradas a seguir, ilustram essa importante característica da redução não assimiladora de sulfato.



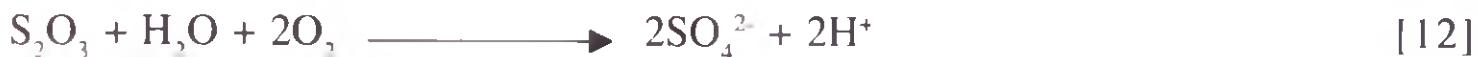
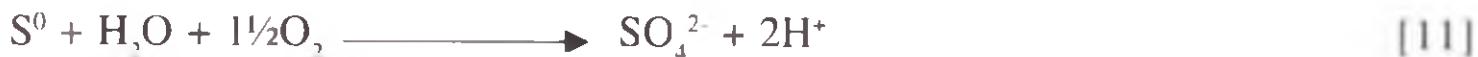
As duas reações foram realizadas em laboratório, mas a reação [8] parece ser a que ocorre mais comumente, pois as condições estão mais próximas daquelas encontradas na natureza. Como já destacado, se outros metais estiverem no microambiente onde a redução não assimiladora microbiana ocorre, haverá a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

2.3 Oxidação biológica de enxofre

Podem-se dividir as bactérias oxidantes de enxofre inorgânico em dois principais grupos: a) bactérias fototróficas e b) bactérias quimiolitotróficas. Dois gêneros constituem os representantes principais do primeiro tipo: *Chlorobium* e *Chromatium*, ou “bactérias verdes do enxofre” e “bactérias púrpuras do enxofre”, respectivamente. Essas bactérias realizam a fotossíntese na ausência de oxigênio (anaeróbios estritos), utilizando o H₂S como doador de elétrons para a realização do processo fotossintético. Desse processo resulta a formação de enxofre elementar (S⁰), o qual pode ser acumulado no interior celular (“bactéria púrpura”) ou excretado para o meio externo (“bactéria verde”). A equação abaixo mostra a reação de oxidação realizada por essas bactérias.



O segundo grupo de bactérias desenvolve suas reações de oxidação de formas reduzidas de enxofre inorgânico na presença de oxigênio, sendo, portanto, aeróbias estritas. Os compostos de enxofre mais comumente utilizados como fonte energética para o crescimento bacteriano são o H₂S, S⁰ e S₂O₃²⁻. As equações apresentadas a seguir mostram as reações de oxidação biológica desses compostos de enxofre:



Pode-se notar que um dos produtos finais das reações de oxidação dessas formas reduzidas de enxofre é o íon H^+ ; isso significa que nos ambientes onde tais reações se processam, o pH cai significativamente e o ambiente torna-se ácido. Em certas condições de cultivo em laboratório, a espécie *Thiobacillus thiooxidans*, reclassificada recentemente como *Acidithiobacillus* (KELLY & WOOD, 2000), oxida o S^0 e o pH do meio de cultura no final de 10 a 15 dias atinge cerca de 0,5 (GARCIA, 1991).

A heterogeneidade do gênero *Thiobacillus* foi destacada na primeira edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. No entanto, não havia informações disponíveis na época para se assegurar uma reclassificação segura desta espécie em um outro gênero, novo ou pré-existente. Desde então, novas técnicas como hidridização DNA-DNA e análise da seqüência genética por rRNA 16S foram desenvolvidas e forneceram ferramentas para se esclarecer e dissecar a infra-estrutura taxonômica das espécies atualmente classificadas como *Thiobacillus*, cujos membros estão dentro das sub-classes α , β e γ da classe *Proteobacteria*. As aplicações destas técnicas, juntamente com ferramentas taxonômicas tradicionais, levaram a transferência de seis espécies do gênero *Thiobacillus* para *Paracoccus* (antigamente *Thiobacillus versutus*), *Acidiphilum* (antigamente *Thiobacillus acidophilus*) e o novo gênero *Thiomonas* (antigos *Thiobacillus intermedius*, *Thiobacillus perometabolis*, *Thiobacillus thermosulfatus* e *Thiobacillus cuprinus*).

A segunda edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology traz na seção do *Thiobacillus* oito novas espécies de três novos gêneros redesignados por Kelly e Wood (2000). Estes gêneros são *Acidithiobacillus* (contendo *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* e *Acidithiobacillus albertensis*), *Halothiobacillus* (contendo *Halothiobacillus neapolitanus*, *Halothiobacillus halophilus* e *Halothiobacillus hydrothermalis*) e *Thermithiobacillus* (contendo *Thermithiobacillus tepidarius*).

As espécies de *Thiobacillus* reconhecidas atualmente exibem uma grande variação das condições físicas de crescimento, isto é, tolerância de pH numa faixa ao redor de 0 até 8,5 (com pH e temperaturas ótimas de < 2-8 e 20-50°C, respectivamente), variação do conteúdo G + C do DNA (50-68 mol %), diversidade de homologia do DNA e uma grande variação de ubiquinonas e ácidos graxos. Todos são pequenos, Gram-negativos, forma de bacilo ($0,3\text{-}0,5 \times 0,7\text{-}4,0 \mu\text{m}$), algumas espécies são móveis e apresentam flagelos; formas esporulantes não são conhecidas. A energia é derivada da oxidação de um ou mais compostos reduzidos de enxofre, incluindo sulfetos, enxofre, tiossulfato, politionatos e tiocianatos. Sulfato é o produto final da oxidação de compostos de enxofre, porém enxofre, sulfito e politionatos podem ser acumulados, algumas vezes transitoriamente, por muitas espécies. Algumas espécies podem obter energia pela oxidação de compostos orgânicos de enxofre ou pela oxidação do íon ferroso, como a espécie *A. ferrooxidans*. Todas as espécies podem fixar dióxido de carbono

pelo ciclo de Calvin-Benson e são capazes de crescimento autotrófico; algumas espécies são quimiolitotróficas obrigatórias, enquanto outras são capazes de crescer quimio-organotroficamente. O gênero atualmente inclui aeróbios obrigatórios e denitrificantes facultativos. Este grupo é extremamente heterogêneo se considerarmos as similaridades fisiológicas e genéticas. Aliás, o único critério histórico para a concentração de todas essas espécies dentro de um mesmo gênero, foi a capacidade destes bacilos de crescerem autotroficamente através da oxidação de substratos de enxofre inorgânico. A distribuição deste gênero é aparentemente ubíqua.

Existem outros exemplos clássicos de bactérias oxidantes de formas reduzidas de enxofre. Podem ser citados os gêneros *Beggiatoa*, *Sulfolobus*, *Sulfovibacillus*, *Halothiobacillus* e *Thermithiobacillus*, além de outras espécies do gênero *Acidithiobacillus*, tais como: *A. ferroxidans*, *A. caldus*, *A. albertensis*. Sem dúvida alguma, a maioria dos estudos com bactérias oxidantes de enxofre se concentra nas espécies do gênero *Acidithiobacillus*. Dentre essas espécies, merece um destaque especial o *A. ferroxidans*, pois essa espécie além de oxidar as formas reduzidas de enxofre, oxida ainda o íon ferroso (Fe^{2+}) e sulfetos metálicos em geral (KELLY e WOOD, 2000). Dessa forma, o *A. ferroxidans* participa da dissolução oxidativa dos sulfetos metálicos na natureza e essa característica tem sido usada industrialmente para recuperação de metais de interesse econômico em um processo chamado de “**lixiviação bacteriana de metais**”. Devido a sua importância econômica e ecológica, esse processo será discutido mais detalhadamente a seguir.

3. Lixiviação bacteriana de metais

3.1 Histórico

A recuperação de metais, especificamente do cobre de efluentes naturais de minas, isto é, de soluções produzidas “naturalmente” pelo contato de águas da própria mina ou de chuvas em caso de minas de céu aberto, foi provavelmente praticada há cerca de 1000 anos a.C. na região mediterrânea (BRIERLEY, 1982). Os chineses no século X e os europeus (norte da atual Hungria) no final do século XIV provavelmente já usavam esse processo, conforme documentação científica da época (ROSSI, 1990). Entretanto, o primeiro registro oficial da lixiviação natural de cobre em pilhas, data do século XVIII nas minas do rio Tinto na Espanha; tal processo é ainda aplicado até hoje nessa mina de cobre da Espanha. Nos EUA essa prática foi estabelecida no início deste século e é aplicada até hoje em estados do sudoeste norte-americano. A aplicação dessa técnica para recuperação de urânio foi posteriormente utilizada no Canadá, África do Sul, Portugal e Espanha (KARAVAIKO & GROUDEV, 1985).

Apesar de ser uma prática antiga e bastante utilizada, a participação ativa de microrganismos no processo de lixiviação natural, era totalmente desconhecida até a bem pouco tempo. A definitiva correlação entre a lixiviação natural de metais e a participação direta de bactérias no processo, foi estabelecida no final dos anos 40.

Através de experimentos elegantes, Colmer & Hinkle (1947), Colmer *et al.* (1950) e Temple & Colmer (1951) conseguiram isolar, purificar e caracterizar a bactéria *A. ferrooxidans*, responsável pela forte acidez e elevada concentração de metais em efluentes de minas de carvão nos EUA. Tal designação foi atribuída, e plenamente aceita, pela característica peculiar dessa bactéria, em oxidar tanto o enxofre elementar e outras formas reduzidas deste (sulfetos metálicos, por exemplo), como também o íon ferroso (Fe^{2+}). Após esses trabalhos pioneiros, inúmeros artigos foram publicados demonstrando o isolamento dessa espécie de águas ácidas de minas contendo sulfetos de cobre (BRYNER & JAMESON 1958; CORRICK & SUTTON 1961; RAZZELL & TRUSSELL, 1963). Nesses trabalhos foi evidenciada a ação oxidativa do *A. ferrooxidans* sobre os sulfetos de cobre, com a consequente solubilização do metal, e assim definitivamente correlacionada à decisiva participação bacteriana na lixiviação “natural” do cobre. Além disso, essa descoberta evidenciou a participação biológica na geração da chamada “Drenagem Ácida de Minas” ou, como é conhecida em inglês “Acid Mine Drainage”, um reconhecido problema ambiental presente em minas que contenham minerais sulfetados (JOHNSON & HALLBERG, 2003). A Figura 3 (COLORADO SCHOOL OF MINES, 2006) mostra uma ilustração dessa questão ambiental e as equações 11 e 14 ilustram as principais reações que ocorrem nesse ambiente.

3.2 O processo

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

Ao longo dos anos, o homem vem utilizando os bens minerais nas mais variadas atividades exercidas em nosso planeta pela espécie humana. Sabe-se que há cerca de 20 mil anos atrás, o homem já praticava uma metalurgia rudimentar. Na



FIGURA 3. Típica drenagem ácida de minas. O pH da solução em geral situa-se em torno de 2,0 e a tonalidade avermelhada é devido à alta concentração do íon férrico, resultado da oxidação bacteriana da pirita (FeS_2). A presença de outros metais também é uma constante nesses ambientes.

chamada idade do bronze, já se produzia uma liga de cobre e estanho. Calcula-se que os egípcios usavam aproximadamente 30 bens minerais. Atualmente são utilizados cerca de 300 bens minerais, dos quais 50 são metais.

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

Devido à busca incessante e à descoberta de novas aplicações dos minerais, o aumento da demanda mundial desses bens tornou-se inevitável. Dessa forma, tem-se verificado um progressivo esgotamento das reservas minerais contendo altos teores dos metais de interesse econômico, devendo-se salientar que tais recursos são, obviamente, não renováveis. Pelo método pirometalúrgico convencional, por exemplo, somente minérios de altos teores ou concentrados prévios são aproveitáveis, devido ao alto custo dessa técnica em função dos gastos excessivos de energia.

Atualmente entre 80 e 85% do cobre obtido no mundo é obtido através da pirometalurgia. No entanto, há 30 anos esta porcentagem era de praticamente 100%. Nesses anos, foram desenvolvidas diferentes tecnologias, mas que ainda não oferecem resultados economicamente comparáveis aos da pirometalurgia.

Dessa forma, torna-se imperioso o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de minérios contendo baixos teores do metal de interesse. O uso de técnicas hidrometalúrgicas vem merecendo crescente atenção dos técnicos e empresários do setor minero-metalúrgico. Na hidrometalurgia, soluções ácidas ou básicas são contactadas com o minério em condições apropriadas, causando a solubilização do metal desejado, o qual é então recuperado da solução. Ballester & Córdoba (2005) citam vários processos hidrometalúrgicos desenvolvidos recentemente e os agrupam em função do meio no qual se produz a oxidação do sulfeto: sulfato, sulfato-cloreto e cloreto (em alguns casos, junto com o íon cloreto pode aparecer também o brometo)

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

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

1. Economia de insumos utilizados em um processo hidrometalúrgico convencional (ácidos e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos à partir de substratos presentes no referido minério.
2. Baixo requerimento de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico, e B mesmo a um processo hidrometalúrgico em que se utilizam agitadores (lixiviação ácida agitada, por exemplo).
3. Baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional, devido à simplicidade das instalações requeridas na biohidrometalurgia.
4. Reduzida necessidade de mão de obra especializada na operação.

5. Não poluição atmosférica, pois não ocorre emissão de SO₂, como no processo pirometalúrgico. Como se sabe o SO₂ é o agente causador da conhecida “chuva ácida”.

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

Dentre os processos biohidrometalúrgicos alguns podem ser destacados: BioCOP (BHP Billiton e Codelco); BacTech (Companhia Canadense BacTech Mining Corporation); GEOCOAT (GeoBiotics) e BioHeap (Titan Resources e Pacific Ore Technology Ltd) (BALLESTER & CÓRDOBA, 2005).

O processo operacional da biohidrometalurgia é conduzido de forma quase rudimentar nos casos do cobre e do urânio, aproveitando-se a ação natural de bactérias já presentes nos minérios apropriados. Isto é, aqueles em que o metal de interesse já se apresenta em forma de sulfeto (por exemplo, a calcopirita-CuFeS₂), o qual se transformará sob a ação oxidativa bacteriana, no sulfato solúvel correspondente (no exemplo, o CuSO₄). Caso o metal de interesse não se apresente nessa forma mineralógica, deve existir no minério um outro sulfeto (por exemplo, a pirita-FeS₂) para ser oxidado pela bactéria, e se transformar em agentes lixiviantes (ácido sulfúrico e o íon férrico), capazes de promover a solubilização do metal não sulfetado. Salienta-se novamente que, a principal espécie bacteriana envolvida diretamente na solubilização de metais de seus minérios é a espécie oxidante do enxofre e suas formas reduzidas (sulfetos metálicos, por exemplo) *A. ferrooxidans*, apesar do envolvimento de outras espécies, como será visto posteriormente.

Resumidamente o processo consiste na deposição de grandes quantidades de minério (milhares de toneladas) sobre uma base impermeabilizada, seguida de uma irrigação na superfície da pilha formada, com uma solução de ácido sulfúrico (pH~2,0). Essa solução, coletada após a percolação pelo minério, é reciclada constantemente pela pilha, ocasionando uma intensificação da atividade bacteriana no substrato mineral sulfetado. Dessa ação resulta uma elevação da acidez e do poder oxidante da solução, pela produção biológica de H₂SO₄ e do íon Fe³⁺, com a consequente solubilização do metal desejado. Após essa etapa, que constitui a essência do processo de lixiviação bacteriana, o metal é extraído da solução por processos convencionais. Um esquema do processo pode ser visto na Figura 4.

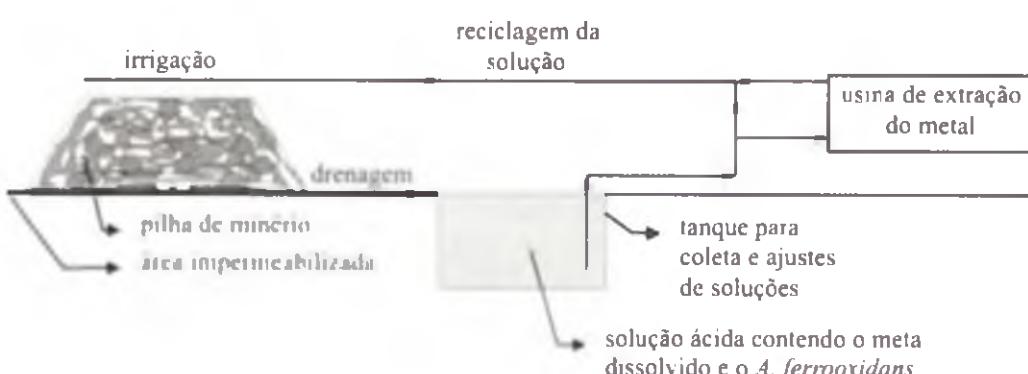


FIGURA 4. Esquema simplificado do processo de lixiviação bacteriana de metais em pilhas.

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

1. Crescimento em condições ambientais extremas, sobretudo elevada acidez e altas concentrações de metais.
2. Crescimento autotrófico (fixação de CO₂ atmosférico) proporcionado pela energia liberada da oxidação de compostos estritamente inorgânicos, como o íon Fe²⁺ e formas reduzidas de enxofre.
3. Significativa resistência às concentrações elevadas de metais potencialmente tóxicos, provavelmente condicionada por um sistema genético altamente especializado.
4. Capacidade de solubilizar metais de interesse econômico, devido ao seu metabolismo oxidativo que produz eficientes agentes de lixiviação ácida de metais (íon férrico e ácido sulfúrico).

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

Sob o nome de “Biohidrometallurgia” são englobados ainda outros processos baseados na atividade geoquímica dos microrganismos. A nível de laboratório, já se estuda a participação microbiana na dessulfurização do carvão, objetivando minimizar o teor de enxofre do mesmo, para que durante sua utilização industrial ocorra uma redução na emissão de SO₂ para atmosfera. Além desse, podem ainda ser citados outros tipos de atividade microbiana natural, com potencialidade para se tornarem processos industriais: redução de sulfato por bactérias para produção de enxofre, remoção de metais pesados de efluentes industriais por biomassa de microrganismo e solubilização de rochas fosfáticas por fungos.

3.3 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Essa espécie é capaz de crescer em condições ambientais extremas, como elevada acidez e altas concentrações de metais potencialmente tóxicos. C. *A. ferrooxidans* é resistente às concentrações (g L⁻¹) de: 0,4 Cr(III), 10 Cu(II), 10 Cd(II), 40 Zn(II), e 15 Ni(II) (CABRERA *et al.*, 2005). Essa elevada resistência a metais tóxicos é provavelmente condicionada por um sistema genético altamente especializado. Essas características têm atraído uma considerável atenção nos últimos anos, não somente pelo desafio que essas descobertas têm causado nos conhecimentos dos limites da vida microbiana, mas principalmente pelo seu potencial biotecnológico.

O *A. ferrooxidans* é uma espécie não patogênica, que se apresenta como bastonetes Gram-negativos, não esporulantes, com dimensões médias de 0,5 a 0,6 µm de diâmetro por 1,0 a 2,0 µm de comprimento, ocorrendo sozinho ou em pares, raramente em cadeias pequenas; são móveis e apresentam flagelo polar (HOLT,

1994), e sua reprodução é por divisão binária simples (PIVOVAROVA & GOLOVACHEVA, 1985). DiSpirito (1982), demonstraram a presença de “pilli”. É considerado um microrganismo mesófilo, sendo 30°C a temperatura ótima de crescimento, entretanto foram isoladas linhagens psicrófilas com crescimento entre 2 e 37°C (BERTHELOT, 1993; LEDUC, 1993). É um acidófilo estrito e o pH ótimo de crescimento situa-se em torno de 2,0, ocorrendo porém, crescimento numa faixa 1,5 a 4,5; acima de pH 6,5 ou abaixo de pH 1,0, não é capaz de sobreviver (SMITH, 1988). Embora seja um aeróbio obrigatório, *A. ferrooxidans* pode reduzir o íon férrico anaerobicamente durante a oxidação do enxofre para a produção de energia utilizada no crescimento bacteriano (PRONK & JOHNSON, 1992; DAS & MISHRA, 1996). A Figura 5 (A e B) mostra imagens do *A. ferrooxidans* obtidas por microscopia de forças atômicas (A) e por microscopia eletrônica de varredura (B) (BEVILAQUA, 2003).

A espécie utiliza somente substratos inorgânicos para seu crescimento, necessitando basicamente, além da fonte energética (Fe^{2+} ou formas reduzidas de enxofre, incluindo os sulfetos metálicos), suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (TUOVINEN, 1979; RAWLINGS, 1981).

Como resultado de cerca de 30 anos de pesquisa, existe unanimidade com relação a estequiometria da reação de oxidação do íon Fe^{2+} , a qual pode ser vista na equação abaixo:



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

Os elétrons transferidos da reação de oxidação do íon Fe^{2+} , das formas reduzidas do enxofre e de outros substratos inorgânicos (a ser visto posteriormente), via cadeia respiratória, liberam a energia necessária para a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) e a consequente produção do trifosfato de adenosina (ATP).

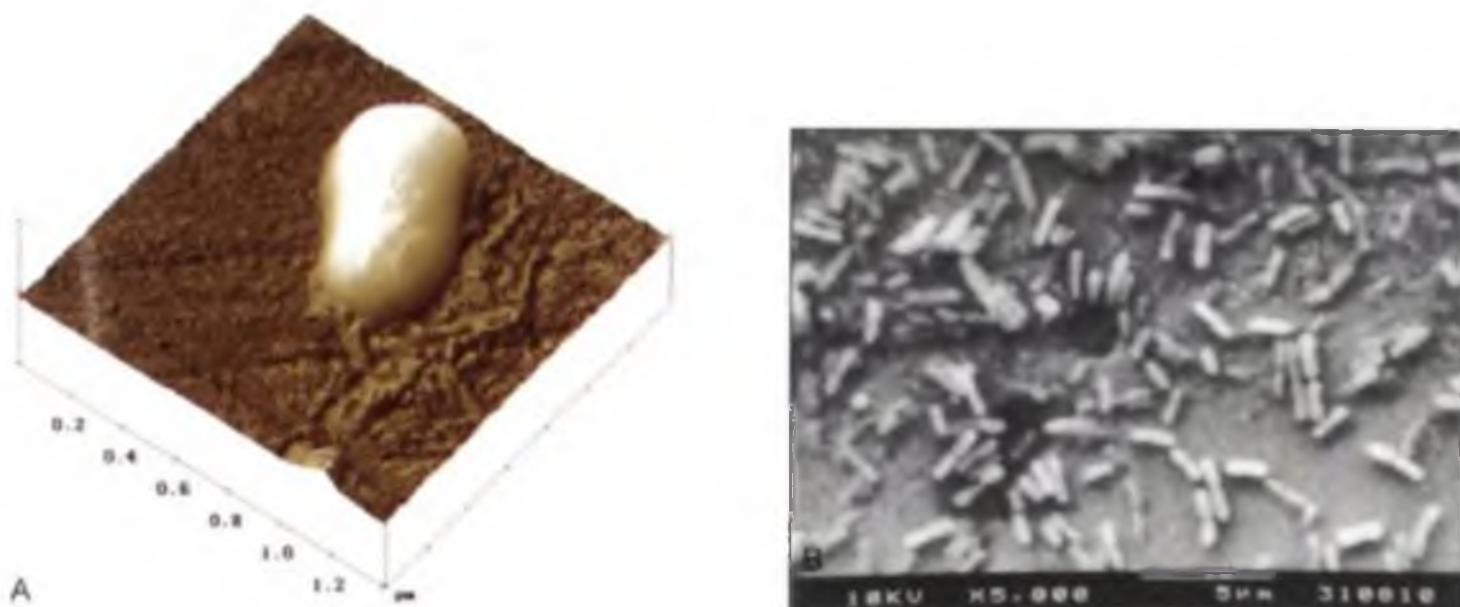


FIGURA 5. Imagem topográfica por microscopia de forças atômicas de *A. ferrooxidans*, linhagem LR na superfície da calcopirita após 72 horas de contato (A) e por microscopia eletrônica de varredura em calcopirita após 288 horas de contato (B).

Ingledew (1986) apresenta um sumário completo dos componentes do sistema oxidativo e de transferência de elétrons (produção de energia) do *A. ferrooxidans*, dentre os quais deve ser destacada a enzima **rusticianina**, primeiro acceptor de elétrons da cadeia respiratória dessa bactéria. Utilizando a energia proveniente dessas reações de oxidação, a espécie fixa o CO₂ atmosférico via ciclo de Calvin (TUOVINEN & KELLY, 1973).

O isolamento dessa espécie é conseguido com uma certa facilidade, utilizando-se amostras (sólidas ou líquidas) provenientes de minas contendo minério sulfetado. Efluentes de minas de carvão, por exemplo, são geralmente fontes quase certas da presença da bactéria devido ao seu alto conteúdo de pirita. Várias formulações de meios de cultivo tem sido publicadas, mas até hoje os dois meios mais utilizados para o cultivo da espécie são os meios “9K” (SILVERMAN & LUNDGREN, 1959) e o “T & K” (TUOVINEN & KELLY, 1973). Em meio sólido, são requeridos agentes geleificantes puros como a agarose, visto que tipos comuns de ágar inibem o crescimento da espécie (GARCIA *et al.*, 1992).

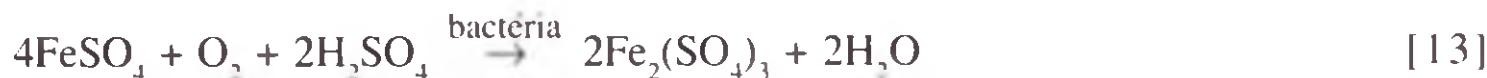
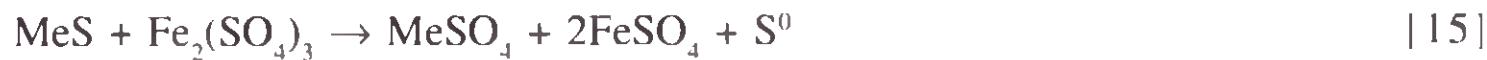
3.4 Oxidação de sulfetos metálicos por *A. ferrooxidans*

Tem sido demonstrada a capacidade do *A. ferrooxidans* em oxidar diferentes sulfetos metálicos como arsenopirita (FeAsS), galena (PbS), esfarelita (ZnS), calcopirita (CuFeS₂) além de outros (BEVILAQUA *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 1995a,b; TUOVINEN *et al.*, 1994). No entanto, a interação da bactéria com os sulfetos minerais ainda é um dos temas mais controvertidos na literatura (BOON, 2001; CRUNDWELL, 2001; SAND, 2001; TRIBUTSCH, 2001).

Dois tipos de mecanismos são propostos e motivam grandes discussões, o mecanismo direto e o indireto. Os proponentes do mecanismo direto afirmam que a bactéria possui um mecanismo biológico específico para degradar o mineral e deste modo obter energia diretamente do mineral (reação [14]). Por outro lado, os proponentes do mecanismo indireto argumentam que o íon férrico é o responsável pela dissolução do mineral e que a bactéria obtém energia da regeneração deste íon férrico (reações [15] e [13]). Indubitavelmente o mecanismo indireto ocorre, mas os defensores do mecanismo direto argumentam que esta não é a rota dominante.



onde MeS é o sulfeto metálico.



Esta classificação dos mecanismos foi refinada incluindo-se mais uma categoria: mecanismo indireto, mecanismo de contato indireto e mecanismo de contato direto. A Figura 6 ilustra os três mecanismos.

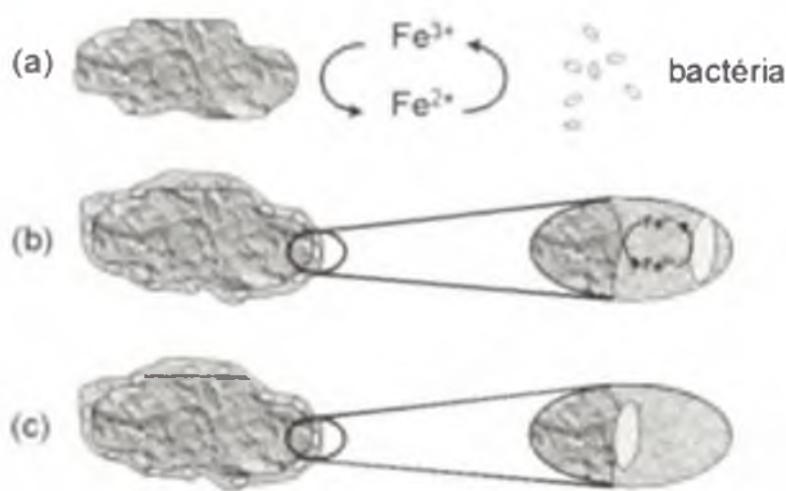


FIGURA 6. Os três mecanismos propostos para a ação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre os sulfetos minerais. (a) mecanismo indireto, no qual a bactéria oxida o íon ferroso em solução e este por sua vez, lixivia o metal. (b) mecanismo do contato indireto, no qual a bactéria aderida ao mineral oxida o íon ferroso dentro do biofilme (formado pela própria bactéria e o material exopolimérico que ela produz), o íon férrico lixivia o metal dentro desta camada exopolimérica. (c) o mecanismo de contato direto, no qual a bactéria oxida o mineral, sem requerer íons férrico ou ferroso (CRUNDWELL, 2001).

RUIZ, 1988; FOWLER, 2001). Uma vez que a bactéria modifica a concentração relativa e, portanto, o potencial redox do par $Fe^{2+/3+}$, foram feitas tentativas de se controlar o potencial durante os experimentos (HOLMES, 1999). Nesse trabalho verificou-se uma alteração no potencial misto, acompanhado de um aumento do pH na interface. Entretanto, em todos estes estudos, o mecanismo interfacial bactéria/sulfeto permanece ainda relativamente obscuro, uma vez que espécies vivas, e os muitos compostos que elas secretam, interagem com a interface sólida.

Sand (1995) propôs que a lixiviação bacteriana de sulfetos minerais ocorre essencialmente pelo mecanismo indireto iniciado pelo íon férrico. Nesta definição, ele define o papel do Fe^{3+} ligado a uma substância exopolimérica, que é essencial para a ligação das células à pirita.

De acordo com um novo modelo para biolixiviação proposto por Sand (2001), os sulfetos metálicos são degradados por ataque químico de íons Fe^{3+} e/ou ataque de prótons na rede cristalina. O mecanismo e a química de degradação são determinados pela estrutura do mineral.

A estrutura eletrônica dos sulfetos minerais, explicada pela banda de valência e pela teoria do orbital molecular, é um fator decisivo para os mecanismos de biolixiviação.

Muitos sulfetos são semicondutores ou semi-metais, e a reatividade interfacial destes sulfetos com espécies eletrolíticas pode ser descrita de diferentes maneiras, sejam elas: em termos de potencial eletroquímico, de estados eletrônicos, de posições

A superfície dos sulfetos minerais é muito reativa e começa a oxidar tão logo o mineral entra em contato com o ar ou a água. A oxidação destas superfícies é um fenômeno muito importante, principalmente nos processos de flotação onde pode ser reduzida a recuperação dos metais de interesse (VELÁSQUEZ, 1998).

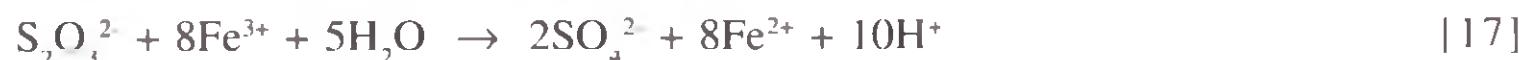
Fullston (1999) mediram o potencial zeta como função do pH e de condições oxidantes de vários sulfetos minerais e estabeleceram a seguinte ordem de oxidação: calcocita > tenantita > enargita > bornita > covelita > calcopirita.

Basicamente, os estudos sobre a interação bacteriana com a interface dos sulfetos se dividem em pesquisadores que assumem a interação direta (BOOGERD, 1991) e outros que assumem a interação indireta (BOON, 1998; ESPEJO &

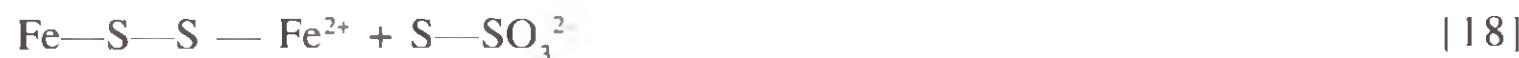
energéticas, de bandas de energia e propriedades de trocas de elétrons. Dependendo dos fatores limitantes envolvidos, o comportamento eletroquímico e a natureza dos produtos de corrosão anódica podem ser muito diferentes. Muitos sulfetos (ZnS, CdS, PbS, CuS) produzem enxofre molecular como um produto de oxidação, outros (FeS_2 , MoS_2 , WS_2) produzem sulfatos. Hoje se conhece o porquê desses sulfetos reagirem tão diferentemente. Um fator crítico é a natureza eletrônica da banda de valência (a mais alta banda energética ocupada por elétrons) com o qual o eletrólito pode trocar elétrons durante a reação de dissolução. De acordo com as teorias do orbital molecular e de ligação de valência, os orbitais de átomos simples ou moléculas formam bandas de elétrons com diferentes níveis de energia. A banda com maior nível de energia, a qual ainda está preenchida com elétrons, é a banda de valência. Os átomos do metal e do enxofre estão ligados na rede cristalina. No caso da pirita (FeS_2), molibdenita (MoS_2) e tungstenita (WS_2) as bandas de valência são derivadas somente dos orbitais dos átomos de metais, enquanto para todos os outros sulfetos minerais as bandas de valência são derivadas de ambos, orbitais do metal e do enxofre.

Conseqüentemente, as bandas de valência da pirita, molibdenita e tungstenita não contribuem para a quebra da ligação entre o metal e o enxofre. Esta ligação somente pode ser quebrada por vários passos de oxidação com o agente oxidante Fe^{3+} . No caso dos outros sulfetos minerais, além dos íons Fe^{3+} , prótons podem remover elétrons da banda de valência, provocando uma quebra da ligação entre o metal e o enxofre. Desta maneira, estes sulfetos minerais são relativamente solúveis em ácido, enquanto pirita, molibdenita e tungstenita são insolúveis.

A reação da pirita com o íon Fe^{3+} pode ser assim representada:



O tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) é supostamente formado do dissulfeto da rede cristalina da pirita (reação [18]):



O tiosulfato é conseqüentemente degradado num processo cíclico até sulfato, com enxofre elementar sendo um sub-produto.

Este “mecanismo do tiosulfato” é diferente do “mecanismo do polissulfeto”, que é o mecanismo pelo qual ocorre a dissolução de sulfetos minerais ditos “solúveis em ácido” como esfarelita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2), galena (PbS) e realgar (As_2S_3), onde o ataque inicial envolve a participação de prótons. Os principais intermediários são polisulfetos e enxofre elementar.

Estes dois mecanismos estão resumidos na Figura 7.

Independentemente de qual mecanismo ocorre, a adesão da bactéria na superfície dos sulfetos metálicos foi detectada e analisada por diversas técnicas (ESCOBAR, 1997; PORRO, 1997; SAMPSON, 2000; BENGRINE, 2001).

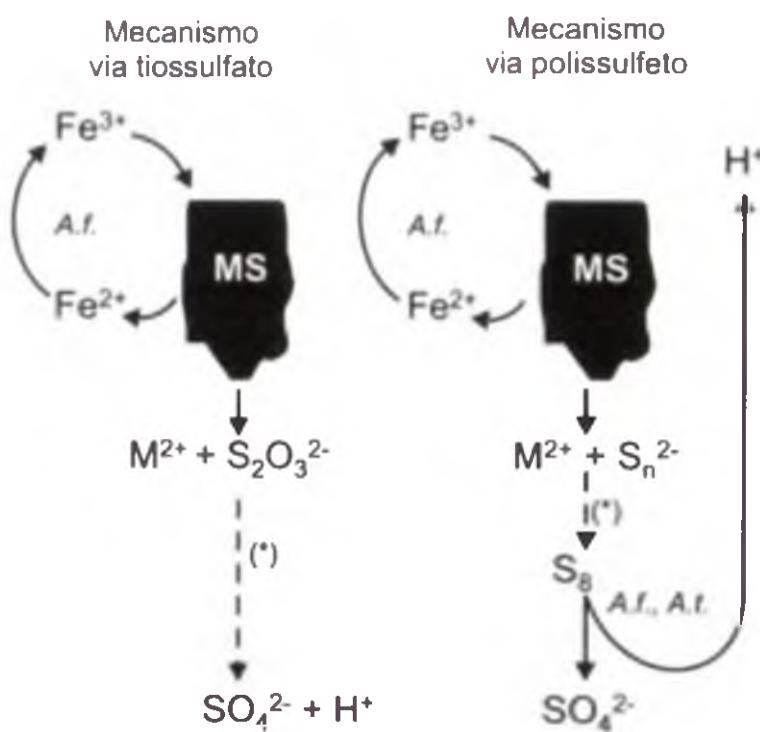


FIGURA 7. Esquema do mecanismo do tiossulfato e do polissulfeto na biolixiviação dos sulfetos metálicos. MS – sulfeto metálico; M²⁺ - íon metálico; S₂O₃²⁻ - tiossulfato, S_n²⁻ - polissulfeto; S₈ – enxofre elementar; A. f., A. t. – reações enzimáticas promovidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*; (*) – possíveis reações enzimáticas promovidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*.

A adesão bacteriana é importante em diferentes processos, sejam eles biotecnológicos, na formação de biofilmes, na formação de círies dentárias e no tratamento de águas residuais (aeróbico ou anaeróbico) (van LOOSDRECHT, 1990).

Embora parâmetros físicos como tamanho de partículas, tempo de incubação e agitação sejam importantes no processo de adesão (MURTHY & NATARAJAN, 1992), há evidências que o mecanismo está baseado em interações específicas e não específicas. Interações específicas podem ser definidas como interações microscópicas (interações iônicas, químicas ou ligações protéicas), enquanto interações não específicas envolvem propriedades macroscópicas (hidrofobicidade, energia livre de superfície e interações eletrostáticas) (BUSSCHER & WEERKAMP, 1987).

Embora a adesão do *A. ferrooxidans* sobre superfícies minerais seja tenaz e frequentemente irreversível (KARAN, 1996; SRIHARI, 1991), não há muito conhecimento sobre como e quais as forças que dirigem esta interação bactéria-superfície. Obviamente esta interação depende das características físico-químicas da superfície e do envelope celular, bem como da força iônica do meio. Como a bactéria se move em direção a uma superfície sólida, vários fatores afetam as forças que determinam se a adesão irá ou não ocorrer. Entretanto estas forças diferem na intensidade e na distância na qual elas influenciam a interação entre a bactéria e a superfície a ser aderida. A distância de dezenas de nanômetros, a interação é o balanço das forças atrativas e repulsivas entre as duas superfícies. As forças de van der Waals são freqüentemente atrativas, ocorrem entre todas as fases adjacentes, independentemente da sua composição e atuam sobre distâncias relativamente grandes (> 50 nm), mas elas são relativamente fracas. Já as forças eletrostáticas se tornam significativas a uma distância menor (10 – 20 nm). Se as superfícies tiverem cargas opostas, então a interação eletrostática será atrativa. Muito freqüentemente as cargas da bactéria e da superfície são negativas e, portanto ocorrerá uma repulsão eletrostática que pode evitar que a bactéria se aproxime o suficiente da superfície para que a adesão ocorra. Entretanto, as forças de repulsão diminuem com o aumento da força iônica do meio (FLETCHER, 1996).

Uma outra barreira potencial à adesão de bactéria sobre superfícies é a água adsorvida sobre elas. Para que a adesão ocorra, tem que haver o deslocamento desta água adsorvida o que é energeticamente desfavorável. Porém se as superfícies possuírem grupos não polares, estes podem auxiliar na exclusão desta água por interações hidrofóbicas. Estas interações são muito importantes em muitos casos, ou como mecanismo primário de adesão, ou facilitando a aproximação das espécies.

A superfície bacteriana é uma estrutura tridimensional, heterogênea e com uma composição química complexa, com várias macromoléculas na interface com o meio. A influência das condições de crescimento nas características da superfície celular foi investigada por van Loosdrecht (1987) que utilizaram 23 diferentes espécies bacterianas. Para altas taxas de crescimento, o envelope celular mostrou uma tendência a se tornar mais hidrofóbico. Especificamente para *A. ferrooxidans*, Devasia *et al.* (1993) mostraram que a adesão à calcopirita (CuFeS_2) e a pirita (FeS_2) foi dirigida por interações hidrofóbicas e hidrofílicas.

O substrato de crescimento do *A. ferrooxidans* (antes do seu contato com o sulfeto mineral) é essencial para estabelecer as forças que irão predominar na interação bactéria/superfície (CURUTCHET & DONATI, 2000; SAMPSON, 2000). Estes autores mostraram que células de *A. ferrooxidans* crescidas em meio contendo enxofre como fonte energética apresentam mais hidrofobicidade do que aquelas que foram crescidas em meio contendo íon ferroso. Entretanto esta condição não pode ser associada com maior ou menor adesão das células. Outros estudos sugerem que proteínas (OHMURA, 1996; SOMASUNDARAN, 1998; SHARMA, 2001) e substâncias exopoliméricas (EPS) presentes na superfície celular (ESCOBAR, 1997; GEHRKE, 1998; KINZLER, 2001) desempenham um papel muito importante nos estágios iniciais de adesão. Segundo Blake (2001) a adesão do *A. ferrooxidans* sobre pirita é mediada por uma proteína denominada aporusticianina a qual está localizada na superfície externa da bactéria.

Ainda sobre pirita, Tributsch & Rojas-Chapana (2000) sugerem que o *A. ferrooxidans* execute a estratégia descrita a seguir para romper as ligações químicas na pirita. Utilizando uma molécula que contém um grupo tiol (cisteína), a bactéria rompe a interface do sulfeto de ferro formando pontes de enxofre ($-\text{S}-$ ou $-\text{S-S}$) com a pirita (confirmado por estudos eletroquímicos). Deste modo, as ligações cristalinas se rompem liberando o ferro e o enxofre da interface cristalina. Este mecanismo é demonstrado pelo fato que cisteína, na ausência de bactéria, pode dissolver camadas de pirita numa taxa comparável com a dissolução bacteriana da pirita.

Segundo Little (1992) diversos fatores influenciam na adesão dos microrganismos às superfícies. A rugosidade e a composição desempenham o papel principal durante o estágio inicial de acumulação do biofilme e pode influenciar na maneira como as células irão colonizar e se distribuir sobre o substrato. O eletrólito também tem uma grande influência nesse processo.

Os exopolímeros produzidos pelas bactérias são fundamentais para a integridade do filme microbiano. O gel pode ter diversos efeitos sobre os processos

interfaciais, entre eles: imobilizar água na interface biofilme/mineral; prender espécies metálicas (cobre, ferro) e produtos de corrosão na interface e diminuir a difusão (LITLLE, 1992). Muitas técnicas podem ser usadas nos estudos de adesão, colonização e formação de biofilme.

O processo de adesão bacteriana é provavelmente o resultado desta série de interações que ocorrem simultaneamente (iônicas, hidrofóbicas, van der Waals, mediadas por proteínas específicas, mediadas por exopolímeros, dentre outras). A contribuição relativa de cada interação depende de alguns fatores tais como composição da amostra, influências ambientais e disponibilidade de substrato.

O entendimento aprofundado destes mecanismos e consequentemente da adesão destas bactérias sobre os substratos minerais é de fundamental importância para a manipulação dos processos aplicados em biolixiviação.

Um exemplo de lixiviação indireta e que na verdade se constitui num exemplo clássico e bem sucedido da própria Biohidrometalurgia, é o caso do urânio. O urânio normalmente se apresenta na natureza na forma de óxidos insolúveis (UO_2) como a uraninita ou a petchblenda. Nesses minerais o urânio se apresenta na forma reduzida insolúvel (U^{4+}). Um passo necessário para solubilizar o urânio, é sua oxidação para U^{6+} através de íons oxidantes em soluções ácidas como, por exemplo, o Fe^{3+} . A participação do *A. ferrooxidans* nesse processo, como tem sido demonstrado por inúmeros pesquisadores (GUAY *et al.*, 1977; TUOVINEN, 1986), é a de promover a oxidação de um sulfeto de ferro (pirita ou pirrotita, por exemplo) geralmente presentes nos minérios uraníferos, produzindo dessa forma o agente de lixiviação (solução ácida de sulfato férrico). A Figura 8 mostra um esquema simplificado da lixiviação do urânio promovida pelo *A. ferrooxidans*. Podem ser citados como exemplos atuais de países que produzem urânio pela via biotecnológica, o Canadá (BRUYNESTEYN, 1989) e a Espanha (CERDÁ *et al.*, 1993). Em nosso país, alguns trabalhos foram realizados na extinta NUCLEBRAS (atualmente In-dústrias Nucleares do Brasil) e chegou-se até operações em escala piloto (GARCIA 1984; GARCIA & BRITO, 1984; GARCIA, 1990; GARCIA, 1993). Entretanto, como é perfeitamente sabido, o arrefecimento do programa nuclear brasileiro como um todo, determinou uma paralisação nesses estudos. De qualquer forma a potencialidade da aplicação industrial da técnica, foi satisfatoriamente demonstrada.

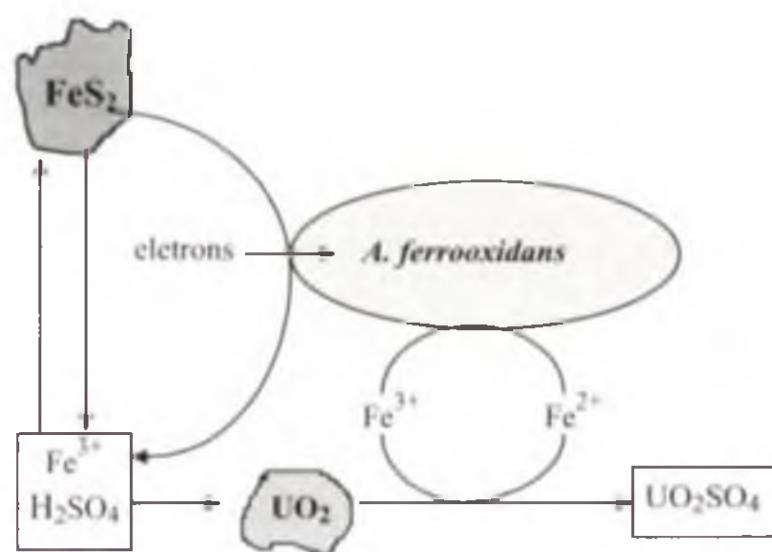


FIGURA 8. Esquema simplificado da oxidação da uraninita (UO_2) pelos produtos da oxidação da pirita (FeS_2) pelo *A. ferrooxidans*. O íon ferroso (Fe^{2+}) é constantemente reoxidado ao íon férrico (Fe^{3+}) pela bactéria. Notar que o urânio solúvel é produzido na forma de UO_2SO_4 .

3.5 A genética do *Acidithiobacillus ferrooxidans*

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

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

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

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

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

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

Entretanto, deve-se começar mencionando os estudos pioneiros de genética clássica do *A. ferrooxidans*, realizados no final da década de 70 por V.I. Groudeva e colaboradores na Bulgária. Os trabalhos realizados demonstraram a existência de variabilidade genética natural na espécie e comprovaram sua potencialidade para o melhoramento genético no sentido de tornar mais eficiente o processo de lixiviação, em seu aspecto biológico (GROUDEV & GROUDEV, 1980a, b). DiSpirito & Tuovinen (1982) constataram também grande variabilidade entre 13 linhagens de *A. ferrooxidans* quanto à resistência ao urânio e ao tório e a parâmetros cinéticos. Garcia & Silva (1991), também mostraram variabilidade natural entre linhagens isoladas de minas brasileiras, quanto à resistência a metais. Em outro estudo, foi detectada

diversidade genômica e fisiológica entre linhagens de diversas partes do mundo (HARRISON, 1982).

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

Nos últimos anos, inúmeros estudos com o *A. ferrooxidans* tem sido realizados no sentido de desenvolvimento de um sistema genético apropriado para a espécie e dessa forma, métodos para isolamento de plasmídios, obtenção de marcadores genéticos (resistência a metais e antibióticos), clonagem e expressão de plasmídios do *A. ferrooxidans* em *E. coli* e transferência de plasmídios para o *A. ferrooxidans* tem sido estabelecidos (ROBERTO & BRUHN, 1993; RAWLINGS, 2001). Todo esse interesse sobre a genética molecular do *A. ferrooxidans*, indicam claramente que um vasto campo de investigação está aberto. Não só sob o prisma da descoberta científica em si, mas, sobretudo sob o ponto de vista biotecnológico, o desenvolvimento de estudos nessa área deverá mudar o estágio tecnológico, ainda incipiente, da biohidrometalurgia.

3.6 Outras bactérias do processo

A descoberta do *A. ferrooxidans* como a principal bactéria envolvida no processo de biolixiviação de metais e na dissolução oxidativa dos sulfetos minerais em geral, determinou um crescente interesse dos pesquisadores nos aspectos tecnológicos e científicos do fenômeno. Além da intensificação dos estudos sobre essa espécie bacteriana, começaram a surgir inúmeras investigações sobre a presença de outras espécies de microrganismos que poderiam desempenhar importantes funções, diretas ou indiretas, na solubilização desses sulfetos. Os principais microrganismos presentes no ambiente de uma mina são *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* e *Sulfobacillus* spp., este último pode ser detectado quando a temperatura fica em torno de 50°C.

Groudev *et al.* (1978), investigando durante vários anos a microflora existente em uma pilha de lixiviação bacteriana de minério de cobre na Bulgária, encontraram a presença dos seguintes microrganismos: bactérias do gênero *Acidithiobacillus* (*A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*), bactérias do ferro (*Gallionella* e *Leptothrix*), bactérias redutoras de sulfato (*Dessulfovibrio*), além de outras espécies de bactérias e fungos heterotróficos. Mesmo presentes nesse ambiente de condições extremamente adversas e relativamente extremas (alta acidez e presença de metais tóxicos solúveis),

a participação ativa da maioria desses microrganismos no processo de lixiviação não pôde ser comprovada. Além do *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, poucas outras espécies apresentam a capacidade de utilizar sulfetos como fonte de energia para seu crescimento, tendo dessa forma, alguma participação no processo. Atualmente sabe-se que além dessas duas espécies bacterianas, existem poucas outras que tem essa capacidade de oxidar o íon Fe^{2+} , enxofre elementar ou sulfetos metálicos.

Balashova *et al.* (1974) isolaram *Leptospirillum ferrooxidans* de depósitos de cobre da Armênia (antiga URSS) e demonstraram sua capacidade de crescer utilizando somente Fe^{2+} como fonte de energia. Tem sido ainda demonstrada a oxidação de sulfetos metálicos por espécies moderadamente termofílicas do gênero *Thiobacillus*, as quais diferem profundamente do *A. ferrooxidans* quanto à temperatura de crescimento; tais espécies foram isoladas de pilhas de lixiviação, onde a temperatura no interior atinge até 80-90°C (BRIERLEY & LOCKHOODS, 1977; MARSH & NORRIS 1983). Além das moderadamente termofílicas, espécies de bactérias termofílicas extremas também foram isoladas de pilhas de lixiviação; um exemplo clássico é a espécie *Sulfolobus acidocaldarius*, a qual oxida compostos reduzidos de enxofre e ferro em temperaturas ao redor de 80-90°C e em pH em torno de 1,0 (BROCK *et al.*, 1972).

A medida que o meio se torna mais extremo em termos de acidez e/ou temperatura, *A. ferrooxidans* se torna menos relevante numericamente, com um correspondente aumento de *A. caldus* e arqueobactérias acidofílicas. *L. ferrooxidans* pode ser encontrado em qualquer condição ambiental (BRYAN *et al.*, 2005).

Um estudo da biodiversidade apresentada nas minas do Rio Tinto mostrou um baixo nível de diversidade procariótica, como já é esperado para um ambiente extremo. No entanto, um surpreendente nível de diversidade eucariótica foi encontrado, o que pode ser um indício da existência de um eficiente mecanismo adaptativo que capacita um sistema complexo como este se desenvolver em condições extremas de pH, força iônica e alta concentração de metais pesados. Oitenta por cento da diversidade procariótica encontrada está relacionada a três gêneros bacterianos, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* e *Acidiphilum* (GONZÁLEZ-TORIL *et al.*, 2003). Outras bactérias e arqueobactérias, tais como, *Ferrimicorbiium acidiphilum*, *Desulfosporosinus* spp., *Ferroplasma* spp. e *Thermoplasma acidophila* também foram encontradas no Rio Tinto em menor número.

3.7 Outros processos

Todos esses processos oxidativos de sulfetos metálicos podem ser resumidos pela equação geral [19], onde um sulfeto metálico qualquer (insolúvel) é oxidado biologicamente ao sulfato do metal correspondente (solúvel):



Entretanto outros processos de dissolução microbiológica de minerais não sulfetados, mas que apresentam metais associados, estão bem caracterizados. Dois

exemplos significativos são a solubilização de aluminosilicatos, como por exemplo, a leucita $[KAl(SiO_4)_3]$ e seus produtos alterados (bauxita, por exemplo) e de minerais de manganês como a pirolusita (MnO_2), promovidas pela ação de espécies de microrganismos diferentes dos quimiolitolíticos *Acidithiobacillus*.

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

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

4. Bioacumulação e biotransformação de metais

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

Em linhas gerais, todos os microrganismos absorvem e acumulam metais dos ambientes onde se proliferam, uma vez que metais como o ferro, zinco, cobre,

molibdênio são componentes essenciais de um grande número de enzimas e outras moléculas biológicas. Ao longo do processo evolutivo, os microrganismos desenvolveram sistemas especializados, os quais foram sendo selecionados naturalmente, para realizar esse processo de absorção e conferir resistência à concentrações elevadas dos metais, geralmente codificada por genes plasmidiais. Em alguns casos (As^{5+} , Ag^+ e Cd^{2+}) essa resistência é devida à diferenças

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

Apesar da especificidade de certos sistemas de absorção, essas características bioquímicas da parede celular e da membrana plasmática, permitem que outros tipos de metais não essenciais e eventualmente tóxicos, sejam acumulados, ou pelo menos, transformados para formas não tóxicas por um grande número de microrganismos. Os microrganismos interagem com metais retirando-os do meio onde vivem, desempenhando dessa forma, um importante papel nos ciclos geoquímicos desses elementos; a Figura 9 mostra um esquema desses mecanismos (BRIERLEY *et al.*, 1985; ROSSI, 1990).

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

- a. volatilização
- b. precipitação extracelular
- c. ligação à superfície celular (adsorção)
- d. bioacumulação intracelular

a) Volatilização - A transformação de cátions metálicos tóxicos, tais como Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} etc., e metalóides tais como As, Se e Te, em suas formas metiladas por microrganismos está bem documentada (SUMMERS & SILVER, 1978; ROBINSON & TUOVINEN, 1984; WILLIAMS & SILVER, 1984). Um dos exemplos mais bem conhecidos desse processo microbiano é a metilação do mercúrio e sua conseqüente volatilização. A metilação microbiana do mercúrio em sedimentos ou soluções, pode

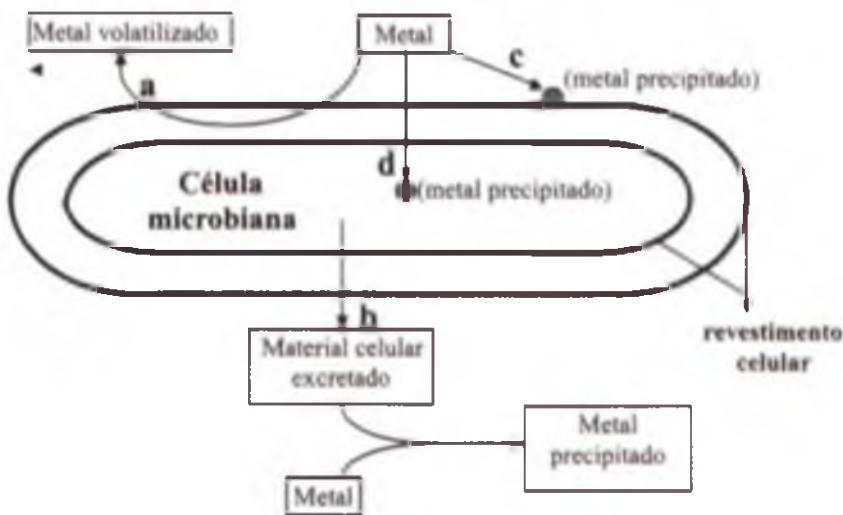
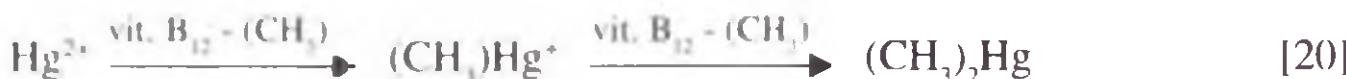


FIGURA 9. Representação esquemática das possíveis interações (a, b, c, d) entre metais e as células de microrganismos.

ocorrer por um mecanismo não enzimático, através da produção e excreção de metilcobalamina (vitamina B₁₂ metilada), conforme a reação [20].



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

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

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

Uma outra enzima envolvida na volatilização do mercúrio, embora bem menos estudada, é a **organomercúrio liase**. Compostos orgânicos de mercúrio como metilmercúrio e fenilmercúrio são clivados na ligação Hg - C pela **liase**, liberando o composto orgânico correspondente e o mercúrio, o qual é então reduzido à Hg^0 pela **mercúrio redutase**.

b) Precipitação extracelular - Os metais podem ser imobilizados e acumulados em solos e sedimentos devido à sua ligação com produtos metabólicos microbianos excretados. Os microrganismos em geral produzem e excretam compostos orgânicos que podem complexar metais, formando complexos organometálicos; dessa forma ocorre a imobilização do metal. Além da produção e excreção de compostos orgânicos, os microrganismos liberam compostos inorgânicos, os quais poderão se associar com os metais do meio externo, imobilizando-os. O microrganismo *Sphaerotilus natans*, por exemplo, pode imobilizar metais como ferro, magnésio, cobre, cobalto, cádmio, níquel e crômio por precipitação extracelular (HATCH & MENAWAT, 1978).

Os sulfetos metálicos e muitos compostos fosfatados de metais, são altamente insolúveis. Assim, a produção e excreção desses dois ânions (S^{2-} e PO_4^{3-}) por microrganismos, é um mecanismo de detoxificação, uma vez que os compostos insolúveis resultantes não são praticamente tóxicos. Um exemplo clássico é a deposição de sulfetos metálicos por precipitação do metal com o H_2S gerado bacterianamente. Como já destacado (**item 2.2**), as bactérias redutoras de sulfato estão largamente distribuídas em ambientes anaeróbios; esses microrganismos acoplam a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia com a redução do sulfato à H_2S . O sulfeto de hidrogênio liberado reage com o metal formando o sulfeto metálico correspondente, conforme a equação geral mostrada abaixo.



Além desse mecanismo ativo, a decomposição microbiana de matéria orgânica em sedimentos, também leva à formação de H₂S e, consequentemente, à deposição de sulfetos metálicos.

c) **Ligaçāo à superfície celular (adsorção)** - A ligação de metais à superfície celular dos microrganismos, processo chamado de **biosorção**, é um fenômeno de adsorção que acontece através de interações eletrostáticas entre o cátion metálico e a superfície carregada negativamente da célula microbiana. Dessa forma, a capacidade de “adsorver” metais vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie. Segundo Rossi (1990), evidências experimentais foram demonstradas na bactéria Gram+ *Bacillus subtilis*, na qual o agente primário de ligação com o metal são grupos COO⁻ do ácido glutâmico do peptidoglicano (componente da parede bacteriana). Para a espécie *Bacillus licheniformis*, essa capacidade é determinada, primariamente, pelo conteúdo significativo de ácidos graxos do revestimento celular, do que pela fração peptideoglicano.

Deve ser mencionado ainda, que a quantidade de metal ligado à superfície celular é muito maior que aquela prevista pela estequiometria de ligação com os sítios reativos da superfície. Tal constatação pode ser explicada por dois mecanismos básicos, baseando-se em estudos de microscopia eletrônica. Num primeiro estágio, somente a quantidade estequeométrica do metal liga-se aos sítios ativos da superfície celular; após essa ligação estequeométrica, os íons metálicos atuam como sítios de nucleação para a deposição de mais íons metálicos, determinando dessa forma, o aparecimento de agregados de metais chamados “cristalóides”.

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

Um exemplo marcante que a adsorção é um processo passivo decorrente das características do revestimento celular microbiano, foi obtido com a espécie *Streptomyces longwoodensis*; células liofilizadas do microrganismo acumularam cerca de 0,45 g de urânia/g de matéria seca em apenas 30 a 40 segundos de exposição ao metal (FRIIS & MYERS-KEITH, 1986).

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

d) **Bioacumulação intracelular** - A bioacumulação intracelular de metais, pode ser entendida como uma segunda fase do processo de **absorção** dos metais por

microrganismos vivos, decorrendo dessa forma de um mecanismo celular ativo, que ocorre numa primeira fase, com gasto de energia (ATP); assim, esse processo difere na sua essência da **adsorção** físico-química passiva discutida no item anterior.

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

Estão também documentados na literatura exemplos de bioacumulação de metais por outras vias diferentes dos conhecidos sistemas de transporte. Strandberg *et al.* (1981) demonstraram que a acumulação intracelular de urânio por *Pseudomonas aeruginosa*, parece independe de sistemas de transporte regulados metabolicamente. Nesse sentido, uma proteína de baixo peso molecular (~ 6.000) e de alto conteúdo de cisteína (30 a 35%) chamada **metaloteioneina**, parece desempenhar papel fundamental na absorção de metais pelos microrganismos; sua presença e função em vertebrados, invertebrados e em microrganismos procarióticos e eucarióticos tem sido bem documentada (TAUSEEF, 1987; ROSSI, 1990).

Além da bioacumulação de metais em suas formas catiônicas, exemplos de absorção de formas aniônicas também tem sido mostrados; em *Neurospora crassa*, a acumulação intracelular de CrO_4^{2-} parece ocorrer pelo sistema de transporte de SO_4^{2-} (ROSSI, 1990).

Devido às propriedades físico-químicas da parede celular e da membrana plasmática ou de reações enzimáticas específicas, vários microrganismos podem concentrar diversos compostos de metais em sua superfície. A interação metal-célula tem sido estudada para diversos microrganismos tais como bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*), fungos (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*) e algas (*Chlorella regularis*, *Sargassum fluitans*), entre outros. Vários metais têm sido objetos de estudo para a remoção por sistemas celulares, principalmente metais pesados como mercúrio, chumbo e cádmio, metais nobres como cobre, prata e ouro, e metais com propriedades radioativas como o urânio e o tório, entre outros.

Dos exemplos e discussões acima apresentadas, fica evidente a capacidade que os microrganismos apresentam para a imobilização de metais. Essa capacidade

é conferida por processos ativos ou processos passivos, através da excreção de produtos metabólicos ou ainda pela própria matéria orgânica morta.

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

Outro aspecto que torna este processo atrativo é o aproveitamento de microrganismos excedentes gerados pela indústria de fermentação que reduz o custo da obtenção dos biosorventes tornando este processo interessante do ponto de vista econômico (FOUREST & ROUX, 1992; OMAR, *et al.*, 1996; SINGELTON & SIMMONS, 1996).

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

5. Considerações finais

Como já amplamente discutido, os microrganismos participam direta ou indiretamente dos ciclos geoquímicos dos metais, e dos elementos químicos em geral, na natureza. Além dos processos de dissolução de minerais contendo metais, causando sua liberação para o meio ambiente, e a gênese de depósitos contendo metais associados, os microrganismos em geral podem acumular ou transformar elementos metálicos, como resultado de reações enzimáticas específicas ou de mecanismos decorrentes das propriedades de seus revestimentos celulares.

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

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

Referências

- BALASHOVA, V.V.; VEDENINA, I.Y.; MARKOSYAN, G.E.; ZAVARZIN, G.A. The auxotrophic growth of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Mikrobiologiya*. Moscou, v.43, p.581-585, 1974.
- BALLESTER, A.; CÓRDOBA, E. Hidrometalurgia de la calcopirita. In: MENACHO, J.M.; CASAS DE PRADA, J.M. *Hydrocopper*, 2005. Santiago: Universidad de Chile, p.19-41.
- BENGRINE, A.; OHMURA, N.; BLAKE II, R.C. *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* adhere to different sites on the surface of pyrite? In: CIMINELLI, V.S.T.; GARCIA Jr., O. (Ed.) *Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development, part B: biosorption and bioremediation*. Amsterdam: Elsevier, 2001, p.573-581.
- BERTHELOT, D.; LEDUC, I.G.; FERRONI, G.D. Temperatures studies of iron-oxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs isolated from uranium mines. *Canadian Journal Microbiology*, v.39, p.384-388, 1993.
- BEVILAQUA, D. *Estudo da interação do Acidithiobacillus ferrooxidans com calcopirita (CuFeS₂) e bornita (Cu₅FeS₄)*. 2003, 113p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.
- BEVILAQUA, D.; LEITE, A.L.L.C.; GARCIA Jr., O.; TUOVINEN, O.H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry*, v.38, p.587-592, 2002.
- BLAKE II, R.C.; SASAKI, K.; OHMURA, N. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite? *Hydrometallurgy*, v.59, p.357-372, 2001.
- BOOGERD, F.C.; VANDENBEEMD, C.; STOELWINDER, T.; BOS, T.; KUEGNEN, J.G. Relative contributions of biological and chemical reactions to the overall rate of pyrite oxidation at temperatures between 30°C and 70°C. *Biotechnology and Bioengineering*, v.38, p.109-115, 1991.
- BOON, M. The mechanism of 'direct' and 'indirect' bacterial oxidation of sulphide minerals. *Hydrometallurgy*, v.62, p.67-70, 2001.
- BOON, M.; SNIJDER, M.; HANSFORD, G.S.; HEIJNEN, J.J. The oxidation kinetics of zinc sulphide with *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, v.48, p.171-186, 1998.
- BRIERLEY, C.L. Microbiological mining. *Scientific American*, v.247, p.44-53, 1982.
- BRIERLEY, C.L.; KELLY, D.P.; SEAL, K.J.; BEST, D.J. Materials and biotechnology. In: HIGGINS, I.J.; BEST, B.J.; JONES, J. (Ed.). *Biotechnology: Principles and applications*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1985, p.163-213.
- BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L.; GOYAK, G.M. AMT-BIOCLAIMÔ: a new wastewater treatment in metal recovery technology. In: LAWRENCE, R.W.; BRANION, R.M.R.; EBNER, H.G. *Fundamental and applied biohydrometallurgy*. Amsterdam: Elsevier, 1986, p.291.
- BRIERLEY, J.A.; LOCKWOOD, S.J. The occurrence of thermophilic iron-oxidizing bacteria in a copper leaching system. *FEMS Microbiology Letters*, v.2, p.163-165, 1977.
- BROCK, T.D.; BROCK, K.M.; BELLY, R.T.; WEISS, R.L. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archives of Microbiology*, v.84, p.54-68, 1972.
- BRUYNESTEYN, A. Mineral biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v.11, p.1-10, 1989.
- BRYAN, C.G.; HALLBERG, K.B.; JOHNSON, D.B. Microbial populations of tailings spoil at the São Domingos former copper mine. In: HARRISON, S.T.L.; RAWLINGS D.E.; PETERSEN, J. (Ed.). *Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium*. Cape Town. Cape Town: Copress, 2005, p.677-686.
- BRYNER, I.C.; JAMESON, A.K. Microrganisms in leaching sulfide minerals. *Applied Microbiology*, v.6, p.281-287, 1958.
- BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Reviews*, v.46, p.165-173, 1987.
- CABRERA, G.; GOMEZ, J.M.; CANTERO, D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidothiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. *Process Biochemistry*, v.40, p.2683-2687, 2005.
- CERDÁ, J.; GONZÁLEZ, S.; RÍOS, J.M.; QUINTANA, T. Uranium concentrates bioproduction in Spain: a case study. *FEMS Microbiology Reviews*, v.11, p.253-260, 1993.
- COLMER, A.R.; HINKLE, M.E. The role of microrganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*, v.106, p.253-256, 1947.
- COLMER, A.R.; TEMPLE, K.L.; HINKLE, M.E. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *Journal of Bacteriology*, v.59, p.317-328, 1950.

- COLORADO SCHOOL OF MINES. Acid mine drainage experiments. Disponível em: <http://www.mines.edu/fs_home/jhoran/ch126/index.htm>. Acesso em: 31 jul. 2006.
- CORRICK, J.D.; SUTTON, J.A. Three chemosynthetic autotrophic bacteria important to leaching operations at Arizona copper mines. [S.l.]: U.S. Bureau of Mines, 1961, 8p. (Report No 5718).
- CRUNDWELL, F.K. How do bacteria interact with minerals. In: CIMINELLI, V.S.T.; GARCIA JR., O. (Ed.). **Biohydrometallurgy**: fundamental, technology and sustainable development, part A: bioleaching, microbiology and molecular biology. Amsterdam: Elsevier, 2001, p.149-157.
- CURUTCHET, G.; DONATI, E. Iron-oxidizing and leaching activities of sulphur-grown *Thiobacillus ferrooxidans* cell on other substrates: effect of culture pH. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.90, p.54-58, 2000.
- DAS, A.; MISHRA, A.K. Role of *Thiobacillus ferrooxidans* and sulphur (sulphide) - dependent ferric-ion-reducing activity in the oxidation of sulfide minerals. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.45, p.377-382, 1996.
- DEVASIA, P.; NATARAJAN, K.A.; SATHYANARAYANA, D.N.; RAO, G.R. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4051-4055, 1993.
- DiSPIRITO, A.A.; SILVER, M.; VOSS, L.; TUOVINEN, O.H. Flagella and pili of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from an uranium mine in northern Ontario, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1196-1200, 1982.
- DiSPIRITO, A.A.; TUOVINEN, O.H. Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Archives of Microbiology**, v.133, p.33-37, 1982.
- EHRLICH, H.L. **Geomicrobiology**. New York: Marcel Dekker, 1981, 392p.
- ESCOBAR, B.; HUERTA, G.; RUBIO, J. Short Communication: Influence of lipopolysaccharides in the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.593-594, 1997.
- ESPEJO, R.T.; RUIZ, P. Growth of free and attached *Thiobacillus ferrooxidans* in ore suspension. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.586-592, 1988.
- FLETCHER, M. Bacterial attachment on aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: FLETCHER, M. (Ed.) **Molecular and ecological diversity of bacterial adhesion**. New York: Wiley-Liss, 1996, p.1-24.
- FOUREST, E.; ROUX, J.C. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by products mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.399-403, 1992.
- FOWLER, T.A.; HOLMES, P.R.; CRUNDWELL, F.K. On the kinetics and mechanism of the dissolution of pyrite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v.59, p.257-270, 2001.
- FRIIS, N.; MYERS-KEITH, P. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.21-26, 1986.
- FULLSTON, D.; FORNASIERO, D.; RALSTON, J. Zeta potential study of the oxidation of copper sulfide minerals. **Colloids and Surface**, v.146, p.113-121, 1999.
- GARCIA Jr., O.; MUKAI, J.K.; ANDRADE, C.B. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.38, p.279-282, 1992.
- GARCIA Jr., O. Bacterial leaching of uranium ore from Figueira-PR, Brazil, at laboratory and pilot scale. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.237-242, 1993.
- GARCIA Jr., O. Bioleaching of ores: Brazilian perspectives. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON DUMP AND UNDERGROUND BACTERIAL LEACHING METALS FROM ORES, Leningrado, Russia, Proceedings..., 1990, p.96-102.
- GARCIA Jr., O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.20, p.1-6, 1991.
- GARCIA Jr., O. O enxofre e suas transformações microbianas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, cap. 22, 1992, p.319-328.
- GARCIA Jr., O. **Processo combinado bacteriano/químico de lixiviação estática de minério contendo sulfetos e valores recuperáveis de elementos metálicos**. 1984. Patente de Invenção No 8402983 (INPI-MIC).
- GARCIA Jr., O.; BIGHAM, J.M.; TUOVINEN, O.H. Oxidation of galena of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.508-514, 1995a.
- GARCIA Jr., O.; BIGHAM, J.M.; TUOVINEN, O.H. Spharelite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.578-584, 1995b.

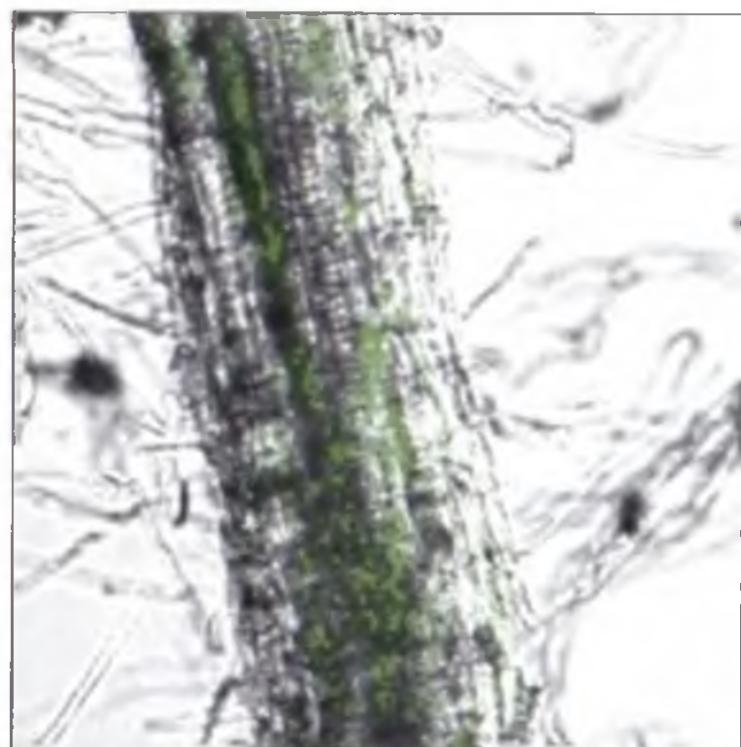
- GARCIA Jr., O.; BRITO, J. Utilização de microrganismos no tratamento de minérios de urânio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA, 3., 1984, Rio de Janeiro. Anais... v. 5, p.2043-2048.
- GARCIA Jr., O.; SILVA, L.L. Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnology Letters*, v.13, p.567-570, 1991.
- GEHRKE, T.; TELELDI, J.; THIERRY, D.; SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.2743-2747, 1998.
- GONZALÉZ-TORIL, E.; LLOBET-BROSSA, E.; CASAMAYOR, E.O.; AMANN, R.; AMILS, R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.4853-4865, 2003.
- GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. New York: Springer-Verlag, 1979, 281p.
- GROUDEV, S.N.; GENCHEV, F.N.; GAIDARIEV, S.S. Observations on the microflora in an industrial copper dump leaching operation. In: MURR, L.E.; TORMA, A.E.; BRIERLEY, J.A. (Ed.). **Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena**. New York: Academic Press, 1978, p.253-274.
- GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N. Mutation selection of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. *Mikrobiologiya*. Moscou, v.17, p.33-47, 1980b.
- GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N. Strain improvement of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. In: MEETING OF MINERS AND METALLURGISTS. TECHNICAL FACULTY, 12., 1980a, Bor, Yugoslavia. **Proceedings...** v. II, p.354-364.
- GUAY, R.; SILVER, M.; TORMA, A.E. Ferrous iron oxidation and uranium extraction by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.19, p.727-740, 1977.
- HARRISON Jr., A.P. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Archives of Microbiology*, v.131, p.68-76, 1982.
- HATCH, R.T.; MENAWAT, A. Biological removal and recovery of trace heavy metals. *Biotechnology Bioengineering Symposium Series*, v.8, p.191-203, 1978.
- HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1994, 436p.
- INGLEDEW, W.J. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium Series*, v.16, p.23-34, 1986.
- JOHNSON, D.B.; HALLBERG, K.B. The microbiology of acidic mine waters. *Researches in Microbiology*, v.154, n.7, p.466-473, 2003.
- KARAN, G.; NATARAJAN, K.A.; MODAK, J.M. Estimation of mineral-adhered biomass of *Thiobacillus ferrooxidans* by protein assay—some problems and remedies. *Hydrometallurgy*, v.42, p.169-175, 1996.
- KARAVAICO, G.I.; GROUDEV, S.N. Biogeotechnology of metals, its history, tasks and trends of development. In: KARAVAICO, G.I.; GROUDEV, S.N. (Ed.). **Biogeotechnology of metals: Proceedings of International Seminar and Training Course**. Moscow: United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects, GKNT, 1985, p.6-24.
- KELLY, D.P.; WOOD, A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov. *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, v.50, p.511-515, 2000.
- KINZLER, K.; GEHRKE, T.; TELELDI, J.; SAND, W. Bioleaching – a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). In: CIMINELLI, V.S.T.; GARCIA Jr., O. (Eds.). **Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development, part A: bioleaching, microbiology and molecular biology**. Amsterdam: Elsevier, 2001, p.191-197.
- LEDUC, L.G.; TREVORS, J.T.; FERRONI, G.D. Thermal characterization of different isolates of *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, v.108, p.189-194, 1993.
- LITTLE, B.; WAGNER, P.; MANSFELD, F. An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochimica Acta*, v.37, p.2185-2194, 1992.
- MURRAY, A.D.; KIDBY, D.K. Sub-cellular location of mercury in yeast grown in the presence of mercuric chloride. *Journal of General Microbiology*, v.86, p.66-85, 1975.
- MURTHY, K.S.N.; NATARAJAN, K.A. The role of surface attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on the biooxidation of pyrite. *Minerals & Metallurgical Processing*, p. 20-24, 1992.
- OMAR, N.B.; MERROUN, M.L.; GONZALEZMUNOZ, M.T.; ARIAS, J.M. Brewery yeast as a biosorbent for uranium. *Journal of Applied Bacteriology*, v.81, p.283-287, 1996.

- PIVOVAROVA, T.A.; GOLOVACHEVA, R.S. Microorganisms important for hydrometallurgy: citology, physiology and biochemistry. In: KARAVAIKO, G.I.; GROUDEV, S.N. (Ed.). **Biogeotecnology of metals**. Moscow: Centre of International Projects, GKNT, 1985, p. 27-55.
- PORRO, S.; RAMIREZ, S.; RECHE, C.; CURUTCHET, G.; ALONSO-ROMANOWSKI, S.; DONATI, E. Bacterial attachment: its role in bioleaching processes. **Process Biochemistry**, v.32, p.573-578, 1997.
- PRONK, J.T.; JOHNSON, D.B. Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. **Geomicrobiology Journal**, v.10, p.153-171, 1992.
- RAWLINGS, D.E. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. **Journal of Applied Bacteriology**, v.51, p.267-275, 1981.
- RAWLINGS, D.E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur- oxidizing bacteria. **Hydrometallurgy**, v.59, p.187-201, 2001.
- RAZZELL, W.E.; TRUSSELL, P.C. Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. **Journal of Bacteriology**, v.85, p.595-603, 1963.
- ROBERTO, F.F.; BRUHN, D.F. Genetic improvement of acidophilic bacteria for biohydrometallurgy applications. **Geomicrobiology Journal**, v.10, p.249-255, 1993.
- ROBINSON, J.B.; TUOVINEN, O.H. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analyses. **Microbiological Reviews**, v.48, p.95-124, 1984.
- ROSSI, G. **Biohydrometallurgy**. Hamburg: McGraw-Hill, 1990, 609p.
- SAMPSON, M.I.; PHILLIPS, C.V.; BLAKE II, R.C. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. **Minerals Engineering**, v.13, p.373-389, 2000.
- SAND, W.; GERKE, T.; HALLMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism - a critical evaluation of bacterial leaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.961-966, 1995.
- SAND, W.; GERKE, T.; JOZSA, P.G.; SCHIPPERS, A. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v.59, p.159-175, 2001.
- SHARMA, P.K.; DAS, A.; RAO, K.H.; NATARAJAN, K.A.; FORSSBERG, K.S.E. Surface characterization of *Thiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. In: CIMINELLI, V.S.T.; GARCIA Jr., O. (Ed.). **Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development, part B: Biosorption and Bioremediation**. Amsterdam: Elsevier, 2001, p.589-598.
- SILVERMAN, M.P.; LUNDGREN, D.G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal of Bacteriology**, v.77, p.642-647, 1959.
- SINGELTON, I.; SIMMONS, P. Factors affecting silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.65, p.21-28, 1996.
- SMITH, J.R.; LUTHY, G.R.; MIDDLETON, A.C. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v.60, p.518-530, 1988.
- SOMASUNDARAN, P.; REN, Y.; RAO, M.Y. Applications f biological processes in mineral processing. **Colloids and Surfaces A**, v.133, p.13-23, 1998.
- SRIHARI, K.R.; GANDHI, K.S.; NATARAJAN, K.A. Role of cell attachment in leaching of chalcopyrite mineral by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.278-282, 1991.
- STRANDBERG, G.W.; SHUMATE, S.E.; PARROTT, J.R., Jr. Microbial cells as biosorbents of heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.237-246, 1981.
- SUMMERS, A.O.; SILVER, S. Microbial transformations of metals. **Annual Review of Microbiology**, v.32, p.637-672, 1978.
- TAUSEEF, R.B.; ECKLER, D.J. Yeast metallothionein and applications in biotechnology. **Microbiological Reviews**, v.51, p.351-364, 1987.
- TEMPLE, K.L.; COLMER, A.R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v.62, p.605-611, 1951.
- TRIBUTSCH, H. Direct versus indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v.59, p.177-185, 2001.
- TRIBUTSCH, H.; ROJAS-CHAPANA, J.A. Metal sulfide semiconductor electrochemical mechanism induced by bacterial activity. **Electrochimica Acta**, v.45, p.4705-4716, 2000.
- TUOVINEN, O.H. Acid leaching of uranium ore materials with microbial catalysis. **Biotechnology and Bioengineering Symposium Series**, v.16, p.65-72, 1986.
- TUOVINEN, O.H.; BHATTI, T.M.; BIGHAM, J.M.; HALLBERG, K.B.; GARCIA Jr., O.; LINDSTROM, E.B. Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3268-3274, 1994.

- TUOVINEN, O.H.; KELLY, D.P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v.88, p.285-298, 1973.
- TUOVINEN, O.H.; PANDA, F.A.; TSUSHUJA, H.M. Nitrogen requirements of iron- oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.954-958, 1979.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1898-1901, 1987.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. Influence of interfaces on microbial activity. **Microbiological Reviews**, v.54, p.75-87, 1990.
- WILLIAMS, J.W.; SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme Microbial Technology**, v.6, p.530-537, 1984.
- ZEHNDER, A.J.B.; ZINDER, S.H. The sulfur cycle. In: HUTZINGER, O. (Ed.). **The handbook of environmental chemistry**, v.1, Part A. New York: Springer-Verlag, p.106-145, 1980.

*Bioprospecção da Diversidade
Microbiana Cultivável
e não Cultivável*

Raquel Silva Peixoto, Alexandre Soares Rosado e Rodrigo Gouvêa Taketani



I. Bioprospecção e ecologia microbiana

Durante os séculos, a humanidade sempre utilizou os recursos naturais para sua sobrevivência e desenvolvimento, mas a grande importância da biodiversidade foi sendo percebida aos poucos com o desenvolvimento biotecnológico, adquirido a partir do aprimoramento das técnicas de exploração dos recursos naturais, e a percepção de que quanto maior a variedade de produtos gerados por uma vasta gama de organismos, maior o potencial de utilização dos mesmos, e, consequentemente, maior o lucro.

Em inúmeros estudos recentes pode-se observar a citação do termo “bioprospecção” como diretriz para as atuais pesquisas em biotecnologia ambiental. Mas o que é Bioprospecção? Entre outras definições, pode-se dizer que seria a localização, avaliação e exploração sistemática e legal da diversidade de vida existente em determinado ambiente para fins comerciais, ou seja, a busca por produtos, genes e/ou organismos de interesse biotecnológico, seja na indústria (agropecuária e farmacêutica) ou na remoção de diferentes poluentes ambientais.

Na área da microbiologia, a busca por esses produtos de interesse para biotecnologia, pode ser feita por meio de diferentes metodologias que podem ser dependentes ou independentes do cultivo dos organismos que possuem esses genes e características desejadas. Cada vez mais, essas tecnologias ganham destaque por serem as ferramentas que proporcionarão o resgate desses importantes agentes biológicos dentro da enorme complexidade existente em ambientes naturais. Ou seja, quanto mais eficiente às técnicas aplicadas, maior a capacidade de selecionar organismos/genes de grande aplicabilidade.

Podemos cultivar microrganismos pertencentes a diversos grupos taxonômicos de interesse a partir de amostras ambientais, por meio da utilização de meios de cultura específicos ou enriquecidos, por exemplo, com um determinado composto a ser degradado (ex: Naftaleno etc). Uma alternativa é a busca por genes de interesse através da utilização de técnicas moleculares para a detecção de uma determinada seqüência específica, ou mesmo a busca aleatória de seqüências em amostras ambientais visando à descoberta de novos genes relacionados a importantes funções ecológicas e com uma possível aplicação biotecnológica. As aplicações dos agentes selecionados são diversas, e abrangem diferentes ramos de pesquisa e diferentes áreas na indústria.

A biotecnologia ambiental, por exemplo, pode ser entendida como um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos para eliminar poluentes ambientais, aumentar e melhorar de forma sustentável a produção agrícola, além de inúmeras outras aplicações, e vem sendo descrita como vantajosa quando comparada a

tratamentos químicos e físicos (WATANABE & BAKER, 2000). Essa abordagem implica na prospecção de organismos com potencial para eliminação ou viabilização de poluentes, o que atrai atualmente grandes investimentos por parte de agências de fomento e indústrias interessadas em tecnologias menos agressivas ao ambiente e que estejam de acordo com as tendências e iniciativas globais rumo a um mundo mais sustentável.

A preocupação com o meio ambiente e a preservação do planeta está direcionando a preferência dos consumidores em diversos países, gerando a implantação de diretrizes mais “ecológicas” nas empresas. A partir disso surgiu o “selo verde” que indica que produtos são fornecidos por empresas que tem comprometimento com a conservação ambiental e, portanto, merecem atenção especial por parte do consumidor. Essa iniciativa não só está premiando o produtor consciente como força os mais desocupados a se recolocarem no mercado com uma atitude mais responsável.

Na indústria farmacêutica, a corrida por fármacos de extenso espectro de aplicações também movimenta diversos estudos e é atualmente um mercado bastante promissor.

No agronegócio as aplicações englobam, entre outros exemplos, a busca por indicadores de qualidade de solo, melhoria genética de plantas e o controle biológico de pragas agrícolas.

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do planeta, que o torna foco de grande interesse internacional e inúmeras discussões sobre a implementação de regras que possibilitem sua utilização econômica da forma mais apropriada, ou seja, que assegurem o controle da exploração de forma sustentável e que impeçam a “biopirataria”. Esses temas merecem grande destaque e necessitam uma ampla divulgação e debate entre a comunidade científica, os órgãos governamentais e a sociedade, para que a bioprospecção de microrganismos realmente traga benefícios sociais e econômicos e que seja preservado o direito à propriedade intelectual.

Os elementos biológicos residentes no solo são compreendidos como uma comunidade complexa e rica, difícil de ser estudada. Entretanto, à medida que os limites de cada técnica de pesquisa vão sendo reconhecidos, a aplicação de métodos apropriados pode proporcionar uma caracterização adequada da estrutura e das funções da comunidade microbiana do solo (MAZZOLA, 2004).

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e de ciclos biogeoquímicos. A ecologia de microrganismos do solo e o estudo de sua participação nas interações com as plantas e o funcionamento do ecossistema, sua dinâmica e produtividade, se destacam como áreas de grande interesse científico. A partir das últimas décadas, o desenvolvimento de metodologias rápidas e eficientes para avaliar e monitorar a comunidade microbiana do solo, em relação a sua composição, diversidade, biomassa e seu impacto sobre a fertilidade e a sustentabilidade do mesmo, vem sendo uma das prioridades entre diversos grupos de pesquisa.

O desenvolvimento de estudos na área que foi denominada “Ecologia Microbiana Molecular”, iniciados em meados dos anos 90, mostrou aos cientistas o quanto pouco se conhecia a respeito das populações microbianas no meio ambiente. Apesar de sua grande importância na manutenção do equilíbrio da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (ROSADO *et al.*, 1997).

Apesar dos microbiologistas estarem investigando o impacto da diversidade microbiana sobre a estabilidade do funcionamento de ecossistemas desde os anos 60 (GARBEVA, VAN VEEN, VAN ELSAS, 2004), atualmente o interesse sobre o efeito que a diversidade da comunidade microbiana tem sobre as funções ecológicas e a resiliência em solos impactados vem crescendo consideravelmente e está intimamente relacionado à prospecção de funções de interesse econômico e ambiental. As relações são muitas vezes observadas entre a extensão da diversidade microbiana no solo, qualidade do solo e da planta e sustentabilidade do ecossistema. Além disso, muitos estudos vêm documentando as relações entre o grau de supressão de doenças de plantas e a diversidade ou abundância da comunidade microbiana (AGRIOS, 1997).

Atualmente é extremamente aceito o fato de que apenas as técnicas tradicionais de cultivo de microrganismos não são suficientes para uma exploração mais abrangente da comunidade microbiana e suas funções ecológicas em ambientes naturais. Muitos pesquisadores vêm então se concentrando em estudos ambientais com a utilização de técnicas de biologia molecular (WATANABE & BAKER 2000; COWAN *et al.*, 2005). Entretanto, apesar da grande contribuição das novas ferramentas moleculares para estudos em biodiversidade, as técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo são também importantes para o conhecimento da capacidade metabólica e das características fenotípicas dos microrganismos, sendo necessária uma abordagem através de vários enfoques (polifásica) para se chegar o mais próximo possível ao quadro real de um ambiente (ROSADO *et al.*, 1997; MUYZER & SMALLA, 1998).

As técnicas baseadas em cultivo de microrganismos associadas com a utilização de técnicas de biologia molecular para caracterização dos isolados, oferecem uma grande possibilidade de seleção de diversos organismos que possuam funções biológicas específicas e de interesse comercial. Entretanto, atualmente uma nova opção vem sendo reportada e utilizada de forma bastante promissora para driblar a barreira de ainda não conhecermos as necessidades nutricionais e características fisiológicas da grande maioria dos microrganismos; É a metagenômica, ou seja, a seleção de genes diretamente de uma amostra ambiental sem ser necessária a utilização de meios de cultura, sondas ou marcadores específicos para determinado grupo de organismos, e sim a direta utilização do material genético contido na amostra.

Ao longo deste capítulo iremos detalhar alguns exemplos das aplicações da bioprospecção em solos, ressaltar a importância de abordagens complexas para a avaliação de agentes com potencial de uso comercial, além de discutir mais detalhadamente as aplicações da metagenômica como alternativa de prospecção independente de cultivo ou de conhecimento prévio de seqüências gênicas, assim como suas aplicações.

2. Bioprospecção de microrganismos cultiváveis

2.1 Biorremediação

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) define o termo atenuação natural como “A biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização e/ou estabilização química e bioquímica do contaminante para reduzir efetivamente sua toxidez, mobilidade ou volume a níveis que não ofereçam risco à saúde humana e ao ecossistema” (NYER *et al.*, 1998). Esta definição engloba tanto os processos bióticos quanto os abióticos para reduzir os níveis do contaminante. No entanto, a biodegradação é o mecanismo primário para atenuar os contaminantes que são biodegradáveis. De acordo com Nyer e colaboradores (1998), o termo biorremediação se refere, portanto, a todas as reações bioquímicas da atenuação natural. Esta tecnologia está sendo considerada adequada porque oferece baixos riscos aos sítios contaminados e é uma alternativa que favorece a relação custo-benefício do tratamento (KORDA *et al.*, 1997, CRÁPEZ *et al.*, 2002).

O princípio da biorremediação se baseia na prospecção de populações microbianas que possuam a habilidade de modificar ou decompõe determinados poluentes. Pode-se utilizar a ação e/ou adição de microrganismos indígenas, assim como provenientes de outros sítios ou estirpes modificadas geneticamente. O principal objetivo é obter níveis de degradação até o limite de detecção do poluente ou abaixo dos valores aceitáveis ou estabelecidos pelas agências reguladoras. O benefício máximo deste processo é a completa mineralização dos compostos assim como formação de biomassa (ATLAS, 1994; CUNHA & LEITE, 2000; WATANABE & HAMAMURA, 2003). A utilização de microrganismos da biota natural é preferível aos provenientes de outros sítios ou aos microrganismos modificados geneticamente, pois não necessita de um monitoramento mais incisivo e é mais “natural” do ponto de vista ecológico: as chamadas “tecnologias verdes” (KORDA *et al.*, 1997).

O desenvolvimento da biorremediação como uma ferramenta útil na recuperação de solos contaminados tem sido, em grande parte, baseado no aumento do conhecimento da fisiologia, ecologia e bioquímica das populações degradadoras presentes no solo e de como os contaminantes são metabolizados pelos microrganismos.

Diversas variáveis têm sido relacionadas com a eficiência dos processos de biodegradação de poluentes, como as características físico-químicas do solo. A concentração de oxigênio, por exemplo, foi determinada como uma variável limitante na degradação de hidrocarbonetos no solo e em ambientes aquáticos (KORDA *et al.*, 1997). Geralmente, quanto maior o suprimento de oxigênio mais rapidamente ocorre a biodegradação. Entretanto, a degradação microbiana de hidrocarbonetos também tem sido demonstrada em condições de anaerobiose, porém, o processo é bem mais lento (HEIDER *et al.*, 1999). O nitrato pode atuar como acceptor final de elétrons em condições de desnitrificação (HEIDER *et al.*, 1999).

A participação dos microrganismos nos processos de biodegradação de diferentes poluentes é uma função do ecossistema e das condições locais do ambiente. A microbiota heterotrófica da maioria dos solos/sedimentos inclui a população degradadora de poluentes. Essa característica inerente proporciona um grande potencial assimilatório dos poluentes. Assim sendo, a adição do poluente ao solo, acidental ou propositalmente, enriquece, seletivamente, a comunidade capaz de utilizar esse substrato. Mudanças no número e na atividade dos microrganismos do solo, em resposta à contaminação por combustíveis foram observadas por diversos autores (ERICKSON *et al.*, 1999; JUCK *et al.*, 2000).

A biorremediação explora a diversidade genética e a versatilidade metabólica dos microrganismos para a transformação de contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (ALEXANDER, 1994). O conhecimento da diversidade bacteriana e os estudos da diversidade microbiológica são essenciais para o entendimento do papel das comunidades microbianas nos diferentes processos que ocorrem nos ecossistemas (HUGENHOLTZ & PACE, 1996; ROSADO *et al.*, 1997).

Várias condições devem ser satisfeitas para que a biodegradação aconteça em determinado ambiente, entre elas: a) existência de organismos que possuam as enzimas necessárias para que os processos ocorram. É necessária à presença de organismos com potencial catabólico, mas nem sempre suficiente para que a biodegradação se processe; b) Que este organismo esteja presente no ambiente que contenha as substâncias a serem biodegradadas. Apesar de muitos microrganismos estarem presentes em muitos ambientes, sítios específicos podem não conter o organismo que possui as enzimas necessárias; c) A substância deve estar acessível ao organismo que contém estas enzimas. Muitas vezes a persistência se deve ao fato do microrganismo não ter acesso ao composto que ele tem capacidade de metabolizar.

Uma variedade de tecnologias e procedimentos para a biorremediação de petróleo em solos tem sido utilizada atualmente, e um grande número de novos procedimentos tem se mostrado promissor. Dentre eles a biorremediação *in situ*, na qual não há remoção do material contaminado para outros locais. Estas remoções aumentam o custo do processo de biorremediação e nem sempre são possíveis (ALEXANDER, 1994). Dentre as tecnologias *in situ*, a bioestimulação e a bioaumentação são as mais citadas na literatura.

A bioestimulação é o processo de biorremediação que estimula o crescimento dos microrganismos nativos do local contaminado, através da correção de pH, balanceamento de nutrientes em relação à carga de carbono do poluente orgânico através da adição de N e P, aeração do solo e correção da umidade. Os microrganismos autóctones são aqueles pertencentes às espécies nativas de regiões biogeográficas, onde participam no ciclo de nutrientes e fluxo de energia daquele ecossistema. A bioaumentação é o processo no qual são introduzidos no ambiente microrganismos cujo potencial de degradação é conhecido, mas que podem ter sido isolados daquele ou de outro local (ATLAS, 1994).

Quanto aos genes de importância na biorremediação, suas funções estão relacionadas ao poluente em questão. A prospecção é feita a partir da busca de genes relacionados à degradação do poluente em questão. A partir daí inúmeras

estratégias poderão ser abordadas na busca pelos organismos e/ou genes de interesse que podem tanto ser baseadas no cultivo de microrganismos quanto em técnicas moleculares de rastreamento.

2.2 Controle biológico de pragas agrícolas

Ambientes naturais tendem a estar em equilíbrio, onde os organismos dependem uns dos outros e também restringem uns aos outros pela competição por fontes de alimento, parasitismo, predação etc. A ação humana pode influenciar esse sistema, e isso pode ser facilmente exemplificado quando um organismo exógeno é introduzido, propositalmente ou por acidente, em um novo ambiente.

O surgimento de algumas pragas agrícolas é consequência direta ou indireta da introdução de organismos estrangeiros, onde estes podem encontrar em um novo ambiente um lugar livre de “predação” e competição, se estabelecendo de forma descontrolada. O controle biológico é definido em linhas gerais como “o uso de organismos selvagens ou modificados, genes ou produtos gênicos para diminuir os efeitos produzidos por pragas e doenças” (COOK, 1986).

A prospecção de organismos com potencial uso no controle de pragas agrícolas, engloba a busca de genes relacionados aos diversos mecanismos de antagonismo microbiano, que incluem competição por nutrientes e espaço, indução de resistência por parte da planta e produção de diferentes antibióticos, sideróforos e enzimas que conferem a antibiose.

Podemos citar, por exemplo, alguns antibióticos com propriedades de biocontrole já bem caracterizados como as fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorinas, pirrolnitrina e cianeto de hidrogênio. Outro exemplo são as enzimas relacionadas a relações antagonistas como a quitinase responsável pela degradação da parede celular de fungos e que muitas vezes está relacionada ao controle de fungos fitopatogênicos.

A prospecção de agentes de biocontrole pode também estar relacionada à indução de resistência ou à promoção de crescimento da planta por parte dos microrganismos.

2.2.1 Rizosfera: Grande reservatório de agentes de biocontrole

As raízes das plantas liberam uma enorme variedade de compostos no solo adjacente, que inclui aminoácidos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, etileno e enzimas. Esse material cria um ambiente único para microrganismos que vivem associados às raízes das plantas, na rizosfera. A rizosfera foi primeiramente descrita (por HILTNER 1904, APUD GARBEVA, VAN VEEN, VAN ELSAS, 2004) como o volume de solo adjacente a raízes de plantas e influenciado pelas raízes vivas.

Bactérias respondem diferentemente aos compostos liberados pela raiz. Sendo assim, espera-se que diferentes composições de exsudatos de raiz selezionem diferentes comunidades da rizosfera. Por outro lado, as bactérias da rizosfera também

irão influenciar as plantas, como, por exemplo, promover o crescimento de plantas, através de produção de substâncias químicas como citocininas, giberilinas, glicolipídios e auxinas (BERTRAND *et al.*, 2001).

As bactérias que interagem com plantas e são capazes de colonizar e persistir em suas raízes são denominadas rizobactérias (WELLER & THOMASHOW, 1994). Esses organismos podem estabelecer interações neutras, deletérias ou positivas em relação ao desenvolvimento da planta (LAMBERT *et al.*, 1987).

Entre os microhabitats relacionados às plantas, a rizosfera é tida como o maior reservatório de bactérias antagonistas a fitopatógenos. Nesse ambiente, diversos gêneros microbianos possuem estirpes com alguma atividade de antagonismo descrita, como por exemplo, bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Variovorax* e *Phyllobacterium* (BERTRAND *et al.*, 2001; BERG *et al.*, 2002).

Muitos estudos já demonstraram a habilidade de diversas bactérias em inibir doenças causadas por fungos ou por outras bactérias. Entretanto, ainda se faz necessário um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos em cada antagonismo, assim como sobre a capacidade de colonização das raízes (PEIXOTO *et al.*, 2004).

Uma das grandes dificuldades em se utilizar uma rizobactéria antagonista como uma alternativa viável de biocontrole é que a maioria dos agentes de controle biológico é muito variável quanto a sua performance. De acordo com Raaijmakers & Weller (2001), esta inconsistência ocorre principalmente devido à variação da expressão dos genes envolvidos no antagonismo e de uma colonização insuficiente da rizosfera. Assim, dois fatores são considerados extremamente importantes para um bom agente de controle biológico de pragas agrícolas: Primeiro, ele deve possuir um mecanismo de inibição do patógeno. Segundo deve ser capaz de colonizar a rizosfera da planta, o que fará com que a bactéria benéfica possa estar “no lugar certo na hora certa” (CHIN-A-WOENG *et al.*, 1997).

A colonização eficiente da rizosfera vem sendo reportada como a grande limitação da aplicação de agentes de controle biológico em campo (SCHIPPERS LUGTENBERG & WEISBEEK, 1987; WELLER, 1998; BERG *et al.*, 2000; LUGTEMBERG, DEKKER & BLOEMBERG, 2001; RAAIJAMAKERS & WELLER, 2001), e, portanto, o desenvolvimento de ferramentas de monitoramento do processo de colonização é extremamente necessário para se rastrear e/ou desenvolver estirpes que possuam uma boa atividade de biocontrole em condições de campo (CHIN-A-WOENG *et al.*, 1997).

2.2.2 Exemplos de estudos utilizando controle biológico

O sucesso da aplicação de um agente de biocontrole é avaliado, normalmente, através da observação da diminuição dos sintomas causados pelo patógeno. Ainda não se conhecem todos os mecanismos que levam uma bactéria a se estabelecer na rizosfera e promover ação antagonista a um patógeno, e muitas vezes a falha na utilização em campo ou casa-de-vegetação de determinado agente de biocontrole

permanece sem explicação. Dessa forma, estudos que esclareçam essas relações e desenvolvam estratégias confiáveis de monitoramento dos agentes de controle biológico são cruciais para o entendimento dos mecanismos que interferem na colonização e expressão de genes ligados ao antagonismo em ambientes não estéreis (GÖTZ *et al.*, 2005).

Como exemplo, podemos citar o trabalho de Brewster, Spiers e Hopcroft (1997) que mostrou a ação antagonista da estirpe *E. aerogenes* B8 no controle de *Phytophthora cactorum*, um fungo patogênico causador de grandes perdas na produção de maçãs em pomares na Nova Zelândia. Outros trabalhos reportam uma importante atividade de biocontrole exercida por estirpes de *E. cloacae* no controle biológico de *Pythium ultimum*, causador do “damping-off” em diversas culturas agrícolas (NELSON *et al.*, 1986; LOPER *et al.*, 1993).

O grande potencial no uso de *Pseudomonas* fluorescentes no controle de *R. solanacearum* vem sendo reportado em diversos estudos (BERG *et al.*, 2002; HAAS & KEEL, 2003; GARBEVA, VAN VEEN & VAN ELSAS, 2004), mas em alguns casos, além da redução significativa da doença em experimento de casa-de-vegetação, há também melhora na produtividade da cultura da planta avaliada. Khalequzzaman e colaboradores (2002) puderam observar não apenas o controle de *R. solanacearum* em tomateiro por *P. fluorescens*, como também o aumento na produção de tomates.

Muitos estudos já demonstraram a influência da espécie de planta sobre a comunidade microbiana associada a ela (BERTRAND *et al.*, 2001; GARBEVA, VAN VEEN & VAN ELSAS, 2004). Podemos citar dois estudos conduzidos sobre rizosfera de nabo (*Brassica napus*), um por Germida e colaboradores (1998) e outro por Kaiser, Puhler & Selbitschka (2001), que reforçam a hipótese de que o tipo de planta influencia mais a diversidade de bactérias associadas a raiz do que o tipo de solo.

O primeiro estudo utilizou métodos independentes de cultivo, enquanto o segundo avaliou abordagem dependente e independente (biblioteca do gene 16S rDNA) de cultivo. Apesar de cada estudo ter utilizado tipos de solos diferentes, ambos indicaram fortemente que o tipo de planta tem um grande papel na composição da comunidade bacteriana associada a rizosfera, enquanto o tipo de solo, nos dois casos, apresenta um papel muito menos significativo.

Smalla e colaboradores (2001) avaliaram os efeitos de três diferentes plantas (Batata (*Solanum tuberosum* L.), nabo (*Brassica napus* L.) e morango (*Fragaria ananassa* Duch.)) sobre a comunidade bacteriana da rizosfera, através de PCR-DGGE, e também, se esse efeito era afetado durante o crescimento da mesma cultura após dois anos consecutivos. Esse estudo também demonstrou que as mudanças nas perfis das populações bacterianas da rizosfera eram totalmente dependentes da planta relacionada a rizosfera, e que esse efeito era mais expressivo no segundo ano de cultivo das mesmas.

Lagopodi & colaboradores (2002) acompanharam a colonização de raízes estéreis de tomateiro, pelas estirpes de biocontrole *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 e *P. chlororaphis* PCL 1391 marcadas com *gfp* e pelo fungo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* marcado com *ds-red* (Proteína vermelho-fluorescente) através de microscopia confocal. Eles observaram que a colonização

da rizosfera era muito mais rápida e acentuada pelas estirpes de *Pseudomonas* por eles utilizadas em comparação a colonização da raiz pelo fungo. Esse resultado se mostrou bastante promissor na aplicação dessas estirpes no biocontrole do patógeno, já que indicou uma boa habilidade de colonização das estirpes avaliadas, entretanto não se sabe se seria observado o mesmo resultado em solo não estéril.

Outro trabalho recente relatou o rastreamento eficiente de quatro estirpes antagonistas a *R. solanacearum* identificadas como *Pseudomonas putida* PRD 16, PRD 18, PRD 38 e *Enterobacter cowanii* PRF 116, previamente caracterizadas e marcadas com *gfp* na rizosfera de tomateiro através de microscopia confocal e plaqueamentos. O experimento desenvolvido nesse trabalho está representado na Figura 1. As marcações com resistência à rifampicina, e com GFP tornaram as estirpes mais fáceis de serem monitoradas através de meios seletivos, uma vez que o plasmídio carreador do *gfp* também conferiu resistência à gentamicina, à canamicina e à estreptomicina (PEIXOTO *et al.*, 2004, PEIXOTO 2005).

Os dados obtidos através de plaqueamento seletivo, em meio com antibióticos, mostraram a presença de um número expressivo das células marcadas com a resistência a antibióticos para as amostras de rizosfera inoculadas com as quatro diferentes estirpes. Todas as estirpes analisadas apresentaram contagens elevadas de unidades formadoras de colônia no meio contendo rifampicina e gentamicina durante todo o experimento (superior a 10^6 cfu/g de raiz fresca), mostrando uma boa taxa de

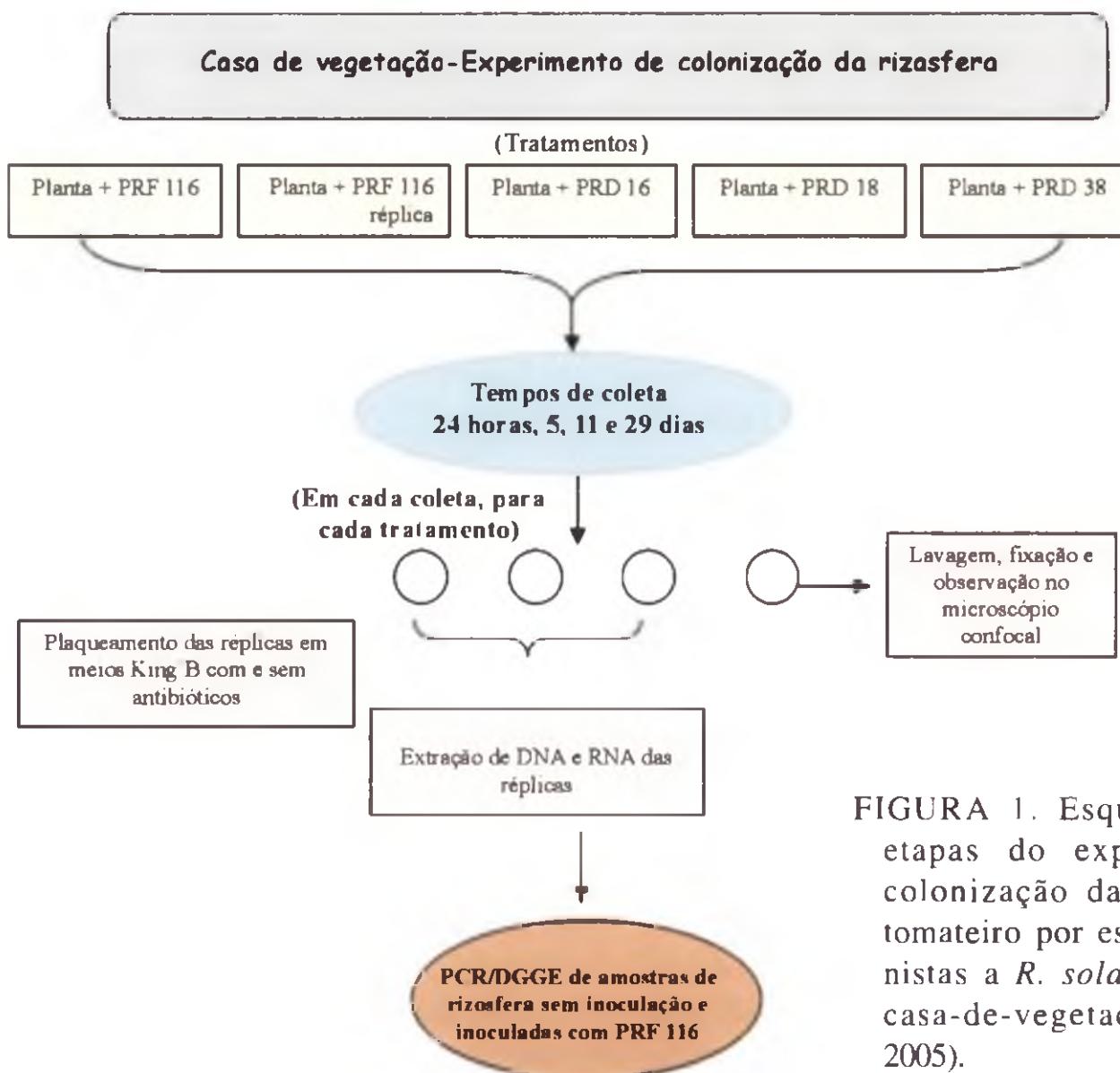


FIGURA 1. Esquema com as etapas do experimento de colonização da rizosfera de tomateiro por estirpes antagonistas a *R. solanacearum* em casa-de-vegetação (Peixoto 2005).

sobrevivência das células. Outro ponto relevante é o fato de que o plasmídio IncQ utilizado para a marcação com GFP, que também carreava resistência à gentamicina, se manteve estável ao longo das coletas. Esse é um de poucos estudos demonstrando a estabilidade de plasmídio IncQ em rizosfera durante um período relativamente longo de tempo. Esse dado é bastante relevante devido à importância da utilização de plasmídios IncQ (que possuem um amplo espectro de hospedeiros) em estudos de ecologia microbiana.

A microscopia confocal foi extremamente importante para a observação e localização da estirpe na raiz, além de permitir especular sobre sua atividade metabólica (Figura 2). Para todas as estirpes, foi observado que a colonização se dava preferencialmente nas raízes primárias e pêlos de raízes, sendo muito raro encontrar células marcadas em raízes mais jovens, o que sugere uma baixa taxa de migração das estirpes inoculadas para regiões mais jovens da raiz. Ao longo do tempo, as células localizavam-se preferencialmente nas bordas das raízes primárias ou próximas a células danificadas, provavelmente devido a maior disponibilidade de exsudatos.

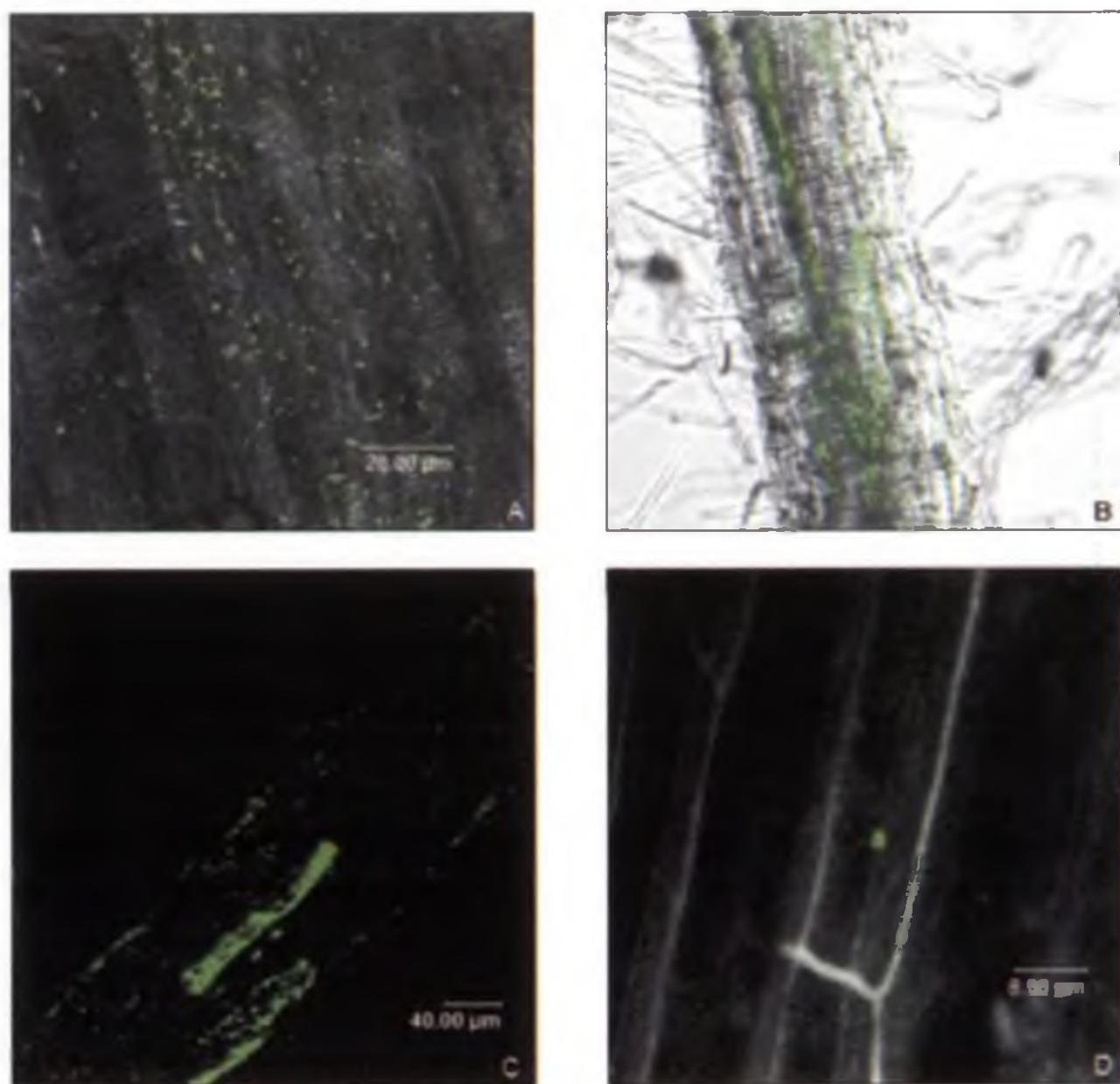


FIGURA 2. Fotos obtidas a partir de microscopia confocal a laser de amostras de rizosfera inoculadas com a estirpe PRF 116 marcada com GFP após diferentes tempos de inoculação: A, 24 horas após a inoculação; B, 24 horas após a inoculação; C, 5 dias após a inoculação; D, 29 dias após a inoculação (495-590 nm-série-z).

A detecção de bactérias marcadas com *gfp* em amostras da última coleta através do microscópio confocal, se tornou rara para todas as estirpes, não sendo possível detectar a estirpe *P. putida* PRD 38. Entretanto, ainda era possível detectar contagens elevadas de células de todas as estirpes antagonistas através do plaqueamento em meio seletivo.

Uma possível explicação seria uma baixa atividade metabólica da comunidade bacteriana na rizosfera nesse tempo de coleta. Nessa fase, foi possível observar que os vasos onde os tomateiros estavam plantados tornaram-se muito pequenos para o tamanho das raízes, que passaram a ocupar totalmente o espaço dos vasos. As plantas estavam visivelmente estressadas, e apresentavam-se relativamente murchas. Como descrito anteriormente, é conhecida a ação que a planta exerce sobre a comunidade bacteriana da rizosfera, e vice-versa (BERTRAND *et al.*, 2001; HASS & KEEL, 2003; GARBEVA, VAN VEEN & VAN ELSAS, 2004). Dessa forma é possível que os dois fatores, o estresse sofrido pela planta e uma baixa atividade das bactérias, estejam correlacionados.

Combinando os resultados das contagens e da microscopia confocal, foi possível avaliar que todas estavam colonizando a raiz de forma satisfatória variando entre si quanto à emissão de fluorescência possivelmente de acordo com seu estado metabólico.

A metodologia de PCR-DGGE utilizada também ajudou a corroborar os resultados obtidos para a estirpe PRF 116, que se mostrou a mais eficaz na colonização da rizosfera em todas as abordagens utilizadas.

Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam a grande importância de uma abordagem polifásica para se monitorar sistemas biológicos e avaliação da aplicação de organismos de uso biotecnológico, já que torna os resultados mais consistentes e confiáveis. Além disso, tanto as tecnologias baseadas em cultivo de microrganismos quanto as independentes do cultivo são importantes para gerar e utilizar um grande número de genes com potencial econômico.

3. Bioprospecção de microrganismos não cultiváveis

Desde a década passada, quando se verificou que a grande maioria dos microrganismos não estava representada nos experimentos de isolamento, a busca por ferramentas para estudar essa parcela das comunidades microbianas se tornou prioridade para grande parte dos microbiologistas ambientais. Deste modo, técnicas como DGGE, TGGE, FISH, T-RFLP, RISA, ARISA e seqüenciamento de bibliotecas de clone vêm sendo empregadas para avaliar a diversidade microbiana nos mais diversos ambientes (ROSADO & DUARTE, 2002). Essas técnicas, porém, embora altamente informativas, apresentam um grande problema, o fato de serem baseadas no conhecimento prévio da seqüência a qual se está pesquisando. Ou seja, qualquer polimorfismo na região para o qual a sonda empregada foi desenhada vai fazer com que aquele microrganismo não seja representado nas pesquisas. Deste modo, como todas as sondas foram inicialmente desenhadas baseadas em seqüências de organismos cultivados essas técnicas têm uma tendência para detectar organismos com grande similaridade aos representados em coleções de cultura.

Assim, como maneira de se estudar os organismos que não estavam representados tanto nos isolamentos quanto nos trabalhos de ecologia molecular surgiram os projetos de clonagem aleatória e seqüenciamento de clones de DNA ambiental (também chamado de metagenoma) independente de amplificação por PCR. Desta maneira, pesquisadores podem estudar indiretamente o metabolismo de microrganismos anteriormente não representados nos isolamentos.

Outro problema encontrado pelos microbiologistas é a relativamente baixa taxa de descoberta de novos bioproductos de origem microbiana, como enzimas, antibióticos e outros metabólitos de interesse industrial. Assim, passou a ser interessante para as empresas de biotecnologia buscar novos produtos nesses microrganismos ainda não cultivados, já que eles representam mais de 90% dos organismos encontrados nos ambientes e, portanto, apresentam grande potencial biotecnológico.

Esses estudos são divididos basicamente na aquisição do DNA ambiental, inserção em vetor de clonagem, transformação do vetor em microrganismo hospedeiro (normalmente *Escherichia coli*), seleção dos clones de interesse, seqüenciamento e anotação dos insertos dos clones selecionados. Cada uma dessas etapas irá variar dependendo do objetivo do trabalho em questão e cada uma dessas opções será apresentada abaixo em detalhe. Por fim, apresentaremos alguns dos principais resultados obtidos em alguns projetos de seqüenciamento do metagenoma.

3.1 Obtenção do DNA ambiental

Em qualquer trabalho de ecologia microbiana molecular a metodologia de extração de DNA ambiental é uma etapa chave na representatividade do estudo. As metodologias de obtenção de DNA se dividem basicamente em dois tipos: as de extração direta (OGRAM *et al.*, 1987), onde as células são lisadas diretamente da amostra; e as indiretas onde as células são inicialmente separadas das amostras ambientais e posteriormente é feita a lise celular (HOLBEN, *et al.*, 1988). A primeira é considerada mais representativa, pois seria capaz de lisar as células que estariam aderidas aos agregados do solo. Já a extração indireta gera DNA de melhor qualidade, ou seja, com maior peso molecular.

Devido à heterogeneidade, extensão da diversidade e aderência dos microrganismos às partículas, a extração de DNA de amostras ambientais é particularmente complicada (MARTIN-LAURENT *et al.*, 2001). Outro fator que influencia muito a qualidade do DNA extraído é a presença de ácidos húmicos. Ao se extrair os ácidos nucléicos de amostras ambientais, quando estas substâncias estão presentes na amostra elas serão co-extraídas. Os ácidos húmicos interferem na ação de enzimas como as enzimas de restrição, e DNA polimerases, levando a baixa eficiência na clonagem e transformação (TEBBE E VAHJEN 1993).

Desta maneira, a construção de bibliotecas complexas, derivadas de amostras ambientais, e a clonagem de genes funcionais é dependente da alta qualidade do DNA extraído. Assim, como a extração direta das células normalmente inclui etapas com altas temperaturas, lise mecânica ou congelamento e descongelamento da amostra para obter a lise das células, o DNA obtido por esse tipo de metodologia é mais

fragmentado que o obtido por extração indireta. Na maioria dos casos o DNA mais fragmentado (de menor tamanho), é mais apropriado para construção de bibliotecas de clones de insertos pequenos (HENNE *et al.*, 1999; MAJERNIK, GOTTSCHALK. & DANIEL, 2001; GUPTA, BERG & LORENZ, 2002, KNIETSCH *et al.*, 2003), embora alguns estudos tenham utilizado DNA obtido por esse tipo de metodologia para construção bibliotecas de insertos grandes (RONDON *et al.*, 2000; ENTCHEVA *et al.*, 2001; MACNEIL *et al.*, 2001). Já a extração de DNA por lise indireta é mais apropriada para construção de bibliotecas de insertos grandes (COURTOIS *et al.*, 2003). O uso dessa ultima estratégia é vantajoso também no caso de amostras contendo altas concentrações de substâncias que interferem nas reações enzimáticas necessárias para construção da biblioteca, pois podem muitas vezes ultrapassar os problemas causados por estes. De qualquer maneira, nenhum tipo de extração será apropriado a todos os tipos de ambiente, ou seja, cada tipo de ambiente requer um tipo de extração específico para suas características e diversas metodologias diferentes podem ser encontradas na literatura, assim como diversos kits comerciais também são facilmente adquiridos e apresentam bons resultados.

3.2 Construção da biblioteca

Conforme já citado acima, as bibliotecas são divididas em dois tipos, as de insertos grandes em cosmídeos, fosmídeos (até 40Kb) e BACs (além de 40Kb) e as de insertos pequenos em plasmídeos (menos de 15Kb). A escolha do vetor a ser utilizado depende da qualidade do DNA obtido (conforme descrito acima), o tamanho do inserto desejado, o número de copias requerido, o hospedeiro e a estratégia de seleção de clones a ser utilizada (essa última dependerá principalmente do objetivo do estudo, conforme será analisado mais tarde nesse capítulo) (DANIEL, 2005).

As bibliotecas de insertos pequenos são mais apropriadas para isolamento de genes individuais e pequenos operons que codifiquem para novas funções metabólicas (HENNE *et al.*, 1999; HENNE, *et al.*, 2000; KNIETSCH *et al.*, 2003). Já as bibliotecas de insertos grandes são mais apropriadas para recuperar vias complexas codificadas por fragmentos grandes de DNA (BRADY & CLARDY, 2000; RONDON *et al.*, 2000; COURTOIS *et al.*, 2003).

Além desse fato deve-se levar em consideração o tamanho da biblioteca a ser construída. Obviamente número de clones vai depender da complexidade da amostra e do objetivo do trabalho. Foi estimado que seria necessário 10^7 clones de plasmídeos, contendo insertos de 5Kb, ou 10^6 clones de BAC, com insertos de 100Kb para se representar os genomas de todos as diferentes espécies procarióticas presentes em um grama de solo (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Essas estimativas são baseadas nas espécies estarem igualmente representadas nas amostras, quando se deseja obter uma biblioteca capaz de representar membros raros da comunidade (menos de 1%) foi calculado que se deve obter cerca de 10^{11} clones de BAC (RIESENFIELD, GOODMAN & HANDELSMAN, 2004). Assim, as bibliotecas obtidas nos trabalhos publicados até o momento não podem ser consideradas representativas dos ambientes estudados (DANIEL, 2005).

O número de clones pode ser consideravelmente menor quando se buscam novos genes em um ambiente onde o tipo de metabolismo procurado encontrado em altas taxas, ou seja, onde se saiba que grande parte dos microrganismos está ligada àquela função ecológica, como, por exemplo, genes de fixação biológica de nitrogênio em solos onde há alta taxa de fixação de nitrogênio a longa data. Pois, dessa maneira, os genes ligados a esse metabolismo estarão mais representados dentro da biblioteca se comparados a um ambiente onde esse metabolismo é pouco encontrado, assim necessitando de um número menor de clones para se encontrar o metabolismo desejado.

Quanto ao hospedeiro da biblioteca, a grande maioria dos trabalhos tem usado *Escherichia coli* como hospedeiro. Sendo que alguns trabalhos têm reportado um número baixo de clones positivos para os metabolismos desejados (LORENZ & ECK, 2005). Esse fato provavelmente se deve à dificuldade de expressão heteróloga de algumas enzimas devido à incapacidade da *E. coli* expressar a enzima ou à toxicidade dos produtos do inserto. Como maneira de aumentar a amplitude de produtos detectáveis em uma biblioteca, alguns hospedeiros alternativos já foram propostos como *Rhizobium leguminosarum* (*Alphaproteobacteria*), *Bacillus* sp. (*Firmicutes*), ou *Streptomyces lividans* (*Actinobacteria*) e estão em desenvolvimento (MARTINEZ *et al.*, 2004; KANEKO *et al.*, 2005). No momento, existem dados na literatura sobre a busca de “novos genes” utilizando *Streptomyces* como hospedeiro (WANG *et al.*, 2000) e o uso de vetores do tipo “shuttle” para transferir bibliotecas de *E. coli* para hospedeiros do tipo *Streptomyces* e *Pseudomonas* (COURTOIS *et al.*, 2003, MARTINEZ *et al.*, 2004).

3.3 Seleção de clones

A etapa de seleção de clones de uma biblioteca também pode ser considerada uma etapa chave em um projeto de seqüenciamento do metagenoma. Essa etapa é a mais delicada e trabalhosa de um trabalho de metagenômica e da qual dependerá o sucesso do trabalho em questão. As metodologias de seleção podem ser divididas em dois tipos: baseadas em seqüência e baseadas em função. Ambas têm seus prós e contras, assim, pelo restante desta seção iremos nos ater a descrever em maiores detalhes as duas opções, pois essa escolha vai nortear os resultados a serem obtidos.

A análise por seqüência é fundamentada no uso de regiões conservadas do DNA para desenhar sondas ou iniciadores de PCR para selecionar clones que contêm certa seqüência de interesse (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003). Uma das vantagens é que esta não é dependente da expressão da determinada característica pelo hospedeiro, além de ser baseada em métodos de análise bastante confiáveis como PCR, hibridação de colônias e microarray (DANIEL, 2004).

Como as sondas e iniciadores são desenhados com base em regiões conservadas de genes conhecidos, apenas variantes de classes funcionais destas proteínas podem ser identificadas dentre os clones obtidos. Outra desvantagem é o fato deste método não ser seletivo para genes completos apenas, assim pode-se selecionar clones com seqüências parciais dos genes escolhidos (KNIETSCH, *et al.*, 2003).

Esse método tem sido amplamente usado para seleção de clones carregando genes marcadores filogenéticos como o gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) (BEJA *et al.*, 2000; QUAISER *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 1996). Essa abordagem é bastante objetiva quando se pretende adquirir informações sobre o metabolismo de microrganismos cujo grupo não há ainda nenhum representante cultivado. Ou sobre um organismo dominante em um dado ambiente e ainda não cultivado. Assim, o seqüenciamento de um clone contendo um fragmento do genoma deste organismo traria uma informação de extrema importância para se entender o papel desse organismo no ambiente.

Esse método, conforme já mencionado, como utiliza regiões conservadas de genes conhecidos, torna difícil à identificação de novas proteínas variantes que exerçam uma mesma função metabólica, pois estas podem ser divergentes demais para serem identificadas por PCR e hibridação.

Por essa razão, a grande maioria dos projetos que tem como objetivo o isolamento de novos bioproductos, utilizando métodos de seleção baseados em função, onde se buscam clones capazes de expressar a função desejada. Como não é necessária nenhuma informação prévia sobre a seqüência, essa é a melhor estratégia com potencial de descoberta de novas classes de genes que codifiquem funções tanto novas como também conhecidas (DANIEL, 2005).

Os métodos baseados em função dependem da capacidade de se testar um imenso numero de clones da biblioteca para a produção da enzima ou metabólito desejado, para isso se deve padronizar testes em larga escala, pois, a maioria dos testes não são adequados para avaliar de modo simples e rápido, uma quantidade de clones que pode facilmente ultrapassar o numero de 100000. Além disso, essa abordagem depende da existência de um teste simples para indicar a presença do metabolismo no clone, o que em alguns casos pode tornar impossível a avaliação da biblioteca por esse tipo de metodologia. Entretanto, a utilização desse método, permite que quando um clone ativo for encontrado, esse possa posteriormente ter seu metabolismo caracterizado bioquimicamente, o que nem sempre é possível quando se trabalha com métodos baseados em seqüência.

Recentemente um terceiro método de seleção tem se mostrado promissor, o SIGEX (Substrate-Induced Gene Expression: Expressão gênica induzida por substrato). Esse método tem como objetivo selecionar clones contendo genes ou vias de catabolismo (UCHIYAMA *et al.*, 2005). Essa técnica baseia-se no fato desses genes serem normalmente induzidos pelo seu substrato e suas regiões reguladoras serem próximas a eles. Assim, com a construção de um vetor contendo o gene repórter *gfp* (green-fluorescent protein: proteína fluorescente verde) posicionado na região 3' do inserto (sobre o controle das regiões reguladoras do inserto), as células contendo regiões reguladoras induzidas pelo substrato apresentaram fluorescência verde pela expressão do gene *gfp*. Dessa maneira, as células fluorescentes podem ser separadas das demais em citometria de fluxo com seleção de células (cell sorting). Essa técnica tem grande potencial para a seleção de clones em larga escala, pois pode rapidamente separar as células capazes de induzir a fluorescência (DANIEL, 2005).

Além dessas metodologias de seleção de clones, existem ainda alguns projetos onde essa etapa simplesmente não é realizada, que são os seqüenciamentos aleatórios

do DNA ambiental. Nesses, toda a biblioteca metagenômica, normalmente de insertos pequenos, é seqüenciada. Até agosto de 2005, dois grandes projetos deste tipo foram publicados, o primeiro, o seqüenciamento do DNA de um biofilme proveniente do sistema de drenagem de uma mina ácida (TYSON *et al.*, 2004). O segundo trabalho, Metagenoma do mar do Sargasso, foi publicado em seguida, neste trabalho o seqüenciamento de diversas amostras do mar de água foram seqüenciadas (VENTER *et al.*, 2004). Mais detalhes sobre os trabalhos será apresentado ao fim do capítulo.

3.4 Enriquecimento da biblioteca

Um grande problema das bibliotecas metagenômicas é a baixa freqüência que se encontra um clone com a característica desejada (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003). Por esse motivo, parte dos trabalhos publicados utiliza estratégias de enriquecimento da amostra para assim aumentar a chance de se recuperar algum clone com a característica procurada.

Como modo de se aumentar à disponibilidade de clones contendo o inserto desejado, pode-se criar uma biblioteca a partir de um ambiente onde a característica desejada está presente em grande quantidade. Alguns exemplos dessa abordagem podem ser encontrados na literatura. O primeiro genoma completo obtido de um microrganismo não cultivado foi o da bactéria *Buchnera aphidicola*, um endossimbionte obrigatório de pulgão. Nesse projeto as células bacterianas foram facilmente separadas das do inseto assim permitindo a construção de uma biblioteca contendo virtualmente só o DNA bacteriano (CLARK *et al.*, 2001; TAMAS *et al.*, 2002; WERNEGREEN *et al.*, 2000). A *Archaea* não cultivada *Cenarchaeum symbiosum*, que é um simbionte de esponjas, é altamente enriquecida no seu hospedeiro. Além de ser o único representante do domínio *Archaea* presente na esponja, corresponde a 65% das células procarióticas, permitindo a construção de uma biblioteca praticamente só do microrganismo desejado (SCHLEPER *et al.*, 1997).

A estratégia apresentada acima só pode ser considerada quando se conhece um ambiente relativamente pouco complexo onde a característica desejada esteja presente em grande quantidade, pois em um ambiente como solo, extremamente complexo dificilmente se encontrará esse tipo de situação. Assim, outro método de se enriquecer uma biblioteca é adicionar um substrato ao ambiente para que os microrganismos que possuam a característica desejada possam se multiplicar em detrimento dos outros. Um grande problema da adição de um substrato é que os organismos de crescimento rápido irão ocupar esse nicho recém criado, e assim, a diversidade presente na amostra é perdida (DANIEL, 2005).

Pode-se, também, enriquecer um ambiente para microrganismos metabolicamente ativos. Por exemplo, ao se adicionar bromodeoxiuridina (BrdU) à uma amostra ambiental, esta será incorporada pelos organismos metabolicamente ativos. Assim, é possível separar o DNA das células metabolicamente ativas das demais com base na incorporação da BrdU, pois este será recuperado por imunocaptura (URBACH, VERGIN & GIOVANNONI, 1999; BORNEMAN, 1999; SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003).

Outra maneira de enriquecimento é a técnica de sonda por isótopo-estável (Stable-Isotope Probe: SIP). Essa técnica consiste na adição de um substrato marcado com ¹³C à amostra. Os microrganismos capazes de usar o substrato irão incorporar o ¹³C ao seu DNA e com isso ao se extrair o ácido nucléico da amostra pode-se separar o marcado do não marcado por ultracentrifugação com gradiente de densidade (RADAJEWSKI & MURRELL, 2000; SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003).

Uma maneira mais rudimentar de se enriquecer uma biblioteca é adicionar a clonagem o substrato cujo metabolismo se deseja recuperar através da biblioteca, assim apenas os clones capazes de crescer consumindo o substrato formaram colônia na placa desta maneira se terá uma biblioteca onde a totalidade dos clones será positiva para a característica desejada (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003).

4. Considerações finais

Nesse momento o uso de métodos moleculares para o estudo de comunidades microbianas é considerado como parte básica das ferramentas dos microbiologistas ambientais (OREMLAND *et al.*, 2005), desta maneira, hoje a ecologia microbiana clássica e a ecologia microbiana molecular não podem ser separadas facilmente. Estudos utilizando, principalmente, técnicas convencionais e analíticas muitas vezes necessitam do emprego de técnicas moleculares para responder as perguntas que não podem ser respondidas por essas metodologias, assim como, o contrário ocorre com muita freqüência. Desta maneira, o emprego das técnicas da era genômica aos estudos de ecologia microbiana tem trazido um avanço sem precedentes os estudos em microbiologia ambiental.

De um trabalho, onde os clones foram selecionados por homologia de seqüências (BEJA *et al.*, 2000), saiu um dos maiores achados dos projetos de seqüenciamento do metagenoma; em um clone contendo um *rrs* identificado como pertencendo ao gênero *Bacteria* se encontrou um gene com alta homologia com bacteriorodopsina. Esse resultado foi a primeira indicação de que essa proteína não era apenas restrita ao gênero *Archaea* como pensado anteriormente.

Alguns produtos já foram isolados utilizando-se bibliotecas metagenômicas e selecionando os clones por função, como genes de enzimas degradativas (HENNE *et al.*, 1999; RONDON *et al.*, 2000; HENNE *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2004; GUPTA, BERG & LORENZ, 2002; KNIETSCH *et al.*, 2003; YUN *et al.*, 2004) de resistência a antibióticos (Riesenfeld, Goodman & Handelsman, 2004) e antibióticos (BRADY & CLARDY, 2000; WANG *et al.*, 2000; MACNEIL *et al.*, 2001; GILLESPIE *et al.*, 2002; COURTOIS *et al.*, 2003). A grande maioria dos bioproductos isolados desta maneira é pouco relacionada ou sem relação alguma com produtos já conhecidos e, ao mesmo tempo, o redescobrimento de produtos não foi informada.

Enzimas são utilizadas em uma enorme gama de aplicações industriais, devido principalmente a sua versatilidade de substratos e capacidade de catalisar reações

delicadas importantes para indústria farmacêutica. Como hoje a necessidade de descoberta de novos produtos está empurrando a fronteira biotecnológica além dos organismos cultiváveis, algumas companhias privadas já estão iniciando a busca de novos produtos em bibliotecas metagenômicas (LORENZ & ECK, 2005). Segundo Lorenz & Eck (2005) as empresas Diversa (EUA) e TerraGen (Canadá) foram as primeiras companhias a apresentarem patentes em tecnologia metagenômica já em 1996. Desde então, diversas empresas têm utilizado bibliotecas metagenômicas como forma de isolar novas enzimas de aplicação industrial.

Porém, os resultados mais impressionantes provenientes desses projetos vêm dos projetos de seqüenciamento aleatório do DNA ambiental. Os trabalhos de seqüenciamento do Mar do Sargasso e do biofilme da mina ácida demonstraram o quanto se pode aprender sobre o metabolismo de organismos não cultivados com um projeto de Metagenômica.

No caso do biofilme da mina ácida, foi possível montar, quase completamente o genoma de dois organismos, *Leptospirillum* grupo II e *Ferroplasma* tipo II além de 3 genomas parciais. Isso foi possível devido à baixa diversidade e baixa plasticidade nos genomas existentes na amostra. Como esses organismos são dominantes no biofilme, muito sobre o funcionamento desta comunidade pode ser entendido apenas com a anotação dos genes presentes no genoma desses dois organismos (TYSON *et al.*, 2004).

Já o seqüenciamento do mar do Sargasso foi um dos mais impressionantes projetos já publicados (VENTER *et al.*, 2004), não pela novidade dos resultados, mas pela grandiosidade do trabalho. No dia em que as seqüências de proteínas anotadas foram depositadas nos bancos de dados o volume de dados publicados dobrou. Como trabalhou com um ambiente mais complexo, esse trabalho obteve resultados menos completos que o seqüenciamento da mina ácida, porém como o volume de dados obtidos é enorme abriu a possibilidade para os demais pesquisadores, especialistas em ecologia e metabolismo de microrganismos, analisarem esses dados publicados e assim expandirem o conhecimento sobre esse ecossistema e sobre o metabolismo de microrganismos não cultivados.

Atualmente, temos um bom conhecimento sobre o metabolismo das bactérias cultiváveis. A razão para isso é o fato de que as técnicas de isolamento são ideais para o metabolismo desses organismos capazes de crescer em laboratorio, porém mesmo cultivando novos organismos as metodologias de caracterização do metabolismo são, provavelmente, inadequados para caracterização metabólica desses novos isolados. Assim como, devido ao fato de desconhecermos as necessidades metabólicas especiais dessa grande maioria ainda não cultivável, a criação de novas metodologias de cultivo passa a ser uma tarefa empírica e aleatória sem ter como base dados concretos. Assim, a tarefa de isolamento de novos microrganismos ainda é relativamente lenta e trabalhosa.

Por esse motivo, os dados provenientes dos projetos de seqüenciamento do metagenoma irão levar ao maior conhecimento sobre o metabolismo desses organismos não isolados. Com esse conhecimento os microbiologistas ambientais poderão desenvolver metodologias de isolamento e caracterização de novos microrganismos.

Agradecimentos

CNPq, CAPES e Petrobrás. Os autores agradecem a Dra. Kornelia Smalla e a Dra Leda Mendonça Hagler pela colaboração em alguns dos trabalhos citados neste capítulo.

Referências

- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. San Diego: Academic, 4th.ed. 1997. 508p.
- ALEXANDER, M. (Ed.) **Biodegradation and Bioremediation**. Academic Press Inc., San Diego. 1994.
- ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of soil spills. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v.52, p.149-156, 1994.
- BEJA, O.; ARAVIND, L.; KOONIN, E.V.; SUZUKI, M.T.; HADD, A.; NGUYEN, L.P.; JOVANOVICH, S.B.; GATES, C.M.; FELDMAN, R.A.; SPUDICH, J.L.; SPUDICH, E.N.; DELONG, E.F. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. **Science**, v.289, p.1902-1906. 2000a.
- BEJA, O.; SUZUKI, M.T.; KOONIN, E.V.; ARAVIND, L.; HADD, A.; NGUYEN, L.P.; VILLACORTA, R.; AMJADI, M.; GARRIGUES, C.; JOVANOVICH, S.B.; FELDMAN, R.A.; DELONG, E.F. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. **Environmental Microbiology**, v.2, p.516-529, 2000b.
- BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L.; ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3328-3338. 2002.
- BERTRAND, H.; NALIN, R.; BALLI, R.; CLEYET-MAREL, J.C. Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p.142-156, 2001.
- BORNEMAN, J. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3398-3400, 1999.
- BRADY, S.F.; CLARDY, J. Long-chain *N*-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. **Journal American Chemical Society**, v.122, p.12903-12904, 2000.
- BREWSTER, D.T.; SPIERS, A.G.; E HOPCROFT, D.H. Biocontrol of *Phytophthora cactorum* in vitro with *Enterobacter aerogenes*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.25, p.9-18, 1997.
- CHIN-A-WOENG, T.F.C.; DE PRIESTER, W.; VAN DER BRIJ, A.; LUGTENBERG, B.J.J. Description of the colonization of a gnobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. **The American Phytopathological Society**, v.10, p.79-86, 1997.
- CLARK, M.A.; BAUMANN, L.; THAO, M.L.; MORAN, N.A.; BAUMANN, P. Degenerative minimalism in the genome of a psyllid endosymbiont. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.1853-1861, 2001.
- COOK, R.J. Wheat management systems in the Pacific Northwest. **Plant Disease**, v.70, p.894-898, 1986.
- COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HEYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUÉRINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J. Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.49-55, 2003.
- COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTWER, P. Metagenomic gene discovery: Past, present and future. **TRENDS in Biotechnology**, v.23, p.321-329, 2005.
- CRÁPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v.30, p.31-37, 2002.
- CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline Biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.45-49, 2000.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews in Microbiology**, v.3, p.470-478, 2005.
- DANIEL, R. The soil metagenome — a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, p.199-204, 2004.

- ENTCHEVA, P.; LIEBL, W.; JOHANN, A.; HARTSCH, T.; STREIT, W. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.89-99, 2001.
- ERICKSON, M.; DALHAMMAR, G.; BORG-KARLSON, A.K. Aerobic degradation of a hydrocarbon mixture in natural uncontaminated potting soil by indigenous microorganisms at 20°C and 6°C. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.51, n.4, p.532-535, 1999.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.243-270, 2004.
- GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D.; FREITAS, J.R.; SEIB, A.M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus*) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.43-50, 1998.
- GILLESPIE, D.E.; BRADY, S.F.; BETTERMANN, A.D.; CIANCIOTTO, N.P.; LILES, M.R.; RONDON, M.R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4306-4310, 2002.
- GÖTZ, M.; GOMES, N.C.; DRATWINSKI, A.; COSTA, R.; BERG, G.; PEIXOTO, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Survival of *gfp*-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p.207-218, 2005.
- GUPTA, R.; BERG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.59, p.15-32, 2002.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, v.5, p.245-249, 1998.
- HASS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in Root-colonizing *Pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.117-153, 2003.
- HEIDER, J.; SPORMANN, A.M.; BELLER, H.R.; WIDDEL, F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. **FEMS Microbiology Ecology**, v.22, p.459-473, 1999.
- HENNE, A.; DANIEL, R.; SCHMITZ, R.A.; GOTTSCHALK, G. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3901-3907, 1999.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R.A.; BÖMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3113-3116, 2000.
- HOLBEN, W.E.; JANSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.703-711, 1988.
- HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.190-197, 1996.
- JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L.G.; GEER, C.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v.33, p.241-249, 2000.
- KAISER, O.; PUHLER, A.; SELBITSCHKA, W. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. **Microbial Ecology**, v.42, p.136-149, 2001.
- KANEKO, S.; AKIOKA, M.; TSUGE, K.; ITAYA, M. DNA shuttling between plasmid vectors and a genome vector: systematic conversion and preservation of DNA libraries using the *Bacillus subtilis* genome (BGM) vector. **Journal of Molecular Biology**, v.24, p.1036-1044, 2005.
- KHALEQUZZAMAN, K.M.; JINNAH, M.A.; RASHID, M.A.A.M.; CHOWDHURY, M.N.A.; ALAM, M. Effect of *Pseudomonas fluorescens* in controlling bacterial wilt of tomato. **Pakistan Journal of Plant Pathology**, v.1, p.71-73, 2002.
- KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v.5, p.46-56, 2003.
- KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.48, p.677-686, 1997.

- LAGOPODI, A.L.; RAM, A.F.J.; LAMERS, G.E.M.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.15, p.172-179, 2002.
- LAMBERT, B.; LEYNS, F.; VAN ROOYEN, L.; GOSELE, F.; PAPON, Y. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1866-1871, 1987.
- LEE, S.W.; WON, K.; LIM, H.K.; KIM, J.C.; CHOI, G.J.; CHO, K.Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, p.720-726, 2004.
- LOPER, J.E.; ISHIMARU, C.A.; CARNEGIE, S.R.; VANAVICHIT, A. Cloning and Characterization of aerobactin biosynthesis genes of the biological control agent *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4189-4197, 1993.
- LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews in Microbiology** 3, 510-516, 2005.
- LUGTENBERG, B.J.J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G.V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.461-490, 2001.
- MACNEIL, I.A.; TIONG, C.L.; MINOR, C.; AUGUST, P.R.; GROSSMAN, T.H.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; PHILLIPS, T.; NARULA, S.; SUNDARAMOORTHI, R.; TYLER, A.; ALDREDGE, T.; LONG, H.; GILMAN, M.; HOLT, D.; OSBURNE, M.S. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v.3, p.301-308, 2001.
- MAJERNIK, A.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁺(Li⁺)/H⁺ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.6645-6653, 2001.
- MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; YIP, C.L.T.; HOPKE, J.; BROWN, K.A.; MACNEIL, I.A.; OSBURNE, M.S. Genetically Modified Bacterial Strains and Novel Bacterial Artificial Chromosome Shuttle Vectors for Constructing Environmental Libraries and Detecting Heterologous Natural Products in Multiple Expression Hosts **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2452-2463, 2004.
- MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J.C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2354-2359, 2001.
- MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.35-59, 2004.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141, 1998.
- NELSON, E.B.; CHÃO, W.L.; NORTON, J.M.; NASH, G.T.; HARMAN, G.E. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: Possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping off. **Phytopathology**, v.76, p.327-335, 1986.
- NYER, E.K. 1998. In: **Groundwater and soil remediation: practical methods and strategies**. Ann Arbor Press, Michigan.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments **Journal of Microbiology Methods**, v.7, p.57-66, 1987.
- OREMLAND, R.S.; CAPONE, D.G.; STOLZ, J.F.; FUHRMAN, J. Whither or wither geomicrobiology in the era of 'community metagenomics'. **Nature Reviews in Microbiology**, v.3, p.572-578, 2005.
- PEIXOTO, R.; GÖTZ, M.; MILLING, A.; BERG, G.; COSTA, R.; ROSADO, A.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Monitoring *gfp*-tagged bacterial antagonists in the rhizosphere of tomato plants **IOBC Bulletin**, v.37, p.219-225, 2004.
- PEIXOTO, R.S. Seleção e monitoramento polifásico de bactérias antagonistas a *Ralstonia solanacearum* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) 2005. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes- Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; KLENK, H.P.; KLETZIN, A.; TREUSCH, A.H.; MEURER, G.; ECK, J.; SENSEN, C.W.; SCHLEPER, C. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. **Environmental Microbiology**, v.4, p.603-611, 2002.
- RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8rl-96. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2545-2554, 2001.

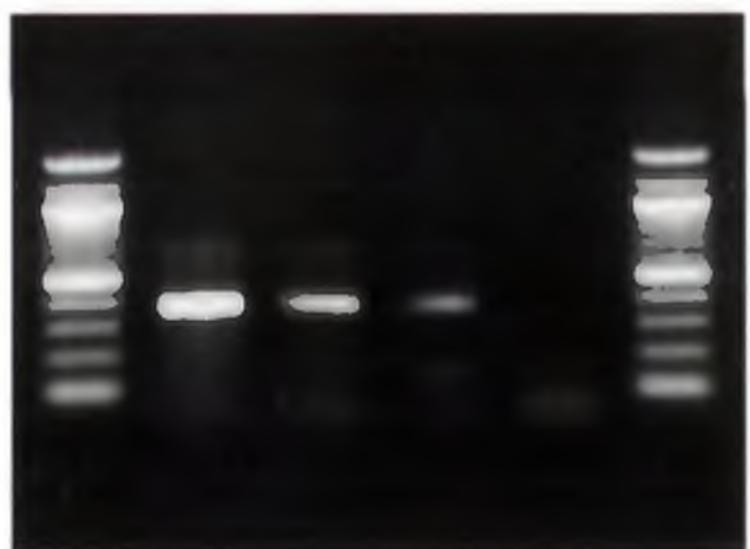
- RADAJEWSKI, S.; MURRELL, J.C. Stable isotope probing for detection of methanotrophs after enrichment with $^{13}\text{CH}_4$. **Methods in Molecular Biology**. v.179, p.149-157, 2002.
- RIESENFIELD, C.S.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v.6, p.981-989, 2004.
- RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2541-2547, 2000.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. 2002. In: MELO, I.S.; (Ed.) **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: Ed. da USP, 2002. p.97-129.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular Microbial Ecology: a minireview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.28, p.135-147, 1997.
- SCHIPPERS, B.; LUGTENBERG, B.J.J.; WEISBEEK, P.J. Plant growth control by fluorescent Pseudomonads. 1987. In: Chet, I. (Ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. p.19-39. John Wiley, New York.
- SCHLEPER, C.; SWANSON, R.V.; MATHUR, E.J.; DELONG E.F. Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.7803-7811, 1997.
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.303-310, 2003.
- SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUR, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4742-4751, 2001.
- STEIN, J.L.; MARSH, T.L.; WU, K.Y.; SHIZUYA, H.; DELONG, E.F. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.591-599, 1996.
- TAMAS, I.; KLASSON, L.; CANBACK, B.; NASLUND, A.K.; ERIKSSON, A.S.; WERNEGREEN, J.J.; SANDSTROM, J.P.; MORAN, N.A.; ANDERSSON S.G. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. **Science**, v.296, p.2376-2379, 2002.
- TEBBE, C.C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.2657-2665, 1993.
- TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, 428, p.37-43, 2004.
- UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nature Biotechnology**, v.23, p.88-93, 2005.
- URBACH, E.; VERGIN, K.L.; GIOVANNONI, S.J. Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1207-1213, 1999.
- VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y.H.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v.304, p.66-74, 2004.
- WANG, G.Y.; GRAZIANI, E.; WATERS, B.; PAN, W.; LI, X.; McDERMOTT, J.; MEURER, G.; SAXENA, G.; ANDERSEN, R.J.; DAVIES, J. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. **Organic Letters**, v.2, 2401-2404, 2000.
- WATANABE, K.; HAMAMURA, N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant. **Degradation**, v.14, p.1-7, 2003.
- WATANABE, K.; BAKER, P.W. Environmentally relevant microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, p.1-11, 2000.
- WELLER, D.M.. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1998.

WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Current challenges in introducing beneficial Microorganisms into The Rhizosphere. In: O'GARA, F.; DOWLING, D.N.; BOESTEN, B. (eds.) **Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms**. VCH Publishers, Weinheim, Alemanha, 1994.

YUN, J.; KANG, S.; PARK, S.; YOON, H.; KIM, M.J.; HEU, S.; RYU, S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.7229-7235, 2004.

Técnicas Moleculares Aplicadas aos
Estudos de Ecologia Microbiana:
A PCR em Tempo Real

Paulo Teixeira Lacava e João Lúcio de Azevedo



I. Introdução

A ecologia abrange o estudo de interações entre os seres vivos e neste particular, os microrganismos ocupam um papel de destaque pois convivem com plantas, animais e outros microrganismos em um habitat comum.

Sendo o Brasil um país com enorme biodiversidade, é surpreendente verificar que esta biodiversidade é ainda timidamente conhecida e utilizada com relação aos animais e plantas e muito menos ainda, se forem considerados os microrganismos. As estimativas quanto ao número de microrganismos existentes no nosso planeta revelam que atualmente são conhecidas menos de 10% de espécies de fungos e bactérias que habitam o mundo. A grande biodiversidade existente entre eles faz supor que a potencialidade desses microrganismos em termos biotecnológicos seja imensa. Esta é uma área de grande interesse na utilização da biodiversidade ainda pobemente explorada, principalmente em nosso país. O estudo dessa biodiversidade, sua utilização no desenvolvimento de processos e produtos de interesse e principalmente sua manutenção, preservando o equilíbrio de populações microbianas em suas mais diversas interações, cada vez se torna mais importante. A espécie humana direta ou indiretamente, pelo uso abusivo e indiscriminado de produtos químicos nas práticas agrícolas e industriais entre muitas outras, vem alterando estas interações e causando desequilíbrios que se tornam danosos ao ambiente e às populações de seres vivos, inclusive os microrganismos.

Muitos microrganismos não são cultiváveis, isto é, não são capazes de crescer e se desenvolver nos meios de cultivo utilizados em microbiologia. Não são também capazes de apresentar estruturas detectáveis em plantas, animais, solos e outros ambientes. Assim, seu estudo e visualização torna-se impraticável. Isso significa que embora devam ser importantes para a manutenção da microbiota e suas interações com o ambiente, estes microrganismos, especialmente fungos e bactérias, até há pouco passavam despercebidos. Estes e outros microrganismos estão sendo constantemente agredidos por ações antropogênicas e calcula-se que o número de espécies anualmente extintas ou em risco de extinção é muito maior nos microrganismos do que em organismos macroscopicamente visíveis.

Felizmente, com novas tecnologias, especialmente àquelas derivadas da biologia molecular, principalmente da tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética, está sendo possível estudos mais aprofundados tanto na microbiologia como um todo, como também na ecologia microbiana. A extração do material genético microbiano, o ácido desoxirribonucléico, (abreviadamente conhecido como DNA) bem como do ácido ribonucléico, o RNA, que é o material genético de muitos vírus, especialmente os de interesse na agricultura, é feita atualmente por vários procedimentos, cada vez mais simples e eficientes. O material genético total pode ser extraído de microrganismos que vivem no solo, em águas, em plantas ou em animais e este material

é proveniente tanto de microrganismos cultiváveis e conhecidos, como de microrganismos não cultiváveis mas que vivem, crescem e se reproduzem nos mais diversos habitats.

Técnicas moleculares são poderosas ferramentas para o monitoramento ambiental e para caracterização da diversidade microbiana podendo efetivamente monitorar mudanças no ecossistema e melhorar a compreensão de comunidades microbianas envolvidas em processos vitais dentro de um ecossistema. A maioria das ferramentas moleculares utilizadas atualmente para estudos ambientais e análise de comunidades microbianas são baseadas na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) que é a base para os métodos moleculares que tenham essa finalidade (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS & FALLONA, 1987). A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de DNA a partir de uma seqüência-alvo. Para a execução da técnica da PCR é preciso o conhecimento prévio da seqüência-alvo. A especificidade da técnica é obtida a partir da utilização de oligonucleotídeos que funcionam como iniciadores (“primers”) da síntese e são complementares ao gene ou à região do ácido nucléico de interesse (MULLIS & FALLONA, 1987). A PCR já vem sendo utilizada para clonagem de genes ou segmentos de genes da mesma espécie (parálogos) ou de espécies distintas (ortólogos). Também vem sendo usada na mutagênese dirigida, no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, na identificação de indivíduos (teste de paternidade) e na detecção de microrganismos como bactérias, fungos e vírus.

A capacidade de se poder extrair o DNA de células contidas em amostras ambientais como solo, água e planta e o uso deste DNA aplicando a PCR e suas variações, permite verificar a presença de microrganismos, em pequeno ou grande numero, não detectáveis por outros métodos (PILLAI *et al.*, 1991). A aplicação desta tecnologia para o estudo de comunidades microbianas *in situ* supera as limitações inerentes a outras técnicas utilizadas em estudos ambientais, tais como o enriquecimento tradicional e isolamento. Tudo isso possibilita a descoberta de microrganismos não cultiváveis bem como a utilização de seus genes, muitos deles inexplorados e com propriedades de interesse, fazendo dessa tecnologia uma importante ferramenta para o estudo da ecologia microbiana nos mais diferentes ecossistemas (CULLEN *et al.*, 2001; HEUSER & ZIMMER, 2002).

A maioria das técnicas moleculares utilizadas para estudos de ecologia microbiana tem carência de um componente quantitativo. A quantificação da comunidade microbiana em um determinado ambiente é de grande relevância para o entendimento da sua estrutura e dinâmica em ambientes naturais. Certamente, para contagem e localização espacial de microrganismos em amostras naturais, outras técnicas como hibridização *in situ* são consideradas importantes (HEAD *et al.*, 1998). Entretanto, as técnicas baseadas na PCR constituem uma alternativa geralmente mais sensível e menos laboriosa. Por exemplo, foi demonstrado que a bactéria *Sphingomonas alaskensis*, que não pode ser detectada por fluorescência em hibridação *in situ*, pode, entretanto, ser detectada pela PCR (CAVICCHIOLI *et al.*, 2003).

Revisões sobre os métodos de estudo aplicados à ecologia microbiana já estão disponíveis, em português. Assim, os processos de extração de DNA e suas aplicações são descritos por Valadares-Inglis e Melo (1998) e a técnica e aplicação da PCR foi descrita por Fungaro e Carneiro-Vieira (1998). Entretanto, mais recentemente,

variações na técnica do PCR foram introduzidas. Atualmente, a técnica de PCR em tempo real (DOLKEN *et al.*, 1998; HEID *et al.*, 1996; HIGUCHI *et al.*, 1993) é a mais recente. Ela é aplicada nos estudos ambientais de ecossistemas complexos como solo e água, bem como na interação microrganismo-planta com a finalidade de detectar, quantificar e diagnosticar comunidades microbianas nesses ecossistemas. O presente capítulo vai, desta forma, restringir-se a importante técnica da PCR em tempo real ou PCR quantitativa.

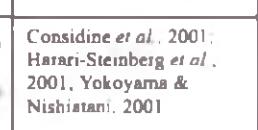
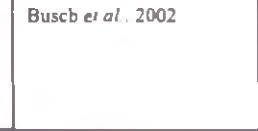
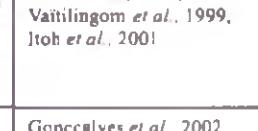
2. PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi originalmente utilizada para detectar e quantificar bactérias de importância clínica, tais como: *Listeria monocytogenes* (BASSLER *et al.*, 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (DESJARDIN *et al.*, 1998), *Borrelia burgdorferi* (PAHL *et al.*, 1999), *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii* (TEMPLETON *et al.*, 2003). *Candida spp.* (TRAMA *et al.*, 2005) e *Neisseria gonorrhoeae* (TABRIZI *et al.*, 2005) entre outras. Ao mesmo tempo foi utilizada com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse (DOLKEN *et al.*, 1998; HEID *et al.*, 1996; HIGUCHI *et al.*, 1993).

A PCR em tempo real comprehende dois processos, o primeiro, baseado no uso de moléculas que se intercalam quando ocorre a duplicação do DNA e o segundo no uso de uma sonda marcada que amplifica uma seqüência específica (MACKAY *et al.*, 2002). O primeiro processo utiliza corantes que se ligam ao DNA de dupla fita (dsDNA), sendo este o método mais simples utilizado na técnica de PCR em tempo real. Como mencionado, o processo baseia-se no uso de corantes que fluorescem quando intercalados no dsDNA, sendo a intensidade desse sinal de fluorescência, proporcional à quantidade de dsDNA presente na reação da PCR. A cada ciclo da reação de PCR, a intensidade do sinal aumenta com o aumento do produto da reação (WITTWER *et al.*, 1997). O processo é então simples e reproduzível e tem a vantagem, pelo uso de corantes, de não haver necessidade de modificação dos iniciadores ou “primers” já construídos nem da construção de sondas marcadas. Tudo isso resulta em uma redução do custo da reação da PCR. Entretanto, a omitização das condições dos iniciadores ou “primers”, é fundamental para o sucesso da reação, especialmente a concentração dos primers, a temperatura de anelamento e a concentração de magnésio. Outro importante aspecto que deve ser levado em consideração quando se empregam corantes, é evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, uma vez que esses corantes se ligam a qualquer DNA de dupla fita. Assim, é necessária uma construção cuidadosa dos “primers” a serem utilizados. O corante mais empregado, no caso, é o “SYBR Green I” (MORRISON *et al.*, 1998). Entretanto, outros corantes como brometo de etídio (HIGUCHI *et al.*, 1992) e YO-PRO-1 (ISHIGURO *et al.*, 1995) também podem ser utilizados com essa mesma finalidade.

O segundo processo envolvido na PCR em tempo real está baseado na utilização de sondas marcadas, entre elas as conhecidas como “TaqMan” (LIVAK *et al.*, 1995), “faróis moleculares” ou “Molecular beacons” (TYAGI & KRAMER, 1996) e “a PCR escorpião” ou “Scorpions PCR” (WHITCOMBE *et al.*, 1999). O processo,

diferentemente daquele que usa corantes inetercalantes, como “SYBR Green I”, é específico, pois são empregadas sondas marcadas complementares ao DNA-alvo, reduzindo consideravelmente o risco de contaminação da amostra e consequentemente evitando o aparecimento de “falsos positivos” como resultado da amplificação. Quando se utiliza a sonda do tipo “TaqMan”, esta é marcada duplamente com uma molécula “reporter” (R) na extremidade 5’ do DNA e outra molécula extinguidora, absorvedora ou “quencher” (Q) no terminal 3’ do DNA. Quando estão próximas, a molécula Q absorve a fluorescência emitida pela molécula R uma vez excitada. Durante a PCR, a sonda irá se ligar a seqüência complementar do DNA a ser amplificado. Quando a *Taq* polimerase encontra esta seqüência durante a síntese da nova fita de DNA, esta enzima que possui atividade exonucleásica 5’ → 3’, remove a molécula repórter que emitirá fluorescência livremente. Esta sonda é baseada no princípio FRET que vem a ser uma “transferência de ressonância por transmissão de energia” ou “*fluorescence resonance energy transfer*” (Didenko, 2001) e emite sinal de fluorescência somente quando clivada. Um detector que é um dispositivo de carga acoplada ou “charge-coupled device”, mede a fluorescência acumulada da molécula repórter durante a PCR por meio de uma fibra óptica presente no tubo de reação. A fluorescência é, então, correlacionada com a quantidade de produto formado em tempo real durante a amplificação, sendo a PCR considerada então como quantitativa (Higuchi *et al.*, 1993; Didenko, 2001). As sondas do tipo “Molecular beacons” e “Scorpions” também são baseadas no princípio FRET, porém não necessitam de hidrólise por atividade nucleásica. As metodologias e princípios para a PCR em tempo real, descritas acima, estão sumarizadas na Figura 1 e Tabela 1.

Princípio	Molécula	Anelamento	Polymerização	Referências
Agente intercalante	(corante)			Considine <i>et al.</i> , 2001; Harari-Steinberg <i>et al.</i> , 2001; Yokoyama & Nishizumi, 2001
“FRET” (fluorescência emitida pelo fluoroforo 2)	Hibridização de sondas			Busch <i>et al.</i> , 2002
“Quenching” (fluorescência emitida pelo fluoroforo 1)	TaqMan®			Böhm <i>et al.</i> , 1999; Väistilä <i>et al.</i> , 1999; Itoh <i>et al.</i> , 2001
	“Molecular Beacon” ou Farol molecular			Gonçalves <i>et al.</i> , 2002
	Escorpião			Schenk <i>et al.</i> , 2002*

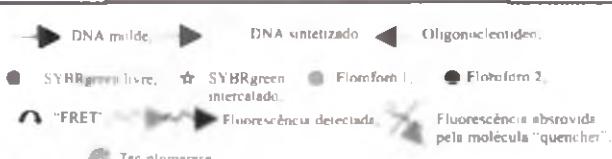


FIGURA 1. A tecnologia da PCR em tempo real ou PCR quantitativa.

Fonte: adaptado Gachon *et al.*, 2004.

TABELA 1. Características da detecção das moléculas utilizadas nos métodos da PCR em tempo real.

Tipo de Química	Especificidade	Multicapacidade de detecção	Necessidade de oligonucleotídeos específicos	Discriminação alélica	Custo
Corantes intercalantes dsDNA	Dois PCR "primers"	Não	Não	Não	\$
TaqMan	Dois PCR "primers"; uma sonda específica	Sim	Sim	Sim	\$\$
Faróis moleculares ou "Molecular Beacons"	Dois PCR "primers"; uma sonda específica	Sim	Sim	im	\$\$
PCR Escorpião ou "PCR Scorpion"	Um PCR "primer"; um "primer"/sonda	Sim	Sim	Sim	\$\$

\$\$, caro; \$, relativamente barato

Fonte: adaptado Wong & Medrano, 2005.

A quantificação utilizando a PCR em tempo real é pautada em dois métodos: quantificação relativa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; LIU & SAINT, 2002; MULLER *et al.*, 2002) e quantificação absoluta (HEID *et al.*, 1996; Souaze *et al.*, 1996). A quantificação relativa é mais usada quando existem muitos genes a serem analisados em uma mesma amostra, ou seja, é feita uma relação entre o sinal da PCR de um gene de interesse entre um grupo tratado com uma amostra padrão (controle). Esse método tem a vantagem de não necessitar a construção de uma curva padrão (WONG & MEDRANO, 2005). A outra metodologia é a quantificação absoluta, pela qual o número de cópias do gene de interesse é determinado, relacionando-se o sinal da PCR com uma curva-padrão; essa curva é construída utilizando-se diluições seriadas de uma amostra de concentração conhecida (WONG & MEDRANO, 2005).

3. Aplicações da PCR em tempo real para estudo de microrganismos em diferentes ambientes

3.1 Solo

Microrganismos habitando solos naturais ou modificados pela ação antropogênica, pela agricultura por exemplo, são extremamente importantes para a manutenção e funcionamento destes solos, pois o envolvimento de microrganismos é fundamental em processos de formação e estrutura do solo, decomposição de matéria orgânica, remoção de agentes tóxicos e ainda participação nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (van DER HEIJDEN *et al.*; 1998; KLIRONOMOS *et al.*, 2000; OVREAS, 2000). O monitoramento de comunidades microbianas em

ecossistemas como o solo, utilizando ferramentas de biologia molecular, tem recebido especial atenção, pois a utilização de técnicas como a PCR em tempo real, torna possível, como mencionado, a detecção de quantidades muito pequenas de DNA, inclusive a de microrganismos não cultiváveis e de novos genes, sem a necessidade do uso de técnicas laboriosas que demandam um tempo muito maior em comparação com técnicas moleculares (HERMANSSON & LINDGREN, 2001). Nossa conhecimento da diversidade microbiana do solo é limitada em parte pela dificuldade de se isolar e reconhecer o enorme número de microrganismos existentes nele (TORSVIK *et al.*, 1990a,b). Pela capacidade de reassociação DNA-DNA, estima-se que em 1 grama de solo existam em torno de 4000 diferentes unidades de genoma bacteriano, ou seja 4000 espécies e variedades (PACE, 1997). Apenas cerca de 1% dessa população bacteriana do solo já foi isolada e cultivada (TORSVIK *et al.*, 1998). A PCR convencional já vêm sendo utilizada como uma técnica rotineira nas análises ambientais de solos. Entretanto, com o advento da PCR em tempo real, a possibilidade de análise desse ecossistema tornou-se mais precisa e apresenta a vantagem de fornecer uma quantificação dessa análise.

Estima-se que existam no mundo cerca de 1.500.000 espécies de fungos (GILLER *et al.*, 1997), e muitos destes fungos não podem ser isolados e cultivados em meios de culturas (THORN, 1997; van ELSAS *et al.*, 2000). Embora técnicas de biologia molecular venham sendo empregadas no estudo de comunidades bacterianas presentes no solo, pouca pesquisa tem sido realizada em relação a fungos do solo (van ELSAS *et al.*, 2000). Entretanto, é possível notar que nos últimos anos a PCR em tempo real também tem sido utilizada para quantificar DNA e RNA proveniente de fungos em solos (FILION *et al.*, 2003a,b; LANDEWEERT *et al.*, 2003; LUEDERS *et al.*, 2004). Essa técnica possui enorme potencialidade para tal tipo de estudos pois utilizada em conjunto com outras técnicas como os microarranjos ou “microarrays” (YE *et al.*, 2001; TARONCHER-OLDENBURG *et al.*, 2003) e metagenômica (RODRIGUEZ-VALERA, 2004; TYSON *et al.*, 2004) propicia um melhor entendimento do papel que comunidades fúngicas desempenham nos processos ecológicos ocorridos em um ecossistema como o solo.

Bactérias que oxidam amônia em nitrato (AOB) desempenham importante papel no processo de nitrificação no solo (ciclo do nitrogênio). Os métodos tradicionais para detecção e quantificação dessas bactérias, como anticorpos monoclonais (SANDÉN *et al.*, 1994); hibridização *in situ* (SCHRAMM *et al.*, 1999) e PCR competitivo (KOWALCHUK *et al.*, 1999; PHILLIPS *et al.*, 2000); possuem desvantagens, pois não é possível correlacionar a população quantificada com sua atividade microbiana. Hermansson & Lindgren (2001) propuseram a utilização da PCR em tempo real para quantificar a população das bactérias AOB com a atividade de oxidação em solos cultivados. Esses autores desenvolveram sondas do tipo “TaqMan” para a quantificação dessas bactérias AOB em solo e utilizaram o método de quantificação absoluta, isto é, construiram curvas-padrões, com diferentes concentrações conhecidas do DNA dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrosospira*, representando os mais importantes gêneros de bactérias AOB incluindo espécies como *Nitrosomonas europaea*, e *Nitrosospira multiformis*. Foi assim possível, pela primeira vez, o uso da técnica da PCR em tempo real para detectar e quantificar bactérias que oxidam amônia em nitrato no solo (HERMANSSON & LINDGREN, 2001).

Ainda em relação a estudos de ecologia microbiana envolvendo o ciclo do nitrogênio no solo, o processo de denitrificação (conversão de nitrato em nitrogênio e óxido nítrico) como se sabe, é realizado por bactérias que estão amplamente distribuídas neste ambiente e exibem uma grande diversidade taxonômica. (TIEDJE, 1988). Neste particular, a enzima nitrito redutase é essencial para o processo de denitrificação. Em estudos prévios, foram caracterizadas duas formas de nitrito redutase que se distinguem em termos de estrutura. A primeira é codificada pelo gene *nirK* e a segunda pelo gene *nirS* (ZUMFT, 1997). Henry *et al.* (2004), utilizando o corante SYBR Green I, já mencionado, empregaram a técnica de PCR em tempo real para quantificar bactérias denitrificantes utilizando o gene *nirK*. Esses autores ainda sugerem o uso da PCR em tempo real para quantificar bactérias denitrificantes utilizando o gene *nirS*, para no futuro determinar o número total dessas bactérias no solo, sem a necessidade do uso técnicas tradicionais que são mais laboriosas e imprecisas. López-Gutiérrez *et al.*, (2004), também utilizaram a técnica de PCR em tempo real para detectar em amostras de solo, grupos de bactérias capazes de reduzir nitrato em nitrito, que se constitue em outra importante etapa do ciclo do nitrogênio (TIEDJE, 1988). Estes autores desenvolveram “primers”, baseando-se na seqüência do gene *narG*, que é característico de bactérias redutoras de nitrato e utilizaram também o corante “SYBR Green I”, como agente intercalante para detecção na PCR em tempo real. Dessa forma, foi aberta uma nova etapa, fundamentada no uso de uma ferramenta molecular, substituindo com vantagens as tradicionais técnicas microbiológicas para o estudo de importantes comunidades bacterianas envolvidas em processos vitais no solo, como o ciclo do nitrogênio (NIJBURG & LAANBROEK, 1997; NIJBURG *et al.*, 1997, CHENEBY *et al.*, 2003; GREGORY *et al.*, 2000; PHILIPPOT *et al.*, 2002).

4. Interação microrganismos-planta

A utilização de técnicas moleculares para a análise da interação entre microrganismos e plantas por PCR já está consolidada e bem descrita (Fungaro e Carneiro-Vieira, 1998). No entanto, a utilização da PCR quantitativa ou em tempo real, tornou possível refinar as análises que antes se baseavam apenas no diagnóstico positivo ou negativo da presença de microrganismos de interesse.

A PCR em tempo real para detecção de microrganismos fitopatogênicos é descrita como uma poderosa ferramenta no diagnóstico de doenças em plantas. Em estudos de interação microrganismos-planta, a técnica de PCR em tempo real já tem sido empregada com sucesso para detectar e quantificar vírus (EUN *et al.*, 2000; MUMFORD *et al.*; 2000; ROBERTS *et al.*, 2000; SCHOEN *et al.*, 1996), fungos (BÖHM *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999) e bactérias (WELLER *et al.*, 2000; MAVRODIEVA *et al.*, 2004). Por outro lado, Shena *et al.* (2004), utilizaram essa técnica e mostraram que ela é poderosa para detectar e estudar fungos fitopatogênicos. Na Tabela 2 é possível notar que nos últimos cinco anos essa ferramenta da biologia molecular foi implantada de forma definitiva em estudos de fungos fitopatogênicos.

Em relação a detecção de fitopatógenos de origem bacteriana, a técnica da PCR convencional também está sendo substituída pela PCR em tempo real que já é

TABELA 2. Detecção de fungos patogênicos pela técnica da PCR em tempo real.

Patógenos	Cultura	Métodos	Referências
<i>Aphanomices euteiches</i>	Alfalfa	TaqMan	Vandemark <i>et al.</i> , 2002
<i>Aspergillus flavus</i>	Milho	TaqMan	Mayer <i>et al.</i> , 2003
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva e cereja	PCR escorpião	Schena <i>et al.</i> , 2000; Schena <i>et al.</i> , 2002b
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Trigo	SYBR Green I	Fraaije <i>et al.</i> , 2002
<i>Cladosporium</i> sp., <i>Ramularia</i> sp., <i>Microsphaera alphitoides</i>	Carvalho	SYBR Green I	Heuser & Zimmer, 2002
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Batata	TaqMan	Cullen <i>et al.</i> , 2002
<i>Diaporthe phaseolorum</i> e <i>Phomopsis longicolla</i>	Soja	TaqMan	Zhang <i>et al.</i> , 1999
<i>Fusarium solani</i> f.sp <i>phaseoli</i> e <i>Glomus intraradices</i>	Feijão	SYBR Green I	Filion <i>et al.</i> , 2003a; Filion <i>et al.</i> , 2003b
<i>Fusarium</i> sp.	Trigo	SYBR Green I	Schnerr <i>et al.</i> , 2001
<i>Helminthosporium solani</i>	Batata	TaqMan	Cullen <i>et al.</i> , 2001
<i>Magnaporthe grisea</i>	Arroz	SYBR Green I	Qi & Yang, 2002
<i>Phakopsora pachyrhizi</i> e <i>P. meibomiae</i>	Soja	TaqMan	Frederick <i>et al.</i> , 2002
<i>Phytophthora infestans</i>	Batata	SYBR Green	Avrova <i>et al.</i> , 2003
<i>Phytophthora medicaginis</i>	Alfalfa	TaqMan	Vandemark & Barker, 2003
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Citros	PCR escorpião	Ippolito <i>et al.</i> , 2004
<i>Pyrenophora</i> spp. e <i>P. Graminea</i>	Cevada	SYBR Green I	Bates <i>et al.</i> , 2001; Taylor <i>et al.</i> , 2001
<i>Pyrenophora teres</i>	Cevada	PCR escorpião	Bates & Taylor, 2001
<i>Rizoctonia solani</i>	Batata	TaqMan	Lees <i>et al.</i> , 2002
<i>Puccinia striiformis</i> e <i>P. recondite</i>	Trigo	SYBR Green I	Fraaije <i>et al.</i> , 2002
<i>Spongospora subterranea</i>	Batata	TaqMan	van de Graaf <i>et al.</i> , 2003

Fonte: adaptado Schena *et al.*, 2004.

utilizada para detectar e quantificar importantes fitopatógenos, em tecidos vegetais. É o caso das bactérias que já possuem seus genomas sequenciados como *Xylella fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (MAVRODIEVA *et al.*, 2004; Schaad & Frederick *et al.*, 2002; Cubero & Graham, 2002), importantes agentes causais de doenças de citros no Brasil. Li *et al.* (2003) utilizando o sistema de sondas marcadas, detectaram a presença de *X. fastidiosa* em sementes de laranja doce (*Citrus sinensis*) e provaram que essa bactéria pode ser transmitida via semente. Oliveira *et al.* 2002, desenvolveram uma sonda do tipo “TaqMan” para *X. fastidiosa*, possibilitando o diagnóstico mais preciso tanto em plantas sintomáticas ou sensíveis como em assintomáticas, também designadas de resistentes ou “escape”, em relação a Clorose Variegada dos Citros (HARTUNG *et al.*, 1994). Também foi possível pela mesma técnica da PCR em tempo real, quantificar a bactéria *X. fastidiosa* em outras amostras vegetais. Desta maneira, a utilização

desta técnica, representa uma estratégia interessante para avaliar populações bacterianas, como descrito para *X. fastidiosa* em plantas resistentes, sadias e portadoras, visto que a presença de um fitopatógeno no tecido vegetal não significa necessariamente a manifestação dos sintomas da doença. Métodos tradicionais para detecção de bactérias fitopatogênicas baseiam-se principalmente no isolamento e cultivo e até na obtenção de culturas puras, seguidos de testes bioquímicos, serológicos e de patogenicidade (MINSAVAGE *et al.*, 1994). Métodos atuais de detecção, como ocorreu por exemplo em pesquisas com a *X. fastidiosa*, incluem a amplificação de seqüências específicas de DNA, utilizando técnicas moleculares que exigem apenas uma pequena quantidade deste ácido nucléico. Entretanto, todos os métodos moleculares de detecção desenvolvidos anteriormente, apresentavam limitações, ou seja, eram baseados em fragmentos de DNA obtidos de isolados por meio de RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso ou “Randon Amplified Polymorphic DNA”), que usam iniciadores ou “primers” específicos (POOLER & HARTUNG, 1995). Poucos destes fragmentos foram posteriormente clonados, impedindo hibridização de clones de DNA de outros patógenos para testes de especificidade. Além disso, métodos moleculares de detecção baseados em PCR tradicional exigem a separação eletroforética das bandas de DNA para visualização, dificultando a quantificação do número de seqüências iniciais presentes nas amostras. Os trabalhos de Oliveira *et al.* (2002) e Li *et al.* (2003) demonstraram a possibilidade de detecção e quantificação de *X. fastidiosa* em tecidos vegetais utilizando sondas marcadas. Bextine *et al.*, 2005, utilizando o corante “SYBR Green I”, também desenvolveram a PCR quantitativa para detectar *X. fastidiosa* em insetos vetores da “Doença de Pierce” ou “Pierce’s Disease” (ALMEIDA & PURCELL, 2003). Esses autores indicam a possibilidade de utilização da técnica da

PCR em tempo real para o estudo de *X. fastidiosa* também *in situ*.



FIGURA 2. Padrão de curvas para detecção e quantificação de *Methylomonas mesophilicum* com PCR em tempo real. Curvas-padrão de 1 a 3, com diluição seriada do isolado SR1.6/6 de *M. mesophilicum* cultivado em meio de cultura. As reações contém 9×10^5 , 9×10^4 e 9×10^3 células respectivamente e a curva 4 é o controle negativo (água). O produto de PCR obtido no PCR em tempo real para detecção e quantificação de *M. mesophilicum* pode ser visualizado em gel de agarose como mostrado na figura na qual as canaletas 1 a 4 representam as mesmas curvas de detecção e quantificação em PCR em tempo real e M=peso molecular (Lacava, 2005).

Ainda em relação a estudos da interação microrganismos-plantas, a técnica de PCR em tempo real também tem auxiliado um melhor entendimento das interações entre microrganismos fitopatogênicos e microrganismos endofíticos, que podem ocupar o mesmo local na planta hospedeira (HALLMANN *et al.*, 1997; AZEVEDO *et al.*, 2000). Lacava (2005) desenvolveu

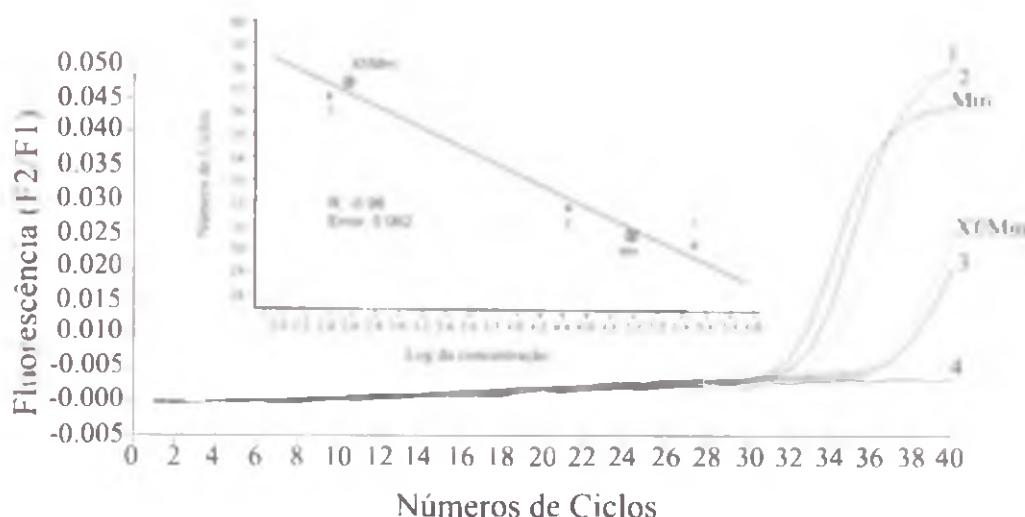


FIGURA 3. Detecção e quantificação de *Methylobacterium mesophilicum* por PCR em tempo real inoculada em vinca (*C. roseus*). As curvas 1 a 3 representam curvas padrões para quantificação *M. mesophilicum*, contendo de 3×10^5 a 3×10^3 células respectivamente; a curva 4 é o controle negativo (água). A curva identificada como Mm representa a detecção e quantificação de *M. mesophilicum* inoculada e a curva identificada como Xf/Mm representa a detecção e quantificação de *M. mesophilicum* inoculada concomitante com *Xylella fastidiosa* (Lacava, 2005).

utilizou a técnica de quantificação absoluta para determinar a curva padrão da técnica da PCR em tempo real, com o objetivo de quantificar *M. mesophilicum* em tecidos vegetais (Figura 2). O mesmo autor (Figura 3), demonstrou que é possível detectar esse endófito de citros em tecidos vegetais de *Catranthus roseus*, planta modelo para estudos de *X. fastidiosa* (MONTEIRO *et al.*, 2001), quando inoculada com essa bactéria.

5. Considerações finais

O estudo da ecologia microbiana é interdisciplinar e envolve diferentes áreas do conhecimento, entre elas a microbiologia, a genética e a biologia molecular. A ação conjunta dessas especialidades fornece ferramentas para estudar e encontrar respostas referentes ao papel que comunidades microbianas desempenham e qual a sua importância para o meio ambiente.

Sem dúvida a PCR em tempo real é uma moderna tecnologia oriunda da biologia molecular que pode ser aplicada ao estudo da ecologia microbiana, tendo assim importante papel na microbiologia ambiental. Esta técnica foi primeiramente desenvolvida para microrganismos, com objetivos específicos de aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção e quantificação, desse material biológico microbiano o que não é facilmente conseguido por técnicas clássicas ou mesmo pela PCR convencional.

A PCR em tempo real possui enorme potencial em ecologia microbiana. Também abre a possibilidade de detecção e quantificação, com um nível de precisão que não era possível há alguns anos atrás. A sensibilidade, rapidez e versatilidade

para a bactéria endofítica de citros *Methylobacterium mesophilicum* descrita como endofítica neste hospedeiro por Araújo *et al.*, (2002), sondas e “primers” específicos para a detecção dessa bactéria via PCR em tempo real. Recentemente foi detectada e descrita uma forte interação entre *X. fastidiosa* e *M. mesophilicum* em plantas de *Citrus sinensis* (Araújo *et al.*, 2002; Lacava *et al.*, 2004). Lacava (2005)

dessa técnica, juntamente com a possibilidade de análises quantitativas, são fatores primordiais que resultaram em sua rápida aceitação e em larga escala, em estudos de microbiologia. Além disso ela permite processar muitas amostras ao mesmo tempo com a confirmação do produto de amplificação com o mínimo risco de contaminação. Talvez o avanço mais importante que a PCR em tempo real possibilitou, foi a quantificação das amostras analisadas, pois resultados quantitativos proporcionam importantes informações que não eram possíveis de se obter apenas com a PCR convencional. Esse é um importante passo no estudo da ecologia microbiana pois existe não apenas a necessidade de detecção dos microrganismos de interesse, mas também a de quantificar as suas populações e consequentemente obter-se dados mais próximos da realidade.

O número de “primers” e sondas disponíveis para a PCR em tempo real ainda é limitado se comparado com a PCR convencional. Entretanto, o conhecimento do genoma de muitos microrganismos, em especial bactérias e fungos, oferece valiosas informações para aplicação da tecnologia da PCR em tempo real. A adaptação de protocolos já existentes para a PCR convencional e a associação de outras técnicas, como a de microarranjos e hibridização *in situ*, também auxiliaram e estimularam a utilização da PCR em tempo real para estudos de ecologia microbiana.

Em particular, a tecnologia da PCR em tempo real tem um grande potencial para quantificar mRNAs e para estudar mecanismos ainda desconhecidos, envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, assim como na resposta do patógeno a mudanças ambientais. Também é uma importante ferramenta para o estudo do fluxo gênico, da genética de populações microbianas em diferentes ambientes bem como em estudos sobre evolução.

Referências

- ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, v.96, p.264-271, 2003.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; ELSAS, J.D.V.; VUURDE, J.L.V.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.4906-4914, 2002.
- AVROVA, A.; VENTER, E.; BIRCH, P.R.J.; WHISSONA, S.C. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Genetics and Biology*, v.40, p.4-14, 2003.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review of insect control and recent advances on tropical plants. *EJB: Electronic Journal of Biotechnology* [online]. Valparaíso, n.3, 15 April 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>>. Acesso em: 05 maio 2000.
- BASSLER, H.I.; FLOOD, S.J.A.; LIVAK, K.J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C.A. Use of fluorogenic probe in a PCR-base assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3724-3728, 1995.
- BATES, J.A.; TAYLOR, E.J.A. Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Molecular Plant Pathology*, v.2, p.275-280, 2001.
- BATES, J.A.; TAYLOR, E.J.A.; KENYON, D.M.; THOMAS, J.E. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology*, v.2, p.49-57, 2001.

- BEXTINE, B.; BLUA, M.; HARSHMAN, D.; MILLER, T. A. A SYBR green-based real-time polymerase chain reaction protocol and novel DNA extraction technique to detect *Xylella fastidiosa* in *Homalodisca coagulata*. **Journal of Economic Entomology**, v.98, p.667-672, 2005.
- BÖHM, J.; HAHN, A.; SCHUBERT, R.; BAHNWEG, G.; ADLER, N.; NECHWATAL, J.; OEHLMANN, R.; OEWALD, W. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.409-416, 1999.
- BUSCH, M.; SEUTER, A.; HAIN, R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v.128, p.439-453, 2002.
- CAVICCHIOLI, R.; OSTROWSKI, M.; FEGATELLA, F.; GOODCHILD, A.; GUIXA-OIXEREU, N. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*). **Microbial Ecology**, v.45, p.203-217, 2003.
- CHENEBY, D.; HALLET, S.; MONDON, M.; MARTIN-LAURENT, F.; GERMON, J. C.; PHILIPPOT, L. Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. **Microbial Ecology**, v.46, p.113-121, 2003.
- CONSIDINE, M.J.; DALEY, D.O.; WHELAN, J. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiology**, v.126, p.1619-1629, 2001.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J.H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1257-1264, 2002.
- CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, v.51, p.281-292, 2002.
- CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.387-398, 2001.
- DESJARDIN, L.E.; CHEN, Y.; PERKINS, M.D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M.D.; EISENNACH, K.D. Comparison of the ABI 7700 system (Taqman) and competitive PCR for quantification of IS 6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. **Journal Clinical Microbiology**, v.36, p.1964-1968, 1998.
- DIDENKO, V. V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. **BioTechniques**, v.31, p.1106-1121, 2001.
- DOLKEN, L.; SCHULER, F.; DOLKEN, G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cell by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **BioTechniques**, v.6, p.1058-1064, 1998.
- EUN, A.J.C.; SEOH, M.L.; WONG, S.M. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.87, p.151-160, 2000.
- FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; JABAJI-HARE, S. H. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. **Phytopathology**, v.93, p.229-235, 2003a.
- FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; JABAJI-HARE, S. H. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using realtime PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.53, p.67-76, 2003b.
- FRAAIJE, B.A.; BUTTERS, J.A.; COELHO, J.M.; JONES, D.R.; HOLLOWAY, D.W. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. **Plant Pathology**, v.51, p.45-54, 2002.
- FREDERICK, R.D.; SNYDER, C.L.; PETERSON, G.L.; BONDE, M.R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae*. **Phytopathology**, v.92, p.217-227, 2002.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1445-1454, 2004.
- GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, v.6, p.3-16, 1997.
- GONÇALVES, M.C.; KLERKS, M.M.; VERBEEK, M.; VEGA, J.; VAN DEN HEUVEL, J. F. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of sugarcane yellow leaf virus. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.401-407, 2002.
- GREGORY, L.G.; KARAKAS-SEN, A.; RICHARDSON, D.J.; SPIRO, S. Detection of genes from membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, p.275-279, 2000.

- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- HARARI-STEINBERG, O.; OHAD, I.; CHAMOVITZ, D. A. Dissection of the light signal transduction pathways regulating the two early light-induced protein genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.127, p.986-997, 2001.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRALANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, v.64, p.591-597, 1994.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, v.35, p.1-21, 1998.
- HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, v.6, p.986-994, 1996.
- HENRY, S.; BAUDOINB, E.; LÓPEZ-GUTIÉRREZA, J.C.; MARTIN-LAURENTA, F.; BRAUMANB, A.; PHILIPPOT, L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v.59, p.327-335, 2004.
- HERMANSSON, A.; LINDGREN, P. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.972-976, 2001.
- HEUSER, T.; ZIMMER, W. Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*, v.209, p.295-299, 2002.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, v.10, p.413-417, 1992.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplifications reactions. *BioTechnology*, v.11, p.1026-1030, 1993.
- IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; NIGRO, F.; SOLETTI, L. V.; YASEEN, T. Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soil. *European Journal of Plant Pathology*, v.110, p.833-843, 2004.
- ISHIGURO, T.; SAITO, H.; YAWATA, H.; YAMAGISHI, H.; IWASAKI, S.; MITOMA, Y. Homogeneous qualitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. *Analytical Biochemistry*, v.229, p.207-213, 1995.
- ITOH, R.; FUJIWARA, M.; NAGATA, N.; YOSHIDA, S. A chloroplast protein homologous to the eubacterial topological specificity factor MinE plays a role in chloroplast division. *Plant Physiology*, v.127, p.1644-1655, 2001.
- KLIRONOMOS, J. N.; MCCUNE, J.; HART, M.; NEVILLE, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters*, v.3, p.137-141, 2000.
- KOWALCHUK, G.A.; NAOUMENKO, Z.S.; DERIKX, P.J.L.; FELSKE, A.; STEPHEN, J.R.; ARKHIPCHENKO, I.A. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the b subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.396-403, 1999.
- LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology*, v.39, p.55-59, 2004.
- LACAVA, P. T. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros e análise da interação com *Xylella fastidiosa*. 2005. 174 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- LANDEWEERT, R.; VEENMAN, C.; KUYPER, T. W.; FRITZE, H.; WERNARS, K.; SMIT, E. Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. *FEMS Microbiology Ecology*, v.45, p.283-292, 2003.
- LEES, A.K.; CULLEN, D.W.; SULLIVAN, L.; NICOLSON, M. J. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, v.51, p.293-302, 2002.
- LI, W.B.; PRIA, W.D.J.; LACAVA, P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. *Phytopathology*, v.93, p.953-958, 2003.
- LIU, W.; SAINT, D.A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry*, v.302, p.52-59, 2002.
- LIVAK, K.J.; FLOOD, S.J.A.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods and Applications*, v.4, p.357-362, 1995.

- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.
- LUEDERS, T.; WAGNER, B.; CLAUS, P.; FRIEDRICH, M. W. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, v.6, p.60-72, 2004.
- MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHE, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, v.30, p.1292-1305, 2002.
- MAVRODIEVA, V.; LEVY, L.; GABRIEL, D. W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, v.94, p.61-68, 2004.
- MAYER, Z.; BAGNARA, A.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. Quantification of the copy number of nor-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.82, p.143-151, 2003.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPINKS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE, R. E. Development of polymerase chain reaction protocols for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, v.84, p.456-461, 1994.
- MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A. J.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, v.85, p.246-251, 2001.
- MORRISON, T.M.; WEIS, J.J.; WITTWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, v.24, p.954-962, 1998.
- MULLER, P.Y.; JANOVJAK, H.; MISEREZ, A.R.; DOBBIE, Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, v.32, p.1372-1379, 2002.
- MULLIS, K. B.; FALLONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.155, p.335-350, 1987.
- MUMFORD, R.A.; WALSH, K.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, v.90, p.448-453, 2000.
- NIJBURG, J.W.; LAANBROEK, H.J. The influence of *Glyceria maxima* and nitrate input on the composition and nitrate metabolism of the dissimilatory nitrate-reducing bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, v.22, p.57-63, 1997.
- NIJBURG, J.W.; COOLEN, M.J.L.; GERARDS, S.; GUNNEWIEK, P. J. A. K.; LAANBROEK, H. J. Effects of nitrate availability and the presence of *Glyceria maxima* on the composition and activity of the dissimilatory nitrate-reducing bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.931-937, 1997.
- OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAÚJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, v.92, p.1048-1054, 2002.
- OVREAS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, v.3, p.236-251, 2000.
- PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, v.276, p.734-740, 1997.
- PAHL, A.; KUHLBRANDT, U.; BRUNE, K.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSNER, A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.1958-1963, 1999.
- PHILIPPOT, L.; PIUTTI, S.; MARTIN-LAURENT, F.; HALLET, S.; GERMON, J.C.; Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.6121-6128, 2002.
- PHILLIPS, C.J.; PAUL, E.A.; PROSSER, J.I. Quantitative analysis of ammonia oxidising bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, v.32, p.167-175, 2000.
- PILLAI, S.D.; JOSEPHSON, K.L.; BAILEY, R.L.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.2283-2286, 1991.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology*, v.31, p.377-381, 1995.
- QI, M.; YANG, Y. Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and northern blot/phosphoimaging analyses. *Phytopathology*, v.92, p.870-876, 2002.

- ROBERTS, C.A.; DIETZGEN, R.G.; HEELAN, L.A.; MACLEAN, D.J. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *Journal of Virological Methods*, v.88, p.1-8, 2000.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiology Letters*, v.231, p.153-158, 2004.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, H. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SANDÉN, B.; GRUNDITZ C.; HANSSON, Y.; DALHAMMAR, G. Quantification and characterisation of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* using monoclonal antibodies. *Water Science and Technology*, v.29, p.1-6, 1994.
- SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.24, p.250-258, 2002.
- SCHENA, L.; FINETTI SIALER, M.; GALLITELLI, D. Specific identification of *Aureobasidium pullulans* strain L47 using Scorpion-PCR. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin*, v.30, p.559-562, 2000.
- SCHENA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v.108, p.355-366, 2002a.
- SCHENA, L.; FINETTI SIALER, M.; GALLITELLI, D. Molecular detection of the strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease*, v.86, p.54-60, 2002b.
- SCHENA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, v.110, p.893-908, 2004.
- SCHNERR, H.; NIESSEN, L.; VOGEL, R. F. Real time detection of the tri5 gene in *Fusarium* species by LightCyclerTM-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology*, v.71, p.53-61, 2001.
- SCHOEN, C.D.; KNORR, D.; LEONE, G. Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and a fluorogenic 5' nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology*, v.86, p.993-999, 1996.
- SCHRAMM, A.; DE BEER, D.; VAN DEN HEUVEL, J.C.; OTTENGRAAF, S.; AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.3690-3696, 1999.
- SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406, p.151-157, 2000.
- SOUAZE, F.; NTODOU-THOME, A.; TRAN, C. Y.; ROSTENE, W.; FORGEZ, P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques*, v.21, p.280-285, 1996.
- TABRIZI, S.N.; CHEN, S.; TAPSALL, J.; GARLAND, S. M. Evaluation of opa-based real-time PCR for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*, v.32, p.199-202, 2005.
- TARONCHER-OLDENBURG, G.; GRINER, E. M.; FRANCIS, C. A.; WARD, B. B. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.1159-1171, 2003.
- TAYLOR, E.J.A.; STEVENS, F.A.; BATES, J.A.; MORREALE, G.; LEE, D.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathology*, v.50, p.347-355, 2001.
- TEMPLETON, K.E.; SCHELTINGA, S.A.; VAN DER ZEE, A.; DIEDEREN, B.M.W.; KRUIJSSEN, A.M.; GOOSSENS, H.; KUIJPER, E.D.; CLAAS, E. C. J. Evaluation of Real-Time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.4121-4126, 2003.
- THORN, G. The fungi in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). *Modern soil microbiology*. New York: Marcel Dekker, 1997. p.63-127.
- TIEDJE, J.M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: ZEHUDER, A. (Ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. New York: John Wiley and Sons, 1988. p.179-244.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.782-787, 1990a.

- TORSVIK, V.; SALTE, K.; SOERHEIM, R.; GOKSOEYR, J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.776-781, 1990b.
- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v.64, p.53-62, 1998.
- TRAMA, J.P.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida vaginitis* by real-time PCR and pyrosequencing. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.145-152, 2005.
- TYAGI, S.; KRAMER, F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. **Nature Biotechnology**, v.14, p.303-308, 1996.
- TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v.428, p.37-43, 2004.
- VAITILINGOM, M.; PIJNENBURG, H.; GENDRE, F.; BRIGNON, P. Realtime quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and RoundUp Ready soybean in some representative foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.5261-5266, 1999.
- VANDEMACK, G.J.; BARKER, B.M.; GRITSENKO, M. A. Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v.92, p.265-272, 2002.
- VANDEMACK, G.J.; BARKER, B.M. Quantifying *Phytophthora medicaginis* in susceptible and resistant alfalfa with a real-time fluorescent PCR assay. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.577-583, 2003.
- VAN DE GRAAF, P.; LEES, A.K.; CULLEN, D. W.; DUNCAN, J.M. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.589-597, 2003.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSCIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, v.396, p.69-72, 1998.
- VAN ELSAS, J. D.; FROIS-DUARTE, G.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p.133-151, 2000.
- WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C.; BOONHAM, N.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (Taq-Man) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2853-2858, 2000.
- WHITCOMBE, D.; THEAKER, J.; GUY, S.P.; BROWN, T.; LITTLE, S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. **Nature Biotechnology**, v.17, p.804-807, 1999.
- WITTWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **BioTechniques**, v.22, p.130-138, 1997.
- WONG, M.L.V.; MEDRANO, J.F. Real Time PCR for mRNA quantification. **BioTechniques**, v.39, p.75-85, 2005.
- YE, R.W.; WANG, T.; BEDZYK, L.; KROKER, K.M. Applications of DNA microarrays in microbial systems. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, p.257-272, 2001.
- YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.1025-1033, 2001.
- ZHANG, A.W.; HARTMAN, G.L.; CURIO-PENNY, B.; PEDERSEN, W.L.; BECKER, K.B. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. **Phytopathology**, v.89, p.796-804, 1999.
- ZUMFT, W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.533-536, 1997.

Biofilmes Microbianos

René P. Schneider



I. Definição

Biofilmes são definidos classicamente como comunidades de bactérias aderidas a superfícies sólidas ou semi-sólidas, envoltas por uma matriz de polímeros extracelulares (CHARACKLIS & MARSHALL, 1990; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). Esta definição não inclui, porém, todas as formas de vida microbiana com características de biofilme. Por exemplo, sistemas de tratamento de esgoto como lodos ativados e reatores anaeróbios de fluxo ascendente dependem da formação de flocos suspensos de comunidades microbianas para o seu funcionamento (GANCZARCZYK, 1994). Uma propriedade essencial destes flocos é a estabilidade mecânica e a sedimentabilidade, sem as quais os reatores não poderiam ser operados em condições estáveis (CLAUSS *et al.*, 1998). A coesão mecânica dos flocos é garantida pelos exopolímeros produzidos pelos organismos formadores de flocos. Estes flocos, portanto, também são biofilmes, só que suspensos. Nem todos os microrganismos aderidos a superfícies produzem uma matriz de exopolímeros, que é considerada uma propriedade essencial de biofilmes. A produção destes exopolímeros por bactérias heterotróficas ocorre somente em ambientes com disponibilidade adequada de compostos orgânicos. O fluxo de carbono em muitos ambientes, onde predominam bactérias aderidas a superfícies, não é suficiente para permitir a produção de estruturas carbonáceas não absolutamente indispensáveis para a sobrevivência dos organismos, como a matriz extracelular (TESKE, 2005). Nestes casos os organismos estão aderidos, mas não envoltos por uma matriz extracelular.

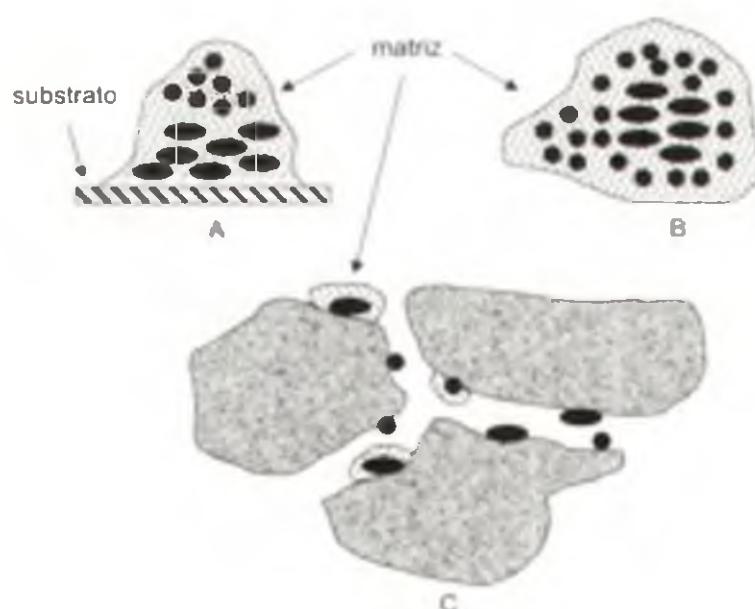


FIGURA 1. Representação esquemática dos diferentes tipos de biofilmes microbianos: biofilmes aderidos (A), biofilmes suspensos (B) e biofilmes de subsolo com ou sem matriz (C).

Uma definição mais apropriada de biofilmes microbianos, que permitiria diferenciá-los claramente de bactérias planctônicas, e que permite a inclusão de todas as formas microbianas com características de biofilme é a seguinte: biofilmes são comunidades de microrganismos que podem viver aderidas a superfícies ou suspensas em solução e podem ou não estar envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes (Schneider, submetido). A posição relativa de organismos no interior de biofilmes ou na superfície de substratos se altera

muito lentamente em função da divisão celular e do distanciamento das células por processos de formação de exopolímeros ou do deslocamento das células aderidas na superfície, sem que ocorra dessorção da célula. Células individuais ou planctônicas suspensas na água ou em ambientes gasosos não atendem ao critério da fixação da posição espacial relativa, pois o movimento Browniano, a difusão e a turbulência do meio contribuem para o deslocamento aleatório contínuo destas células. Os diferentes tipos de biofilmes microbianos estão esquematizados na Figura 1.

2. Fontes de carbono para a formação de biofilmes

Muitos autores acreditam que a adesão a superfícies representa uma estratégia de acesso a nutrientes contidos em filmes adsorvidos em superfícies sólidas por microrganismos (MARSHALL, 1996). Este conceito originou-se da observação relatada originalmente por Waksman & Carey (1935) e posteriormente confirmada por outros autores (ZOBELL & ANDERSON, 1936) de que o número de bactérias em amostras de águas ambientais aumentava em várias ordens de grandeza quando as amostras eram armazenadas em frascos de vidro. ZoBell & Anderson (1936) demonstraram que este aumento do número de bactérias era proporcional à área de superfície disponível por unidade de volume do líquido. A maior parte da biomassa de biofilmes microbianos na natureza é produzida por bactérias heterotróficas. A fonte de nutriente mais importante para estes biofilmes, portanto, é o carbono. Nitrogênio, fosfato e outros macro- e micronutrientes são geralmente obtidos da fonte de carbono ou do meio. Microrganismos de biofilmes têm à sua disposição quatro fontes potenciais de carbono: o filme condicionante, componentes do próprio biofilme, a matéria orgânica dissolvida e, em alguns casos, o substrato, quando se tratar de superfície biodegradável, um alimento ou resíduo orgânico sólido, por exemplo. Os mecanismos de metabolismo de substâncias orgânicas dependem do tamanho das moléculas. Monômeros e oligômeros podem ser absorvidos diretamente pelas células, mas polímeros devem ter seu tamanho reduzido pela atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares para torná-los biodisponíveis aos microrganismos.

O tipo de nutriente orgânico disponível nos filmes condicionantes das superfícies depende da quantidade e diversidade das moléculas orgânicas dissolvidas no ambiente aquático. Filmes condicionantes não são fontes importantes de compostos de baixo peso molecular hidrofílicos e apolares, como por exemplo a glicose. Estas substâncias não adsorvem bem a superfícies (MARSHALL, 1996) e são rapidamente metabolizadas no meio aquático (MÜNSTER, 1993). Moléculas com cargas elétricas de baixo peso molecular também podem ser rapidamente metabolizadas no meio líquido, mas se tornam praticamente inacessíveis aos microrganismos quando adsorvidas se a adsorção levar à sua imobilização através da formação de ligações químicas fortes com o substrato, como, por exemplo, a formação de complexos entre ácidos orgânicos de baixo peso molecular e cátions da superfície do substrato (STUMM & MORGAN, 1996). Compostos muito hidrofóbicos como, por exemplo, o hexaclorobenzeno, têm baixa solubilidade em

ambientes aquáticos e são encontrados quase que exclusivamente associados a superfícies, de onde podem ser remobilizados (biodisponibilizados) por bactérias específicas (TANG *et al.*, 1998). A adsorção de poluentes hidrofóbicos a superfícies no subsolo ou em sedimentos é o principal mecanismo responsável pela redução da biodisponibilidade destas substâncias, e, por consequência, pelas reduzidas taxas de biodegradação destas substâncias em áreas contaminadas. Macromoléculas por sua vez devem ser quebradas em partes menores por enzimas extracelulares para viabilizar o seu transporte para o interior de células microbianas. A adsorção de uma macromolécula a uma superfície pode aumentar ou diminuir as possibilidades de ataque de enzimas hidrolíticas, dependendo de a adsorção mascarar ou não sítios de ataque destas enzimas.

A possibilidade de filmes condicionantes servirem como fonte de carbono para microrganismos, portanto, depende da quantidade (espessura) e da composição da matéria orgânica dos filmes. Filmes depositados de soluções biológicas (sangue, soro, lágrimas, saliva, sucos, leite etc.) contém uma quantidade relativamente grande de matéria orgânica facilmente degradável, que inclui macromoléculas (proteínas, polissacarídeos etc.) e substâncias de baixo peso molecular (aminoácidos, ácidos graxos etc.). A utilização de macromoléculas do filme condicionante como fonte de carbono por microrganismos depende da possibilidade de ação de enzimas degradadoras extracelulares sobre as moléculas aderidas. Samuelsson & Kirchman (1991) estudaram o metabolismo por *Pseudomonas* S9 de ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase (rubisco) adsorvida. Apesar de uma quantidade maior de rubisco adsorver a substratos hidrofóbicos, a proteína foi hidrolizada mais rapidamente em superfícies hidrofílicas, provavelmente devido à sua maior acessibilidade a enzimas proteolíticas nestes substratos. O crescimento de *Pseudomonas* S9 foi inicialmente mais rápido com rubisco adsorvida em superfícies hidrofílicas. Após cerca de seis horas, as taxas de crescimento deste organismo em substratos hidrofílicos se reduziram significativamente, provavelmente devido à redução da quantidade de rubisco disponível, e o crescimento passou a ser comparativamente mais rápido em superfícies hidrofóbicas.

A maior parte do carbono orgânico dissolvido em ambientes oligotróficos, que é o precursor dos filmes condicionantes, é constituído de macromoléculas recalcitrantes de difícil biodegradação do grupo das substâncias húmidas (MÜNSTER, 1993). A utilização destas substâncias não leva à formação de grandes quantidades de biomassa devido ao baixo rendimento metabólico (grama de biomassa produzida por grama de substrato consumido). Além disto deve-se considerar que a área de contato do microrganismo com o substrato é pequena devido à curvatura da maioria das células bacterianas. Somente a parte da superfície da célula sem contato físico com o substrato estará disponível para o transporte de nutrientes do filme condicionante. A quantidade de matéria orgânica disponível na área de contato da célula é muito pequena em relação às necessidades metabólicas da célula. Mozes & Rouxhet (1992) calcularam que os dissacarídeos de um filme condicionante de 1 nm de espessura em uma área de contato de $1 \mu\text{m}^2$ (muito superior à área de contato real entre células e substratos) seriam metabolizados em 10 segundos se a célula aderida tivesse taxas de metabolismo comparáveis com as taxas medidas em solução. É possível também calcular a área

de filme condicionante necessária para produzir uma célula, assumindo-se que este filme esteja constituído inteiramente pela proteína rubisco e baseado nas seguintes premissas: (a) a célula é uma esfera de 0,5 µm de diâmetro; (b) a célula consiste de 80% água e 20% matéria orgânica e tem densidade de aproximadamente 1 g/cm³; (c) a quantidade de rubisco adsorvida é 0,45 µg/cm³, equivalente ao máximo medido por Samuelsson & Kirchman (1991); (d) o rendimento de biomassa do crescimento com rubisco é de 1 g de biomassa por grama de rubisco consumida. A produção da biomassa de uma célula demandaria o consumo de toda a rubisco adsorvida em uma área de 2,9 µm², o que equivale a cerca de 15 vezes a área de projeção da célula sobre a superfície (a área de contato real desta célula esférica é muito menor do que a projeção do diâmetro sobre a superfície). Rubisco é uma proteína de boa biodegradabilidade. No caso de filmes condicionantes de águas naturais, a área da superfície necessária para produzir a biomassa de uma célula seria muito maior. Processos de difusão em superfície de compostos aderidos poderiam talvez suprir as necessidades básicas do metabolismo e permitir a sobrevivência destas células em um estado de latência metabólica (KJELLEBERG *et al.*, 1982). Os microrganismos evoluíram uma série de estratégias para aumentar a sua área de contato com superfícies e com isto acessar a quantidade de nutrientes necessária para seu crescimento (MARSHALL, 1996). *Leptospira biflexa* (KEFFORD *et al.*, 1982) e *Pseudomonas JD8* (POWER & MARSHALL, 1988) se deslocam sobre as superfícies para acessar ácidos graxos adsorvidos e se soltam da superfície quando o reservatório de nutrientes está exaurido. *Vibrio* sp. MH3 adere à superfície condicionada com ácidos graxos, metaboliza estes nutrientes, inicia a replicação celular na superfície, mas retorna à fase planctônica para completar a divisão celular (POWER & MARSHALL, 1988). *Vibrio DW 1* adere à superfície condicionada de forma irreversível, sendo que somente a célula-filha retorna à fase planctônica (KJELLEBERG *et al.*, 1982). Neste caso o filme condicionante serve como fonte de nutrientes somente na fase de crescimento inicial da célula-mãe.

A quantidade e a composição da matéria orgânica de filmes condicionantes do meio ambiente, portanto, sugere que estas moléculas não são uma fonte de carbono importante para o crescimento de biofilmes em superfícies expostas a ambientes oligotróficos. Esta hipótese foi confirmada em estudos que demonstraram que a atividade biodegradadora de bactérias no interior de biofilmes era maior quando estas estruturas ficaram expostas em canais com velocidade mais elevada de escorrimento superficial da água de um riacho (BATTIN *et al.*, 2003). As moléculas orgânicas do meio e não as do filme condicionante são a principal fonte de carbono para microrganismos de biofilmes. A formação de biofilmes suspensos (flocos) ocorre somente em meios líquidos com elevada disponibilidade de carbono, como esgoto doméstico ou efluente de indústrias. Florações de bactérias heterotróficas podem ocorrer ocasionalmente também em ambientes normalmente oligotróficos, como represas ou oceanos (ALLDREDGE & SILVER, 1988). Neste caso, a fonte de carbono é produzida *in loco* pela intensa atividade de organismos autotróficos, principalmente algas e cianobactérias. Bactérias autotróficas também podem formar biofilmes em superfícies sólidas, utilizando como fonte de carbono o bicarbonato dissolvido na água.

3. Formação e estrutura de biofilmes

A estrutura de biofilmes varia dependendo da disponibilidade de nutrientes orgânicos no meio ambiente. Em ambientes com disponibilidade suficiente de matéria orgânica e de superfícies para colonização, a formação do biofilme será iniciada pela adesão dos organismos colonizadores iniciais ao substrato (Figura 2). O substrato é a superfície sólida ou semi-sólida (hidrogel, agar, por exemplo) sobre a qual se formará o biofilme. A adesão das bactérias a superfícies geralmente não envolve, pelo menos na etapa inicial, o contato direto entre a célula e a superfície, pois substratos imersos em soluções aquosas são imediatamente cobertos por uma camada de compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos, que formam o filme condicionante. Este filme de compostos altera as propriedades físico-químicas da superfície do substrato (SCHNEIDER, 1996) e influencia a adesão de microrganismos à superfície (SCHNEIDER & MARSHALL, 1994). Um mecanismo distinto de formação de biofilmes ocorre na cavidade bucal, que é habitada por cerca de 400 espécies diferentes de organismos, cujo grande desafio é a sua permanência neste ambiente, onde as superfícies são continuamente lavadas com saliva. Os materiais inorgânicos (superfícies de dentes compostos de hidroxiapatita) expostos na boca são rapidamente cobertos por um filme condicionante de saliva. A composição deste filme é pouco variável em um indivíduo, considerando que a composição da saliva é dominada por um grupo pequeno de macromoléculas que ocorrem, individualmente, em grande concentração. A conformação química das moléculas das superfícies da cavidade bucal pode, portanto, ser assumida como invariável em um indivíduo. É esta constância dos grupos químicos expostos nas superfícies que permitiu a evolução da estratégia de coagregação na formação dos biofilmes da cavidade bucal (Figura 3). Neste caso, o biofilme se forma por um conjunto de mecanismos de crescimento clonal e de interação específica mediadas por receptores entre células e entre células e superfícies condicionadas pela saliva (RICKARD *et al.*, 2003). Os colonizadores iniciais, neste caso, são os organismos que possuem receptores para estruturas expostas na superfície de filmes condicionantes, enquanto que colonizadores secundários possuem receptores para moléculas da superfície de células de colonizadores primários. Este mecanismo

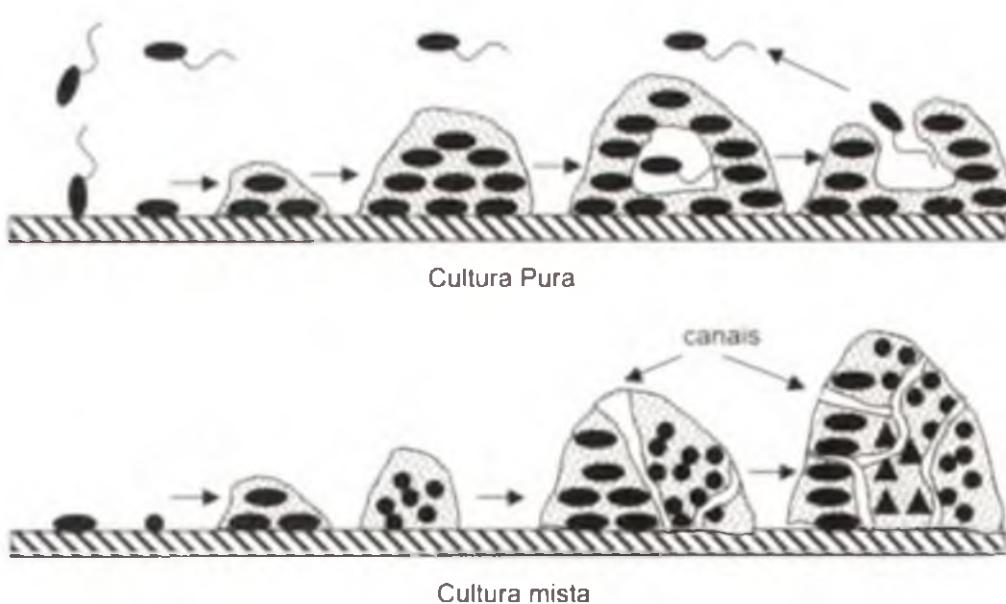


FIGURA 2. Seqüência de eventos na formação de biofilmes microbianos em superfícies sólidas ou semi-sólidas: biofilmes de cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* e de culturas mistas.

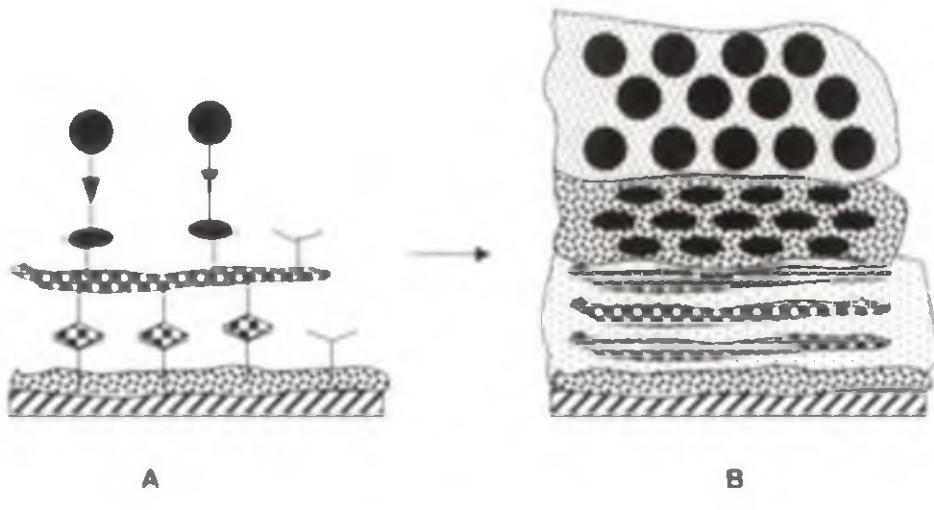


FIGURA 3. Formação de biofilmes por mecanismos de coagregação. Adesão inicial mediada por receptores: adesão entre colonizadores iniciais e filme condicionante e entre colonizadores iniciais e colonizadores secundários (A). Crescimento clonal por divisão das bactérias incorporadas no biofilme (B).

se assemelha a um quebra-cabeça, mas com uma diferença importante: existe uma flexibilidade muito grande para o encaixe das “peças” (os organismos), pois há uma diversidade muito grande de parceiros disponíveis por interação por receptores para cada organismo incorporado ao biofilme e cada novo integrante do biofilme poderá se proliferar por divisão celular, utilizando os nutrientes fornecidos pela saliva.

A subpopulação dos organismos aderidos capaz de produzir biomassa a partir do metabolismo do carbono orgânico disponível no ambiente inicia a formação do biofilme através da proliferação das células e da produção da matriz de exopolímeros. Inicialmente são formadas microcolônias por reprodução clonal das células. Se a disponibilidade de fonte de carbono for suficiente para crescimento vigoroso das células, estas microcolônias se fundirão para formar um biofilme microbiano que cobrirá por completo a superfície do substrato. Biofilmes formados em ambientes naturais serão constituídos por comunidades mistas de organismos. A fusão de colônias vizinhas, o aumento de sua espessura, e a intensa atividade metabólica das células criam uma grande diversidade de microambientes no interior do biofilme, que serão colonizados por organismos adaptados para sobrevivência em ambientes anóxicos ou anaeróbios. Biofilmes espessos contém uma malha de canais interconectados de diâmetro e curvatura variável, que permite a penetração de água do meio ambiente no interior da estrutura. Estes canais também servem de caminho para a incorporação de material particulado com diâmetros de poucos μm em biofilmes (OKABE *et al.*, 1996). Material particulado capturado no interior dos canais praticamente não sai mais do biofilme (OKABE *et al.*, 1996). Biofilmes suspensos (flocos) de sistemas de tratamento de águas residuárias possuem uma estrutura semelhante à de biofilmes formados em superfícies sólidas expostas a ambientes ricos em carbono (GANCZARCZYK, 1994).

Biofilmes formados em ambientes com disponibilidade extremamente reduzida de nutrientes contém quantidades muito reduzidas de exopolímeros e podem não exceder a espessura da célula aderida. Este tipo de biofilme é provavelmente o mais comum na terra, pois predomina no maior ambiente de vida microbiana no planeta, o subsolo. Ambientes extremamente oligotróficos com reduzida disponibilidade de nutrientes para crescimento microbiano são encontrados também em indústrias, como, por exemplo, superfícies em contato com água destilada ou permeado de sistemas de osmose reversa. Exemplos de morfologia de biofilmes microbianos estão indicados na Figura 4.

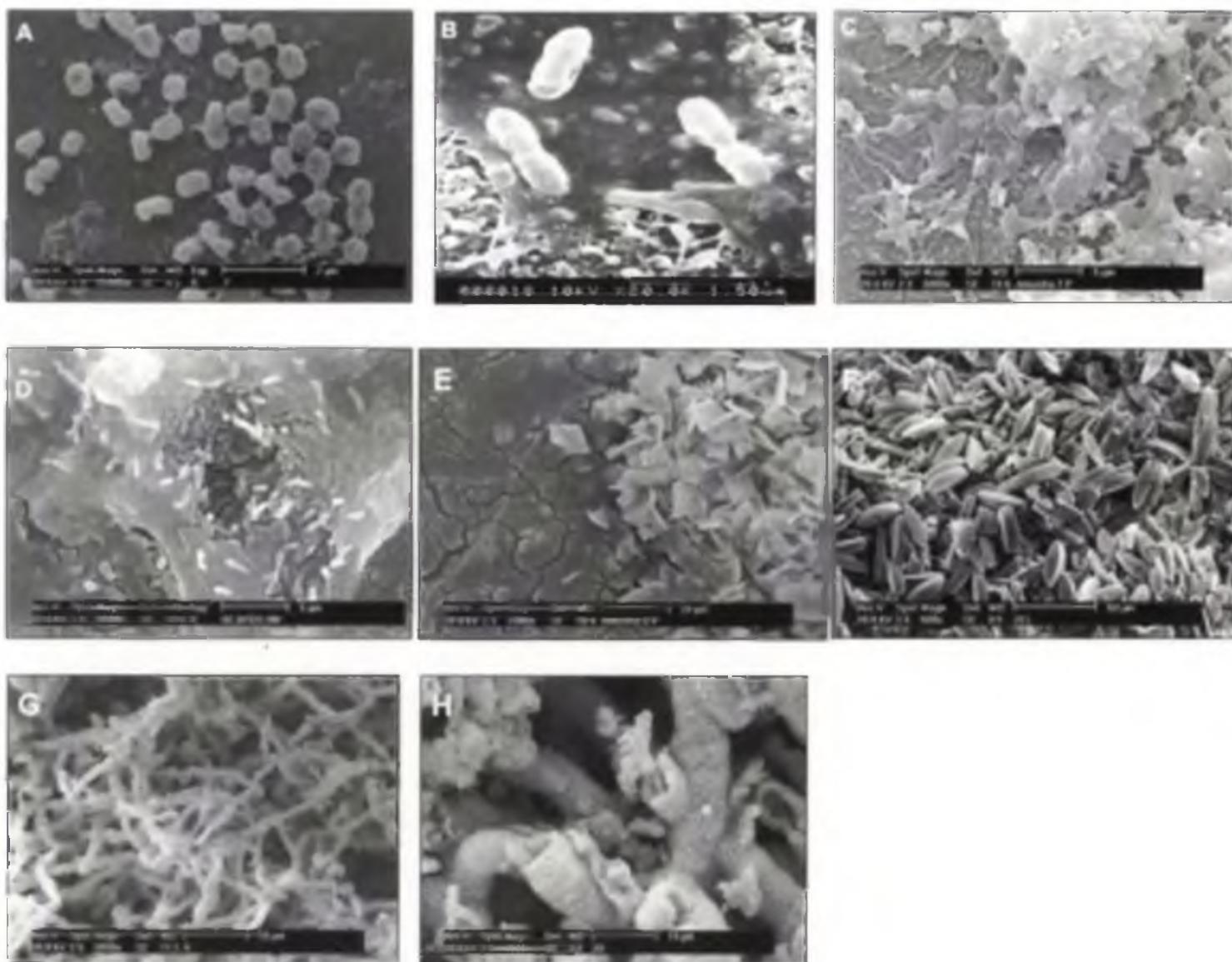


FIGURA 4. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes: A: início da formação de biofilme em material filtrante; B: proliferação inicial de bactérias formadoras de biofilme na superfície de membranas de microfiltração. Note a grande quantidade de exopolímero excretada pelos organismos; C: Crescimento de biofilme na superfície de membrana de osmose reversa; D o mesmo biofilme de C em estágio mais avançado de desenvolvimento; E: biofilme de membrana de osmose reversa com depósito de cristais de sulfato de bário; F: biofilme de diatomáceas sobre suporte de membrana de osmose reversa; G: biofilme de tubérculos de biocorrosão; H: detalhe de biofilme de tubérculos de biocorrosão. Note os espessos depósitos de óxidos de ferro biogênicos na superfície das bactérias com morfologia helicoidal.

4. Formas de dispersão de biofilmes

Os mecanismos de dispersão de biofilmes são relativamente pouco estudados. Biofilmes são sistemas dinâmicos, além da incorporação de material e do crescimento dos organismos ocorre também a liberação de material para o meio-ambiente. Existem três mecanismos distintos de dispersão de biofilmes ou de células de biofilmes (Figura 5): dispersão de organismos individuais e de fragmentos de biofilme pelo meio líquido ou pela superfície, sem perda de contato. A emissão de organismos individuais ocorre continuamente em biofilmes (TELGMANN *et al.*, 2004). Os mecanismos exatos que permitem a organismos se desprender de biofilmes são pouco conhecidos. No caso

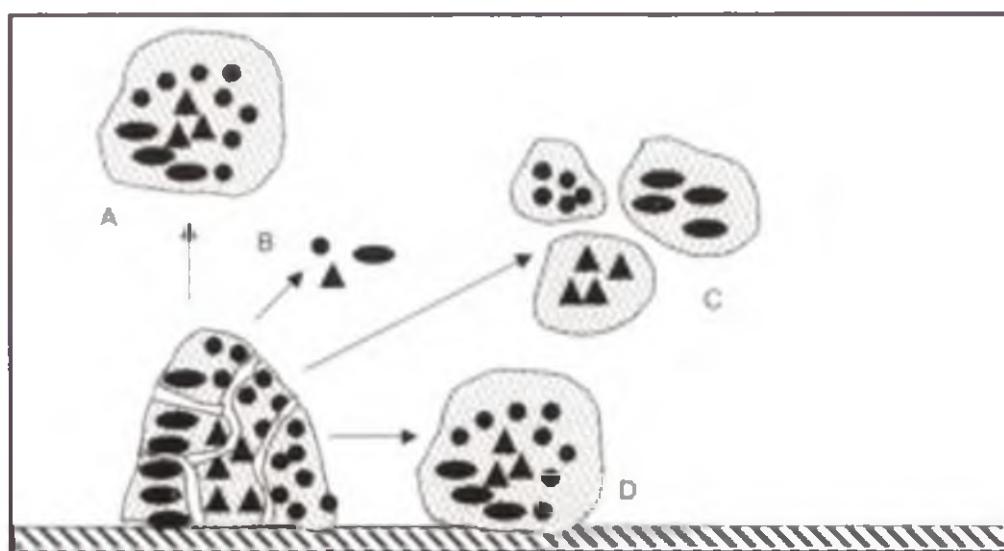


FIGURA 5. Mecanismos de dispersão de biofilmes. Desprendimento de pedaço de biofilme para o meio (A), de células individuais (B), de agregados pequenos de células (C) e desprendimento de pedaços de biofilme que permanecem associados à superfície (D).

de biofilmes de culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa* não mucoides, ocorre uma diferenciação dos organismos do biofilme após a formação inicial das estruturas de “cogumelos” (KLAUSEN *et al.*, 2003). Células localizadas na parte externa do biofilme apresentam o fenótipo de biofilme, ou seja, os organismos permanecem em estado não-móvel e produzem grandes quantidades de exopolímeros. Parte das células localizadas no interior destas estruturas lisam por fatores ainda pouco conhecidos (ativação de fagos, diferenciação fenotípica, exaustão de nutrientes etc.). Esta lise gera espaços vazios no interior do biofilme, onde ocorre uma desdiferenciação dos fenótipos de biofilme de algumas células, que passam a reassumir o fenótipo de vida livre caracterizado pela presença de flagelos. Estes organismos móveis ficam inicialmente confinados no interior dos ocos do biofilme, mas eventualmente deixam a estrutura através de brechas na camada externa formada por organismos com fenótipo imóvel de biofilme.

Os outros dois processos de dispersão geralmente resultam no desprendimento de blocos de biofilme contendo agregados de células envoltas pela matriz de exopolímeros. Estes organismos, portanto, apresentam o fenótipo de biofilme. O tamanho dos agregados é muito variável. Os agregados podem ser constituídos de um número pequeno de células ou constituir fragmentos macroscópicos de biofilme. Os agregados podem aderir em superfícies diferentes e assim constituem uma forma eficaz de colonização de novos ambientes por biofilmes pré-formados. O processo de desprendimento de fragmentos de biofilme é denominado de sloughing em inglês. Este processo é aleatório (TELGMANN *et al.*, 2004) e os mecanismos que causam a fratura do biofilme ainda são pouco conhecidos. Alguns organismos são capazes de se deslocar em superfícies sem perda de contato com o substrato (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2005). Biofilmes também possuem mecanismos que permitem a sua dispersão sem perda de contato com a superfície (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2005). A energia para esta forma de deslocamento de biofilmes na superfície é fornecida pelas forças de cisalhamento do líquido. Este modo de dispersão ocorre em superfícies em contato com sistemas de transporte turbulento e pode atingir velocidades de 1mm/h (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2005). Os fragmentos de biofilmes nestes casos podem literalmente rolar sobre a superfície (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2005). Foi também observado o arraste do biofilme em bloco pela superfície (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2005).

5. A matriz de biofilmes

A composição de biofilmes de ambientes naturais é muito variável e depende de vários fatores, entre os quais se incluem: (a) a disponibilidade de matéria orgânica biodegradável para formação de biomassa; (b) a presença de matéria orgânica relativamente inerte particulada ou dissolvida, como, por exemplo, substâncias húmicas, que podem ser incorporadas em biofilmes; (c) a presença de partículas de compostos inorgânicos; (d) a disponibilidade de compostos inorgânicos dissolvidos que podem ser incorporados na estrutura de biofilmes através da atividade microbiana ou por processos de precipitação de sais. Uma análise da composição do carbono orgânico de biofilmes formados na superfície de canalização de coleta de esgotos revelou que 35% do carbono estava associado a matéria orgânica não identificada, 25% eram proteínas extracelulares, 16% eram substâncias húmicas, 15% do carbono estava associado aos microrganismos, 7% eram polissacarídeos e 1% eram DNA e ácidos urônicos (JAHN & NIELSEN, 1998). Cerca de 80% a 90% do carbono orgânico destes biofilmes era extracelular. A presença de proteínas e de DNA extracelulares no interior de biofilmes pode indicar a ocorrência de lise das células. Biofilmes formados em ambientes saturados de sais podem incorporar uma quantidade significativa de cristais precipitados. Biofilmes microbianos são os principais agentes de corrosão microbiana. O teor de compostos inorgânicos em biofilmes de corrosão ultrapassa 75%, primordialmente minerais à base de óxidos de ferro. Quantidade semelhante de óxidos de ferro pode ser incorporada em biofilmes expostos a ambientes microaerófílicos com elevada disponibilidade de ferro solúvel. Todos estes compostos formam a matriz de biofilmes.

O principal elemento estrutural da matriz são os polímeros extracelulares produzidos pelos organismos do biofilme (BRANDA *et al.*, 2005). Estes compostos garantem a integridade mecânica da estrutura do biofilme e são os principais responsáveis pelas propriedades físico-químicas que condicionam a fisiologia dos organismos localizados no interior do biofilme. A diversidade estrutural de biofilmes microbianos sugere que a diversidade de exopolímeros produzidos por células de organismos formadores de biofilme deve ser grande, mas somente poucos destes polímeros foram identificados e caracterizados mais detalhadamente. Uma dificuldade metodológica importante destes trabalhos é a separação dos compostos da superfície de células do interior do biofilme, sem danificar as células. Os componentes da matriz mais bem estudados são os polissacarídeos. A produção destes compostos é induzida rapidamente após a adesão de microrganismos a superfícies (DAVIES & GEESEY, 1995). A estabilização estrutural dos exopolissacarídeos de biofilmes ocorre através da formação de pontes iônicas de íons de cálcio e de magnésio e também pelo enovelamento de cadeias vizinhas de polissacarídeos no formato de hélices (WINGENDER *et al.*, 1999). Os polissacarídeos de biofilmes são estruturas altamente higroscópicas. Cerca de 85% a 95% do peso de biofilmes com composição predominantemente orgânica é constituído de água. Biofilmes podem ser, portanto, considerados hidrogéis. A matriz é responsável por uma propriedade mecânica importante de biofilmes, a viscoelasticidade. A viscoelasticidade é uma propriedade

de certos materiais elásticos, cuja viscosidade aumenta com o incremento da força que atua sobre o material. Esta viscoelasticidade permite a biofilmes absorver condições transientes de aumento de forças de cisalhamento através da deformação elástica, o que evita a ruptura do biofilme. Caso estas condições perdurarem por mais tempo, o biofilme responde de forma dinâmica através de seu deslocamento por arraste na superfície sem perda de contato com a mesma.

6. Fisiologia de organismos do biofilme

Os principais fatores que determinam as propriedades fisiológicas de organismos no interior de biofilmes são a matriz e a atividade metabólica dos organismos. A matriz do biofilme influencia a atividade dos microrganismos através de quatro mecanismos distintos:

- Fixação da posição relativa das células no interior do biofilme durante longos períodos de tempo
- Peneira molecular
- Barreira de difusão
- Efeito cromatográfico

O mecanismo mais importante é a fixação da posição da célula dentro da estrutura e a manutenção de sua posição relativa com relação ao posicionamento dos outros organismos durante longos períodos de tempo. A função de peneira molecular é assumida pelos poros da matriz, cujo diâmetro varia entre 44 nm a 90 nm. Estes poros excluem moléculas de diâmetro maior do biofilme: partículas, colóides de tamanho maior do que o diâmetro dos poros e macromoléculas grandes, como, por exemplo, anticorpos. Estas partículas podem penetrar os biofilmes através dos canais que permanecem abertos na estrutura, mas ficarão separadas das células pela matriz. Uma segunda função importante da matriz é a sua atuação como barreira de difusão. Os poros da matriz impedem a difusão de moléculas, por menores que sejam, em linha direta para as células. As moléculas que penetram a matriz se movimentam por caminhos tortuosos pelo interior do biofilme, o que reduz consideravelmente a sua taxa de difusão. Este mecanismo é mais efetivo para moléculas de peso molecular maior e para compostos que interagem por mecanismos físico-químicos com a matriz, do que para moléculas pequenas e relativamente inertes. Por exemplo, o coeficiente de difusão de moléculas de oxigênio, nitrato e amônia no interior de biofilmes é cerca de 60 a 80% do coeficiente de difusão destas moléculas na água, um valor reduzido para cerca de 20% no caso de moléculas como fenol, glicose ou mesmo substâncias de peso molecular muito mais elevado, como a dextransa (10.000D, STEWART, 2003; BRYERS & DRUMMOND, 1998). Este mecanismo contribui para a retenção de enzimas extracelulares na vizinhança das células produtoras destas enzimas no interior de biofilmes, o que pode aumentar a disponibilidade dos monômeros produzidos por estas enzimas para estas células. Por exemplo, em um biofilme de cultura pura de

bactéria degradadora de quitina estabelecido sobre superfícies de quitina, cerca de 30% dos organismos que estavam fisiologicamente ativos não expressavam os genes da quitinase, mas utilizavam os monômeros da quitina mobilizados pela atividade da quitinase produzida pelos outros 70% dos organismos do biofilme (BATY *et al.*, 2000). O terceiro mecanismo importante pelo qual a matriz influencia a atividade microbiana é a sua atuação como resina cromatográfica, que retarda ou impede a penetração de moléculas com elevada afinidade pela matriz no biofilme.

O ambiente de crescimento de bactérias no interior de biofilmes é determinado por gradientes de substratos e metabólitos formados pela combinação da resistência da matriz à difusão destes produtos e pelo metabolismo microbiano, que produz ou transforma estes produtos. Esta combinação de gradientes limita as taxas de crescimento dos organismos no interior de biofilmes. Células de biofilmes são organismos pequenos, de tamanho muito inferior ao de células em crescimento exponencial (JAHN & NIELSEN, 1998). Fisiologicamente, os organismos de biofilmes são mais parecidos a organismos da fase estacionária do que da fase exponencial (SPOERING & LEWIS, 2001). Biofilmes são as únicas estruturas microbianas que permitem a coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios estritos a distâncias de poucas centenas de micrômetros um do outro. O mecanismo que permite esta façanha é a combinação da fixação da posição do organismo no interior do biofilme, a função de barreira de difusão da matriz e a atividade metabólica dos organismos do biofilme (Figura 6). Em ambientes aeróbios, a interface entre o biofilme e o meio será ocupada por organismos aeróbios (KÜHL & JORGENSEN, 1992). A atividade metabólica destes organismos aliada à restrição de difusão do oxigênio na matriz resulta na remoção completa do oxigênio em profundidades que variam de 100 µm a 200 µm (KÜHL & JORGENSEN, 1992). As camadas inferiores do biofilme serão colonizadas por organismos anaeróbios, sendo que na zona de transição com a parte aeróbia predominarão bactérias facultativas tolerantes a oxigênio, como as fermentadoras e as denitrificantes, que serão substituídas nas partes mais profundas e com potencial redox mais baixo por bactérias estritamente anaeróbias, como as sulfato-redutoras e metanogênicas (Figura 6, KÜHL & JORGENSEN, 1992; DAMGAARD *et al.*, 2001). O sulfeto de hidrogênio ou o metano produzidos na parte anaeróbia do biofilme podem não ser detectados na parte aeróbia, pois ambos os compostos podem ser oxidados por bactérias nas zonas aeróbia ou denitrificante do biofilme (KÜHL & JORGENSEN, 1992). Estas características de coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios no interior de biofilmes ocorrem também em biofilmes suspensos. Flocos de sistemas de lodo ativado, por exemplo, contém bactérias denitrificantes, cuja atividade depende da concentração de oxigênio residual no reator (SCHRAMM *et al.*, 1999). Os mecanismos responsáveis pela criação de microambientes anaeróbios em

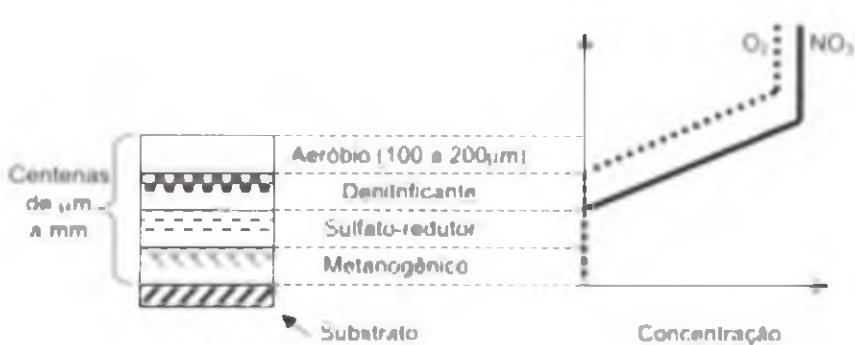


FIGURA 6. Representação esquemática da estrutura trófica de biofilmes com matriz aderidos ou suspensos.

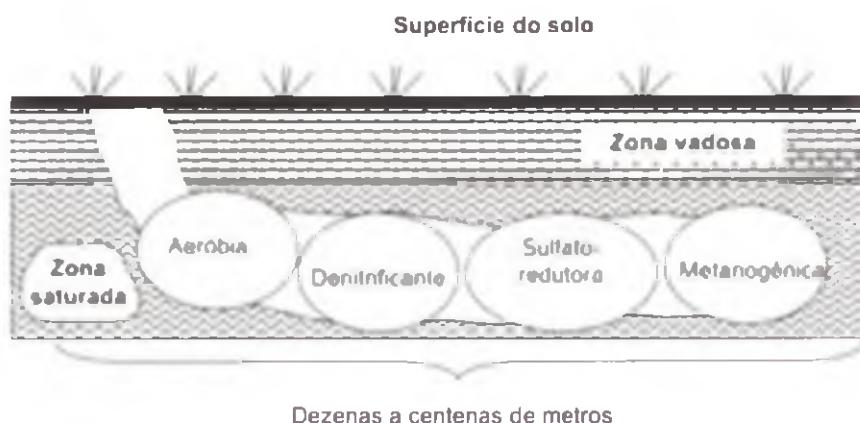


FIGURA 7. Representação esquemática da estrutura trófica de biofilmes em ambientes oligotróficos de subsolo.

biofilmes microbianos ainda não está resolvida. Alguns autores afirmam que células de biofilmes expressam um fenótipo característico desta estrutura (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004) enquanto que outros autores indicam que os genes expressados no interior de biofilmes também podem ser ativados em células planctônicas em condições equivalentes de meio-ambiente (GHIGO, 2003). Um tema de grande interesse na pesquisa sobre biofilmes é a importância de sistemas de quorum sensing na formação destas estruturas. Davies *et al.*, (1998) demonstraram que a expressão dos genes de quorum sensing era essencial para a formação da estrutura cogumelar de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. É importante ressaltar, porém, que a remoção dos genes dos sistemas de quorum sensing não impediu a formação de biofilmes por este organismo, mas alterou a estrutura do biofilme. Biofilmes de mutantes incapazes de produzir as moléculas de quorum sensing eram muito mais compactos, indicando que o sistema de quorum sensing é essencial para a produção da matriz extracelular. Este resultado foi confirmado para muitos outros organismos formadores de biofilmes e é coerente com o perfil dos genes regulados pelos sistemas de quorum sensing. Este sistema regulatório controla, principalmente, a expressão de genes de proteínas relacionados com produção de materiais excretados por células de microrganismos, incluindo fatores de virulência, enzimas de síntese de exopolímeros etc. (CÁMARA *et al.*, 2002).

7. Biofilmes microbianos na natureza

Biofilmes colonizam virtualmente todos os ambientes habitáveis por microrganismos e estão entre as estruturas biológicas mais antigas da terra. Fósseis de biofilmes foram identificados em rochas sul africanas com idade entre 3,4 a 3,5 bilhões de anos (WESTALL *et al.*, 2001) e em rochas australianas com idade de cerca de 3,2 bilhões de anos (RASMUSSEN, 2000). Estruturas fósseis de biofilmes de cianobactérias semelhantes aos estromatólitos existentes atualmente em várias partes do globo foram encontradas em várias estruturas rochosas com idade muito antiga (DUPRAZ & VISSCHER, 2005). Estromatólitos são biofilmes formados por bactérias autotróficas, cuja atividade metabólica resulta na precipitação de carbonatos e de outros compostos inorgânicos e cuja matriz extracelular agrupa partículas

biofilmes compactos de superfície também atuam, em escala geométrica muito maior, no subsolo, onde a atividade das células aderidas nas partículas de solo cria uma seqüência de ambientes com potenciais redox progressivamente menores ao longo da direção de fluxo do aquífero (Figura 7).

A questão sobre a existência ou não de um fenótipo típico e exclusivo de

inorgânicas, formando estruturas rochosas com camadas alternadas de depósitos de matéria orgânica e de materiais inorgânicos (DUPRAZ & VISSCHER, 2005). Os estromatólitos de comunidades de organismos fotossintéticos primordiais foram provavelmente as primeiras estruturas macroscópicas biológicas formadas na terra e dominaram as zonas de mares ou lagoas rasas durante todo o período pre-cambriano. O oxigênio produzido por estes organismos modificou gradualmente a composição atmosférica, até que esta se tornasse uma atmosfera oxidante. Os estromatólitos modernos são comunidades complexas de microrganismos que incluem cianobactérias e organismos heterotróficos e oxidadores de sulfetos nas partes aeróbias do biofilme e organismos fermentadores e bactérias sulfato-redutoras nas partes anaeróbias das estruturas (DUPRAZ & VISSCHER, 2005). Os mecanismos de precipitação de minerais no interior de estromatólitos ainda não foram totalmente elucidados, mas suspeita-se que a matriz extracelular de biofilmes seja de importância fundamental para a formação de núcleos de cristalização.

Os biofilmes naturais mais espessos na atualidade são provavelmente as mantas microbianas que se formam em lagoas e rios de água doce, em ambientes marinhos de águas rasas, em lagos com águas hipersalinas e em ambientes de águas hidrotermais (DUPRAZ & VISSCHER, 2005). Mantas microbianas podem atingir espessuras de algumas dezenas de centímetros e são caracterizadas por uma estrutura interna lamelar. Estas mantas são formadas por microrganismos autotróficos, mas constituem, na realidade, ecossistemas extremamente complexos e com grande diversidade de organismos, que incluem representantes de seis grupos principais. O carbono orgânico das mantas é produzido pelos produtores primários, principalmente pelas cianobactérias aeróbias, muitas das quais também possuem a capacidade de fixação de nitrogênio. A contribuição da fixação de carbono por organismos de fotossíntese anaeróbia (bactérias púrpuras e verdes) é relativamente pequena. Cianobactérias filamentosas e cocóides produtoras de exopolímeros produzem a matriz responsável pela retenção de compostos orgânicos e inorgânicos e pela coesão da manta. O carbono orgânico incorporado na manta pelos produtores primários sustenta uma diversa e numerosa comunidade de organismos heterotróficos, que inclui organismos aeróbios, fermentadores e bactérias sulfato-redutoras. Os organismos no interior das mantas estão sujeitos a ciclos diários de alterações drásticas das condições ambientais (REVSBECH & WARD, 1984). A intensa atividade fotossintética das cianobactérias produz um aumento vertiginoso na concentração de oxigênio no interior da manta durante o dia, que atinge o seu pico algumas horas após o meio-dia. O aumento da concentração de oxigênio é acompanhado por um forte incremento do pH interno da manta. Ao anoitecer e com a diminuição da energia da radiação a atividade metabólica no interior da manta passa a ser dominada pelos organismos heterotróficos aeróbios, que rapidamente consomem o oxigênio e tornam o ambiente anóxico, o que viabiliza a atividade de bactérias fermentadoras e anaeróbias. A ação conjunta dos organismos heterotróficos reduz drasticamente o pH no interior da manta. Os organismos que colonizam o espaço interno de mantas microbianas, portanto, devem resistir a estresses consideráveis produzidos pela atividade fisiológica dos grupos dominantes.

A grande maioria dos organismos que habitam solos e subsolos vive aderida às superfícies minerais e não suspensa no aquífero (GRIEBLER *et al.*, 2002). A

reduzida disponibilidade de carbono nestes ambientes pode inibir o crescimento de biofilmes e manter as células aderidas em um estágio inicial do biofilme (KRUMHOLZ, 2000) sem a formação da matriz de exopolímeros, que ocorre, por exemplo, em biofilmes associados a superfícies minerais expostas na superfície (KEMMLING *et al.*, 2004). Estudos em minas profundas revelaram a capacidade de a microbiota nativa formar biofilmes contínuos e relativamente espessos quando é permitido o escoamento das águas dos aquíferos profundos sobre superfícies artificiais ou naturais (MOSER *et al.*, 2003). Praticamente todas as superfícies expostas em ambientes aquáticos são colonizadas rapidamente por biofilmes microbianos (ARMSTRONG *et al.*, 2001). Microrganismos de biofilmes associados a superfícies vivas ou a substratos inanimados são responsáveis pela maior parte da atividade metabólica microbiana em águas naturais (HAGLUND *et al.*, 2002). Biofilmes microbianos estabelecidos em superfícies naturais ou artificiais nas margens de rios ou lagos são importantes agentes nos ciclos biogeoquímicos destes corpos aquáticos (MAGALHÃES *et al.*, 2003).

Biofilmes microbianos colonizam superfícies de animais e plantas (FETT & COOKE, 2005). O desenvolvimento de biofilmes na parte interna dos organismos pode causar sérios problemas de infecções e levar o hospedeiro a óbito (DONLAN & COSTERTON, 2002). A formação de biofilmes na superfície externa geralmente não é nociva para o hospedeiro e pode ser importante para a sobrevivência do animal ou da planta. Por exemplo, a colonização de superfícies de raízes por biofilmes microbianos ou fúngicos é essencial para a nutrição de plantas (RAMEY *et al.*, 2004). A associação de biofilmes microbianos com muitos animais e plantas marinhas é uma associação simbiótica, que confere vantagens para os hospedeiros, como, por exemplo, a redução da intensidade da colonização das superfícies de algas por biofilmes deletérios (ARMSTRONG *et al.*, 2001). Biofilmes microbianos estabelecidos em superfícies inanimadas geralmente precedem a colonização de moluscos e cracas. Os biofilmes produzem substâncias atrativas para as larvas destes animais (WIECZOREK & TODD, 1998). Um caso interessante de associação simbiótica entre um biofilme microbiano e um inseto é a associação de estreptomicetos com saúvas (CURRIE *et al.*, 1999). Partes da cutícula de saúvas são cobertas com densos biofilmes de *Streptomyces* sp., um microrganismo filamentoso que produz um potente antibiótico contra um fungo parasítico do gênero *Escovopsis*. Este fungo parasita os fungos da família *Lepiotaceae* cultivados pelas formigas nos vegetais cortados acumulados no interior do ninho e que serve de alimento para os insetos. Além de produzir um potente antibiótico contra o fungo parasítico, as células de *Streptomyces* também produzem compostos que estimulam o crescimento dos fungos benéficos para as formigas.

8. Emprego de biofilmes em processos industriais

Os maiores sistemas de cultivo de organismos na atualidade são os reatores biológicos de tratamento de águas residuárias. Efluentes industriais ou domésticos são caracterizados por baixas concentrações de carbono orgânico comparado com meios de cultura utilizados em fermentações industriais para a produção de metabólitos

de alto valor agregado (aminoácidos, antibióticos, etanol, entre outros). Os volumes de tratamento podem ser gigantescos, da ordem de várias dezenas de metros cúbicos por segundo no caso de plantas de tratamento de esgotos de grandes cidades. A minimização do volume operacional dos reatores de tratamento de águas residuárias depende da alimentação contínua e da maximização da concentração de biomassa. A concentração de biomassa em um reator de cultura contínua de células planctônicas sem retenção de biomassa é diretamente proporcional à concentração de substrato no meio de cultura. Esta configuração demandaria um volume muito grande de reator para tratamento de soluções com baixas concentrações de compostos orgânicos. O emprego de biofilmes imobilizados em substratos ou suspensos permite acumular a biomassa no reator e com isto aumentar consideravelmente a eficiência do processo (GANCZARCZYK, 1994; NICOLELLA *et al.*, 2000). Reatores de biofilme podem ser divididos em várias categorias em função da estrutura do biofilme. Em reatores de lodo ativado são empregados biofilmes suspensos de baixa densidade e relativamente pouco compactos, os flocos, que têm um diâmetro relativamente pequeno (até 1 mm) e uma taxa de sedimentação baixa (5 m/h, NICOLELLA *et al.*, 2000). Esta baixa taxa de sedimentação não permite a retenção da biomassa diretamente no reator. A retenção de biomassa em sistemas de lodo ativado é obtida através da recirculação parcial da biomassa decantada em um decantador secundário alimentado com o efluente do reator biológico. Falhas na formação dos flocos ou na estrutura dos flocos causadas principalmente pelo crescimento descontrolado de bactérias filamentosas impedem a sedimentação eficiente nos decantadores secundários, e são problemas operacionais importantes de plantas de lodos ativados (MARTINS *et al.*, 2004).

Grânulos são biofilmes suspensos mais densos, de tamanho maior (diâmetros entre 1,5 a 3 mm) e de sedimentação mais rápida do que flocos (40 m/h, NICOLELLA *et al.*, 2000) utilizados em reatores anaeróbios de fluxo ascendente (grânulo puramente biológico) ou em reatores de leitos fluidizados (geralmente os grânulos de biofilme são formados sobre bases de grãos de areia ou de carvão ativado). Organismos de crescimento mais rápido como, por exemplo, as bactérias acetogênicas, ocupam a parte externa dos grânulos, enquanto que os de proliferação mais lenta, as bactérias metanogênicas, colonizam o interior das estruturas (POL *et al.*, 2004). No caso do tratamento anaeróbio, as etapas acetogênicas e metanogênicas podem ser separadas em reatores independentes (DEMIREL & YENİGÜN, 2002). Os biofilmes de reatores de filmes fixos (biodiscos, reatores de leito fluidizado, trickling filters, biofiltros, reatores com enchimentos móveis, entre outros) têm densidade e estrutura semelhante à de biofilmes de grânulos, porém são cultivados em suportes macroscópicos. Biodiscos são reatores onde os biofilmes são formados na superfície de discos fixados ao longo de um eixo (PATWARDHAN, 2003). Os discos ficam parcialmente submersos no efluente e sua rotação expõe os biofilmes alternadamente à água residuária e à atmosfera para oxigenação. Trickling filters são tanques com enchimento de material de suporte para crescimento de biofilmes (PARKER *et al.*, 2001). A água residuária é aplicada por aspersores no topo do reator e percola por gravidade formando um filme fino de líquido sobre as superfícies dos materiais de suporte de biofilme. A aeração ocorre pela circulação natural do ar entre os espaços dos enchimentos de

biofilme. Os pedregulhos empregados inicialmente como suportes de biofilmes foram substituídos nas décadas mais recentes por suportes de plástico mais leves e com maior proporção de superfície de contato por volume de reator. Biofiltros são reatores onde os biofilmes são formados na superfície de material poroso granulado, areia, por exemplo, e que podem ser empregados para o tratamento de líquidos (COHEN, 2001) ou de gases (DELHOMÉNIE & HEITZ, 2005). Os biofilmes de reatores com enchimentos móveis (MBBR - moving bed biofilm reactor) são cultivados na superfície de suportes submersos com diâmetros de cerca de 1cm, cuja pequena dimensão e densidade semelhante à da água permite que sejam misturados pela aeração do reator (ODEGAARD, 1999). Os biofilmes que crescem na parte interna destes suportes são protegidos da abrasão, ao contrário dos biofilmes cultivados na superfície de partículas de reatores de leito fluidizado.

Uma segunda grande área de tratamento de resíduos onde ocorre o emprego de biofilmes é a estabilização de resíduos sólidos em sistemas aeróbios (compostagem) ou anaeróbios. O objetivo do processo de estabilização é a biodegradação da matéria orgânica facilmente biodegradável dos resíduos, que é responsável pela emissão de poluentes gasosos (odores, compostos orgânicos voláteis) e pela contaminação de ambientes com chorume. A compostagem é um sistema aeróbio de oxidação de matéria orgânica de resíduos sólidos, onde pilhas de resíduos orgânicos são montadas de forma a permitir a circulação de ar pelo seu interior (SHARMA *et al.*, 1997). A biodegradação ocorre em 3 etapas. Na primeira etapa mesofílica ocorre a degradação de polímeros como proteínas e polissacarídeos, que gera os monômeros que permitirão o desenvolvimento de organismos termofílicos da segunda etapa de tratamento. Durante esta etapa ocorre forte aquecimento da pilha de composto, que deve ser revirada com freqüência para evitar o superaquecimento do composto e a consequente inativação dos organismos termofílicos. Esta fase de aquecimento é essencial para a inativação dos patógenos presentes no resíduo. Quando as reservas de carbono orgânico facilmente degradável são exauridas, a pilha se esfria e a comunidade microbiana passa a ser dominada por organismos degradadores das frações mais recalcitrantes da matéria orgânica, a celulose e a lignina. Esta fase de maturação pode durar muitos meses e produz o composto final escuro e com cheiro de terra característico de estreptomicetos. O composto fresco obtido após a etapa termofílica ainda contém bastante matéria orgânica biodegradável, tornando-o inadequado para uso como adubo. O composto maturado é um excelente adubo orgânico para a agricultura. A microbiota e as etapas bioquímicas dos processos anaeróbios de estabilização de resíduos sólidos (biodigestores, aterros sanitários controlados etc.) são semelhantes aos de reatores de tratamento de esgoto anaeróbios e geram como produto final, metano (GUNASEELAN, 1997). A compactação dos resíduos obtida após o tratamento anaeróbio é menor do que a obtida com o tratamento aeróbio (BORGLIN *et al.*, 2004).

O emprego de biofilmes na produção de produtos biotecnológicos é mais raro devido às dificuldades de controle preciso da cinética de reação e devido às elevadas concentrações de carbono orgânico dos meios de cultura, que dão uma vantagem competitiva para o crescimento de bactérias planctônicas. Uma exceção são processos de fermentação de estado sólido, onde o substrato é utilizado como fonte de carbono para o cultivo principalmente de fungos e de bactérias filamentosas (PANDEY *et*

al., 2000). Estes processos são a base de muitas fermentações asiáticas para a produção de alimentos baseadas na fermentação de bolores, como por exemplo a produção de tempeh (NOUT & KIERS, 2005). Outros exemplos de alimentos produzidos por biofilmes são o quefir, uma bebida láctea produzida pela fermentação de leite com grânulos (biofilmes) formados por culturas mistas de bactérias lácticas e de leveduras (WITTHUHN *et al.*, 2005) e o vinagre, produzido por um processo de fermentação de estado sólido (LIU *et al.*, 2004). Biofilmes são empregados na indústria de mineração em processos de biohidrometalurgia, onde organismos oxidadores de sulfetos são utilizados para a liberação de íons de metais de minérios à base de sulfetos, principalmente cobre e ouro (OLSON *et al.*, 2003).

9. Danos causados por biofilmes em sistemas industriais e no meio-ambiente

Biofilmes são responsáveis pela maior parte das interferências causadas por microrganismos em processos tecnológicos. Biofilmes microbianos deletérios geralmente não são constituídos somente por células microbianas, mas incluem também compostos orgânicos e inorgânicos e outros organismos (algas, fungos, cracas, moluscos, entre outros). O termo genérico para definir camadas biológicas indesejáveis que se formam em superfícies é biofouling, enquanto que fouling é o termo que designa todo o tipo de camada indesejável, independente de conter ou não organismos vivos. Um depósito químico sem microrganismos é uma camada de fouling, por exemplo. A deterioração causada por processos biológicos é denominada de biodeterioração. Exemplos de efeitos de biofouling em processo industriais incluem:

- Aumento da resistência à troca de calor em 50% em 3 meses (Casanueva *et al.*, 2003).
- O aumento do coeficiente de fricção em superfícies pela presença de biofilmes microbianos varia entre 9% a 29% quando analisado com um sistema de rotação (HOLM *et al.*, 2004) ou entre 33% a 187% em placas planas (SCHULTZ & SWAIN, 2000). O aumento do coeficiente de fricção de uma camada com espessura de 1 mm na parte submersa do casco de um porta-aviões reduz a velocidade máxima do navio em 15% e pode tornar impossível o lançamento de aviões em dias de calmaria. Um cruzador de 9.000 toneladas da marinha de guerra com casco coberto por camada de fouling gasta 45% a mais de combustível para manter uma velocidade de cruzeiro de 20 nós do que um navio com casco limpo. O aumento das despesas de combustível causadas por biofouling de cascos de navio é estimado em US\$ 750 milhões por ano (HOLM *et al.*, 2004).
- Em sistemas de filtração por membranas, a formação de biofilmes microbianos pode reduzir as taxas de filtração pela metade. A manutenção de uma taxa de filtração de projeto de uma planta de osmose reversa pode resultar no aumento considerável do custo operacional devido ao aumento da pressão de operação (SCHÄFER *et al.*, 2001).

- Biocorrosão: biofilmes aceleram as taxas de corrosão de metais por uma grande variedade de mecanismos (BEECH & SUNNER, 2004).
- Deterioração de materiais de construções naturais (WARSCHIED & BRAAMS, 2000) ou sintéticos (SAND, 1997).
- Drenagem ácida, a mobilização de metais e de acidez através da ação de biofilmes microbianos sobre resíduos de mineração, representa um dos principais impactos ambientais desta indústria e é um dos impactos de mais difícil resolução (LEDIN & PEDERSEN, 1996).
- A formação de biofilmes na superfície de implantes e de órgãos é um importante fator de morbidade de indivíduos em sociedades modernas (PARSEK & SINGH, 2003).
- Biofilmes em sistemas de distribuição de água ou de ar condicionado podem servir de reservatórios para bactérias patogênicas e compostos alergênicos (LPS, entre outros, PARSEK & SINGH, 2003).
- Biofilmes microbianos são importantes fontes de contaminação microbiana na indústria de alimentos (KUMAR & ANAND, 1998).

Os impactos econômicos causados por biofilmes são estimados em 1% do PIB em países industrializados e podem ser classificados nas seguintes categorias:

- Superdimensionamento do processo ou da estrutura: a perda da eficiência operacional de um processo pela formação de biofilmes deverá ser compensada na etapa de projeto pelo aumento da estrutura, o que acarreta gastos adicionais com material e mão de obra e aumenta os gastos operacionais.
- Gastos de controle de biofilmes: a formação de biofilmes pode ser controlada por meio de sistemas de limpeza química ou mecânica e pela adição de biocidas. Estes sistemas não seriam necessários na ausência de biofilmes. O cliente do processo incorrerá em custos mais elevados pela necessidade da instalação dos aparelhos necessários para efetuar a limpeza, e em custos operacionais maiores, pelo dispêndio adicional em produtos químicos e mão de obra. No caso da biodeterioração, corrosão, por exemplo, o processo de perda do material durante a vida útil do equipamento pela ação microbiana deve ser considerado na etapa do projeto. Em casos de risco de biocorrosão isto resulta no emprego de chapas de aço com diâmetro muito maior do que na ausência da corrosão.
- Gastos com interrupção da produção: a falha de sistemas de controles de biofilme pode resultar na interrupção de um processo de produção para reparos ou troca de peças defeituosas. Os custos para o operador das plantas não consistirão somente nos gastos com a troca de peças e os serviços de manutenção, mas geralmente a penalidade financeira maior será causada pela perda da produção. Uma parada de 1 dia de uma usina termelétrica pode causar a perda de cerca de US\$ 1 milhão em energia produzida. No caso de uma plataforma de petróleo, esta perda pode aumentar para cerca de US\$ 10 milhões.

- Risco para a saúde da população: biofilmes em sistemas de distribuição de água ou em torres de resfriamento de trocadores de calor podem servir de refúgio para patógenos. O desprendimento de pedaços de biofilme contaminados pode resultar na infecção de pessoas, que terão de se submeter a tratamento médico. Um segundo risco indireto associado à formação de biofilmes em torres de resfriamento é a contaminação da água com os biocidas empregados no controle destes biofilmes. A inalação dos aerosóis contaminados com os biocidas pode causar problemas de saúde para os operários. Biofilmes que atuam como reservatórios de patógenos são um fator importante de perda de produção na aquicultura com tanques de rede, onde a formação de camada de biofouling pode entupir os espaços abertos da rede e com isto diminuir sensivelmente a troca de água entre o interior da rede e o meio-ambiente.

10. Manejo de biofilmes

Microbiólogos geralmente empregam a palavra controle para designar medidas de eliminação de bactérias. Este termo não define adequadamente o problema da redução da formação de biofilmes em processo industriais, pois, como estes sistemas geralmente são operados em condições não-estéreis, a supressão total do crescimento microbiano é impossível. Em processos industriais é feito o manejo do biofilme, que consiste na tomada de uma série de medidas para manter a formação de biofilmes em um patamar que não cause perdas significativas nos processos (FLEMMING *et al.*, 1996). Para cada tipo de problema causado por biofilmes, podem ser determinados limites de impacto no processo acima do qual as perdas causadas pelo biofilme justificam o dispêndio com o seu manejo e abaixo dos quais a formação de biofilmes não afeta o funcionamento ou o retorno econômico do processo (Figura 8). A intensidade de manejo de biofilmes depende do tipo de dano causado e da tendência de formação de biofilmes da água de processo. No caso de trocadores de calor, biofilmes dispersos espalhados sobre a superfície podem até aumentar as taxas de troca e melhorar o rendimento do sistema, enquanto que biofilmes contínuos

aumentarão a resistência à troca de calor de maneira significativa somente após atingir uma espessura mínima (Figura 9). No caso de biofilmes que causam impacto pelo aumento do coeficiente de fricção, uma quantidade pequena de biofilme não causará impacto no processo (Figura 9). As medidas de manejo de biofilmes visam a redução de um dos dois principais fatores responsáveis pela formação destas estruturas: a carga de células (inóculo) e a quantidade de matéria orgânica

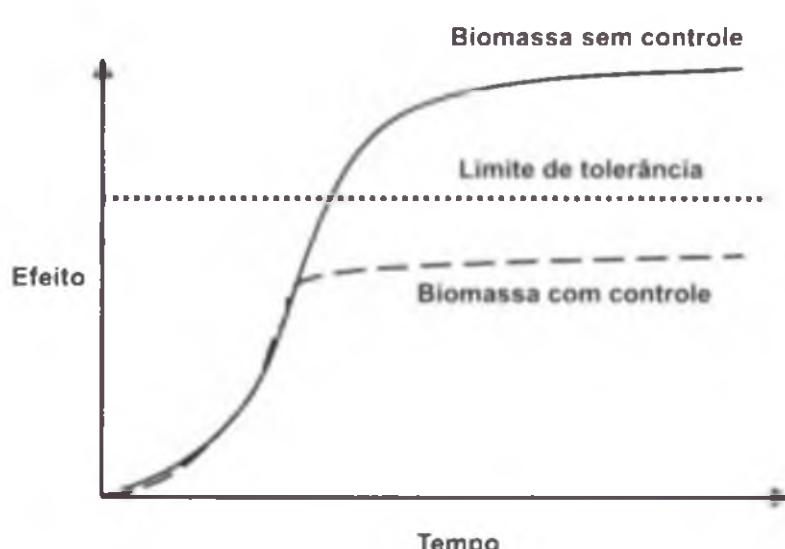


FIGURA 8. Critérios para o manejo de biofilmes.

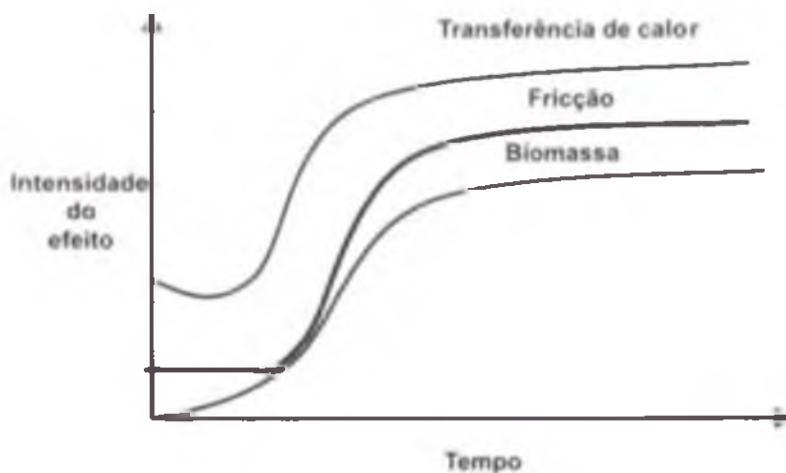


FIGURA 9. Relação entre a intensidade na interferência no processo e a espessura do biofilme.

em alguns circuitos de refrigeração ou de circulação de água de produto da indústria farmacêutica ou alimentícia.

- Redução do aporte de nutrientes através do tratamento da água em biorreatores projetados para remoção dos componentes que permitem o crescimento de biofilmes (MEESTERS *et al.*, 2003).
- Superfícies não-adesivas: uma possível solução para a redução de biofilmes em superfícies onde estes microcosmos são responsáveis pelo aumento do coeficiente de atrito é o desenvolvimento de superfícies não-adesivas ou pouco adesivas. Esta é uma linha importante de trabalho na indústria naval, onde tintas à base de silicone reduzem muito a força de adesão de cracas e moluscos aos cascos de navio, tornando possível a sua remoção através da aplicação de jatos d'água (STEIN *et al.*, 2003). Estas tintas não impedem a adesão e o crescimento destes macro-organismos nos cascos, funções cuja supressão demanda a incorporação de biocidas nas tintas. A produção de superfícies não-adesivas também está sendo investigada para redução da adesão de microrganismos a implantes. A dificuldade de desenvolver superfícies universalmente não-adesivas é a falta de conhecimento sobre a composição química dos pontos de contato entre os polímeros adesivos de microrganismos e biofilmes e os substratos e a provável grande biodiversidade destes polímeros. A formação de filmes condicionantes que antecede a adesão de microrganismos pode inviabilizar o desenvolvimento de superfícies não-adesivas para microrganismos.
- Remoção periódica de biofilmes: esta é uma das técnicas mais comuns de manejo de biofilmes. A remoção de biofilmes é obtida por meios mecânicos ou químicos quando as estruturas atingem uma espessura além da tolerável pelo processo. A limpeza química é empregada, por exemplo, na remoção de biofilmes dos canais de alimentação de elementos de osmose reversa. Procedimentos de limpeza química envolvem a exposição das superfícies com biofilmes a soluções de ácidos ou de bases misturadas com detergentes e, eventualmente, biocidas. A função dos compostos químicos é a degradação da matriz e a inativação dos microrganismos. As superfícies tratadas devem ser resistentes à ação dos agentes químicos, que são

biodegradável (alimento). Estas medidas podem ser classificadas nas seguintes categorias:

- Redução do aporte de células: o número de células em circulação em um sistema de água pode ser reduzido através da filtração por membranas de micro - ou ultrafiltração (SCHNEIDER & TSUTYIA, 2001). O custo destas unidades tem baixado muito na última década. A esterilização é economicamente viável somente

geralmente aplicados em temperaturas mais elevadas. Os procedimentos de limpeza mecânica demandam espaço para a introdução do equipamento de limpeza, as superfícies a serem tratadas também devem ser resistentes à abrasão. Fragmentos de biofilme não-removidos pelo processo de limpeza podem recontaminar o sistema com organismos mais resistentes aos produtos ou às técnicas de limpeza. A limpeza química causa um impacto ambiental considerável caso os resíduos deste processo não forem tratados adequadamente em sistemas de tratamento de águas residuárias.

- Redução do número de organismos viáveis em biofilmes: esta é uma das principais estratégias de manejo de biofilmes adotadas na prática. Os biocidas podem ser adicionados de forma contínua ou em doses de choque descontínuas muito mais elevadas. O impacto ambiental desta técnica de controle de biofilmes é considerável, pois as águas tratadas com biocidas como, por exemplo, rejeito de plantas de osmose reversa ou águas de torres de resfriamento, geralmente não são processadas em sistemas de tratamento de águas residuárias antes de lançamento no meio-ambiente. Um problema adicional desta técnica de tratamento é a resistência intrínseca elevada de biofilmes microbianos a biocidas.

A resistência de biofilmes a biocidas ocorre por quatro mecanismos distintos, que podem atuar conjuntamente ou de forma isolada (MAH & O'TOOLE, 2001):

Efeitos da matriz: a maior parte do carbono orgânico de biofilmes está concentrado na matriz extracelular, que pode atenuar o efeito de biocidas sobre as bactérias de várias maneiras diferentes. Biocidas oxidantes como o cloro, por exemplo, quando penetram no interior de biofilmes entram em contato primeiro com a matriz onde serão oxidados e inativados. Esta classe de biocidas geralmente não penetra além da camada superficial de 100 a 200 µm do biofilme (de BEER *et al.*, 1994). Biocidas não-oxidantes podem ser retidos pela matriz através de um processo de adsorção química (NICKEL *et al.*, 1985), tornando-os inócuos para as bactérias. Se os biocidas tiverem carga elétrica, a aplicação de campos elétricos pode aumentar a penetração dos biocidas na estrutura.

Fisiologia dos organismos do biofilme: os organismos de biofilme são bactérias de crescimento lento, cuja fisiologia se assemelha mais à fisiologia de organismos de fase estacionária do que de fase exponencial. Organismos de fase estacionária são mais resistentes a biocidas, o que se aplica também às bactérias do biofilme (SPOERLING & LEWIS, 2001). A redução da dose de biocida no interior do biofilme pode resultar na injúria ao invés da inativação dos organismos. Os organismos injuriados poderão se recuperar, eventualmente, após o término da ação do biocida.

Microambientes alterados no interior do biofilme: a ação de bactérias fermentadoras ou anaeróbias no interior de biofilmes pode resultar no acúmulo de subprodutos finais de fermentação, que difundirão através da estrutura e poderão reagir preferencialmente com biocidas oxidantes (MAH & O'TOOLE, 2001). Biocidas para os quais existem enzimas biodegradadoras podem ser inativados pelo acúmulo destas enzimas no espaço intracelular da matriz.

Células persistentes: células persistentes a biocidas são um fenômeno observado somente em biofilmes. Estas células são organismos que resistem aos biocidas mesmo após exposição a doses muito elevadas dos compostos aplicados por

tempos longos, que inativam mais de 99% das células do biofilme. A persistência destas células não está baseada em mutações genéticas, mas em processo fisiológicos ainda pouco elucidados (KEREN *et al.*, 2004).

Referências

- ALLDREDGE, A.L.; SILVER, M.W. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. **Progress in Oceanography**. v.20, p.41-82, 1988.
- ARMSTRONG, E.; YAN, L.; BOYD, K.G.; WRIGHT, P.C.; BURGESS, J.G. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. **Hydrobiologia**. v.461, p.37-40, 2001.
- BATTIN, T.J.; KAPLAN, L.A.; NEWBOLD, J.D.; HANSEN, C.M.E. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. **Nature**. v.426, p.439-442, 2003.
- BATY III, A.M.; EASTBURN, C.C.; TECHKARNJANARUK, S.; GOODMAN, A.E.; GEESEY, G.G. Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.3574-3585, 2000.
- BEECH, I.B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**. v.15, p.181-186, 2004.
- BORGLIN, S.E.; HAZEN, T.C.; OLDENBURG, C.M.; ZAWISLANSKI, P.T. Comparison of aerobic and anaerobic biotreatment of municipal solid waste. **Journal of the Air and Waste Management Association**. v.54, p.815-822, 2004.
- BRANDA, S.S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**. v.13, p.20-26, 2005.
- TRYERS, J.D.; DRUMMOND, F. Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). **Biotechnology and Bioengineering**. v.60, p.462-473, 1998.
- CÁMARA, M.; WILLIAMS, P.; HARDMAN, A. Controlling infection by turning in and turning down the volume of bacterial small-talk. **Lancet Infectious Diseases**. v.2, p.667-676, 2002.
- CASANUEVA, J.F.; SÁNCHEZ, J.; GARCIA-MORALES, J.L.; CASANUEVA-ROBLES, T.; LÓPEZ, J.A.; PORTELA, J.R.; NEBOT, E.; SALES, D. Portable pilot plant for evaluating marine biofouling growth and control in heat exchangers-condensers. **Water Science and Technology**. v.47, p.99-104, 2003.
- CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York: Wiley-Interscience, 1990.
- CLAUSS, F.; HELAINE, D.; BALAVOINE, C.; BIDAULT, A. Improving activated sludge floc structure and aggregation for enhanced settling and thickening performances. **Water Science and Technology**. v.38, p.35-44, 1998.
- COHEN, Y. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. **Bioresource Technology**, v.77, p.257-274, 2001.
- CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v.398, p.701-704, 1999.
- DAMGAARD, L.R.; NIELSEN, L.P.E.; REVSBECH, N.P. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. **Water Research**. v.35, p.1379-1386, 2001.
- DAVIES, D.G.; GESSEY, G.G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.860-867, 1995.
- DAVIES, D.G.; PARZEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v.280, p.295-298, 1998.
- DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, p.4339-4344, 1994.
- DELHOMÉNIE, M.C.; HEITZ, M. Biofiltration of air: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.25, p.53-72, 2005.
- DEMIREL, B.; YENİĞÜN, O. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.77, p.743-755, 2002.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, p.167-193, 2002.
- DUPRAZ, C.; VISSCHER, P.T. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. **Trends in Microbiology**. v.13, p.429-438, 2005.

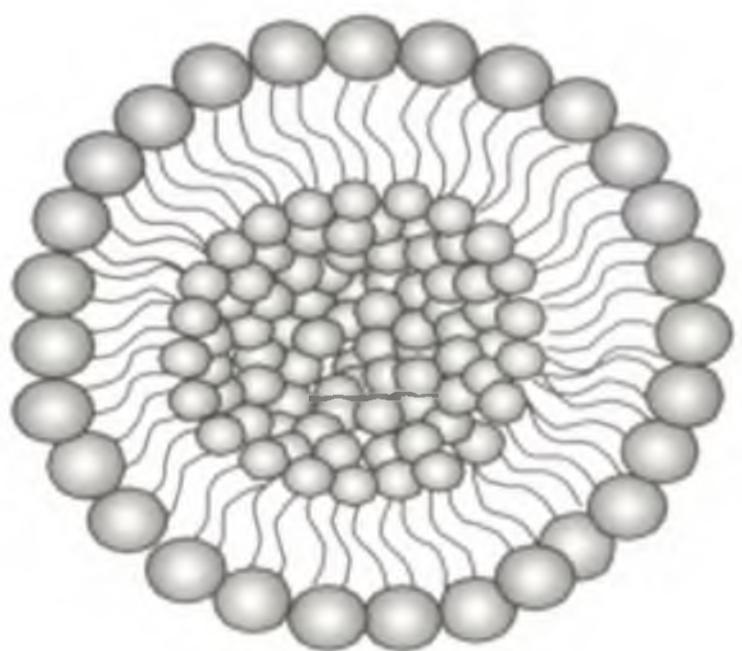
- FETT, W.F.; COOKE, P.H. A survey of native microbial aggregates on alfalfa, clover and mung bean sprout cotyledons for thickness as determined by confocal scanning laser microscopy. **Food Microbiology**, v.22, p.253-259, 2005.
- FLEMMING, H.-C.; GRIEBE, T.; SCHAULE, G. Antifouling strategies in technical systems – a short review. **Water Science and Technology**, v.34, p.517-524, 1996.
- GANCZARCZYK, J.J. Microbial aggregates in wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v.30, p.87-95, 1994.
- GHIGO, J.M. Are there biofilm specific physiological pathways without reasonable doubt? **Research in Microbiology**, v.154, p.1-8, 2003.
- GRIEBLER, C.; MINDL, B.; SLEZAK, D.; GEIGER-KAISER, M. Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an *in situ* sediment exposure microcosm. **Aquatic Microbial Ecology**, v.28, p.117-129, 2002.
- GUNASEELAN, V. N. Anaerobic digestion of biomass for methane. **Biomass and Bioenergy**, v.13, p.83-114, 1997.
- HAGLUND, A.-L.; TÖRNBLOM, E.; BOSTRÖM, B. E.; TRANVIK, L. Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm. **Microbial Ecology**, v.43, p.232-241, 2002.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v.13, p.7-10, 2005.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Review**, v.2, p.95-108, 2004.
- HERMANSSON, M.; MARSHALL, K.C. Utilization of surface-localized substrate by non-adhesive marine bacteria. **Microbial Ecology**, v.11, p.91-105, 1985.
- HOLM, E.R.; SCHULTZ, M.P.; HASLBECK, E.G.; TALBOTT, W.J.; FIELD, A.J. Evaluation of hydrodynamic drag on experimental fouling-release surfaces, using rotating disks. **Biofouling**, v.20, p.219-226, 2004.
- JAHN, A.; NIELSEN, P.H. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. **Water Science and Technology**, v.37, p.17-24, 1998.
- KEFFORD, B.; KJELLEBERG, S.; MARSHALL, K.C. Bacterial scavenging: utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. **Archives of Microbiology**, v.133, p.257-260, 1982.
- KEMMLING, A.; KÄMPER, M.; FLIES, C.; SCHIEWECK, O.; HOPPERT, M. Biofilms and extracellular matrices on geomaterials. **Environmental Geology**, v.46, p.429-435, 2004.
- KEREN, I.; KALDALU, N.; SPOERING, A.; WANG, Y.; LEWIS, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.13-18, 2004.
- KJELLEBERG, S.; HUMPHREY, B.A.; MARSHALL, K.C. Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1166-1172, 1982.
- KLAUSEN, M.; HEYDORN, A.; RAGAS, P.; LAMBERTSEN, L.; AAES-JØRGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Molecular Microbiology**, v.48, p.1511-1524, 2003.
- KRUMHOLZ, L.R. Microbial communities in the deep subsurface. **Hydrogeology Journal**, v.8, p.4-10, 2000.
- KÜHL, M.; JØRGENSEN, B.B. Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1164-1174, 1992.
- KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial growth in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.
- LEDIN, M.; PEDERSEN, K. The environmental impact of mine wastes – roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. **Earth-Science Reviews**, v.41, p.67-108, 1996.
- LIU, D.; ZHU, Y.; BEEFTINK, R.; OOIJKAA, L.; RINZEMA, A.; CHEN, J.; TRAMPER, J. Chinese vinegar and its solid-state fermentation process. **Food Reviews International**, v.20, p.407-424, 2004.
- MAGALHÃES, C.M.; BORDALO, A.A.; WIEBE, W. J. Intertidal biofilms on rocky substratum can play a major role in estuarine carbon and nutrient dynamics. **Marine Ecology Progress Series**, v.258, p.275-281, 2003.
- MAH, T.-F.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, p.34-39, 2001.
- MARSHALL, K.C. Adhesion as a strategy for access to nutrients. In: FLETCHER, M. (Ed.). **Bacterial adhesion - molecular and biological diversity**. New York: Wiley-Liss, 1996. p.59-88.
- MARTINS, A.M.P.; PAGILLA, K.; HEIJNEN, J.J.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Filamentous bulking sludge – a critical review. **Water Research**, v.38, p.793-817, 2004.
- MEESTERS, K.P.H.; VAN GROENESTIJN, J.W.; GERRITSE, J. Biofouling reduction in recirculating cooling systems through biofiltration of process water. **Water Research**, v.37, p.525-532, 2003.

- MOSER, D.P.; ONSTOTT, T.C.; FREDRICKSON, J.K.; BROCKMAN, F.J.; BALKWILL, D.L.; DRAKE, G.R.; PFIFFNER, S.M.; WHITE D.C.; TAKAI K.; PRATT, L.M.; FONG, J.; LOLAR, B.S.; SLATER, G.; PHELPS, T.J.; SPOELSTRA, N.; DEFLAUN, M.; SOUTHAM, G.; WELTY, A. T.; BAKER, B. J.; HOEK J. Temporal shifts in the geochemistry and microbial community structure of an ultradeep mine borehole following isolation. **Geomicrobiology Journal**, v.20, p.517-548, 2003.
- MOZES, N.; ROUXHET, P.G. Influence of surfaces on microbial activity. In: MELO, L. *et al.* (Ed.), **Biofilms - Science and technology**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1992. p.125-136.
- MÜNSTER, U. Concentrations and fluxes of organic carbon substrates in the aquatic environment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.243-274, 1993.
- NICKEL, J.C.; RUSESKA, I.; WRIGHT, J.B.; COSTERTON, J.W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.27, p.619-624, 1985.
- NICOLELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J. J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. **Journal of Biotechnology**, v.80, p.1-33, 2000.
- NOUT, M.J.R.; KIERS, J.I. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.789-805, 2005.
- ODEGAARD, H.; RUSTEN, B.; SILJUDALEN, J. The development of the moving bed biofilm process – from idea to commercial product. **European Water Management**, v.2, p.36-43, 1999.
- OKABE, S.; YASUDA, T.; WATANABE, Y. Uptake and release of inert fluorescence particles by mixed population biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.53, p.459-469, 1996.
- OLSON, G.J.; BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.249-257, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153-1169, 2000.
- PARKER, D.S.; BRATBY, J.R. Review of two decades of experience with TF/SC process. **Journal of Environmental Engineering**, v.127, p.380-387, 2001.
- PARSEK, M.R.; SINGH, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p.677-701, 2003.
- PATWARDHAN, A.W. Rotating biological contactors: a review. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v.42, p.2035-2051, 2003.
- POL, L. W.H.; LOPES, S.I. de C.; LETTINGA, G.; LENZ, P.N.L. Anaerobic sludge granulation. **Water Research**, v.38, p.1376-1389, 2004.
- POWER, K.; MARSHALL, K.C. Cellular growth and reproduction of marine bacteria on surface-bound substrate. **Biofouling**, v.1, p.163-174, 1988.
- RAMEY, B. E.; KOUTSOUKIS, M.; VON BODMAN, S. B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.602-609, 2004.
- RASMUSSEN, B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. **Nature**, v.405, p.676-679, 2000.
- REVSBECH, N.P.; WARD, D.M. Microelectrode studies of interstitial water chemistry and photosynthetic activity in a hot-spring microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.270-275, 1984.
- RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOHLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P. E. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v.11, p.94-100, 2003.
- SAMUELSSON, M.-O.; KIRCHMAN, D.L. Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface hydrophobicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3643-3648, 1991.
- SAND, W. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates – a general mechanistic overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.40, p.183-190, 1997.
- SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G.; WAITE, T.D. Cost factors and chemical pretreatment effects in the membrane filtration of waters containing natural organic matter. **Water Research**, v.35, p.1509-1517, 2001.
- SCHNEIDER, R.P.; TSUTIYA, M.T. **Tratamento de água, esgoto e produção de água de reuso através de processo de membranas filtrantes**. São Paulo: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária. 2001. 234p.
- SCHNEIDER, R.P.; MARSHALL, K.C. Retention of the gram-negative marine bacterium SW8 on surfaces - effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. **Colloids & Surfaces, B: Biointerfaces**, v.2, p.387-396, 1994.
- SCHNEIDER, R.P. What is a microbial biofilm? Submetido.
- SCHNEIDER, R.P. Conditioning film-induced modification of substratum physicochemistry - analysis by contact angles. **Journal of Colloid & Interface Science**, v.182, p.204-213, 1996.

- SCHRAMM, A.; SANTEGOEDS, C.M.; NIELSEN, H.K.; PLOUG, H.; WAGNER, M.; PRIBYL, M.; WANNER, J.; AMANN, R.; DE BEER, D. On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4189-4196, 1999.
- SCHULTZ, M.P.; SWAIN, G.W. The influence of biofilms on skin friction drag. **Biofouling**, v.15, p.129-140, 2000.
- SHARMA, V.K.; CANDITELLI, M.; FORTUNA, F.; CORNACCHIA, G. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: a review. **Energy Conservation Management**, v.38, p.453-478, 1997.
- SPOERING, A.L.; LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.6746-6751, 2001.
- STEIN, J.; TRUBY, K.; WOOD, C.D.; STEIN, J.; GARDNER, M.; SWAIN, G.; KAVANAGH, C.; KOVACH, B.; SCHULTZ, M.; WIEBE, D.; HOLM, E.; MONTEMARANO, J.; WENDT, D.; SMITH, C.; MEYER, A. Silicone foul release coatings: effect of the interaction of oil and coating functionalities on the magnitude of macrofouling attachment strengths. **Biofouling Suppliment**, v.19, p.71-82, 2003.
- STEWART, P.S. Diffusion in biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.1485-1491, 2003.
- STUMM, W.; MORGAN, J.J. **Aquatic chemistry**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- TANG, W.C.; WHITE, J.C.; ALEXANDER, M. Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, p.117-121, 1998.
- TELGMANN, U.; HORN, H.; MORGENROTH, E. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. **Water Research**, v.38, p.3671-3684, 2004.
- TESKE, A.P. The deep terrestrial biosphere is alive and well. **Trends in Microbiology**, v.13, p.402-404, 2005.
- VISSCHER, P.T.; STOLZ, J.F. Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.219, p.87-100, 2005.
- WAKSMAN, S.A.; CAREY, C.L. Decomposition of organic matter in seawater by bacteria. I. Bacterial multiplication in stored water. **Journal of Bacteriology**, v.29, p.531-545, 1935.
- WARSCHED, T.; BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.46, p.343-368, 2000.
- WESTALL, F.; DE WIT, M. J.; DANN, J.; VAN DER GAAS, S.; DE RONDE, C.E.J.; GERNEKE, D. Early archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. **Precambrian Research**, v.106, p.93-116, 2001.
- WIECZOREK, S.K.; TODD, C.D. Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. **Biofouling**, v.12, p.81-118, 1998.
- WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. **Microbial extracellular substances**: Characterization, structure and function. Berlin: Springer Verlag, 1999. 258p..
- WITTHUHN, R.C.; SCHOEMANN, T.; BRITZ, T.J. Characterization of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v.15, p.383-389, 2005.
- ZOBELL, C.E.; ANDERSON, D.Q. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored seawater and the influence of oxygen tension and of solid surfaces. **Biological Bulletin, Woods Hole**, v.71, p.324-342, 1936.

Biossurfactantes

**Fátima Menezes Bento¹, Flavio A. de Oliveira Camargo² e
Christine Claire Gaylarde³**



I. Introdução

Compostos com propriedades surfactantes/emulsificantes, com ação intra ou extracelular, são sintetizados por uma grande variedade de organismos vivos, desde plantas (saponinas) e microrganismos (glicolipídios), até estruturas animais mais complexas como o corpo humano (saíns biliares e surfactante pulmonar). Além das muitas moléculas biológicas com ação surfactante, os compostos de origem microbiana que exibem particularmente alta atividade de superfície e atividade emulsificante, são classificados como bio surfactantes. Os bio surfactantes e bioemulsificantes são moléculas que reduzem a tensão superficial (ou interfacial) ou agem como agentes emulsificantes, ou apresentam ambas as propriedades (DESAI & BANAT, 1997; MAIER, 2003).

Os bio surfactantes apresentam outras características que são utilizadas pela indústria tais como detergência, emulsificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases. Até o momento, apenas alguns bio surfactantes estão sendo utilizados comercialmente, mas ainda incapazes de competir economicamente no mercado com os sintetizados quimicamente, devido aos altos custos de produção. Os bio surfactantes de origem microbiana têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petrolífera e de óleos (ROCHA *et al.*, 1992; MULLIGAN, 2005). Entre as vantagens que elevam o potencial comercial destas biomoléculas destacam-se baixa toxicidade, biodegradabilidade, seletividade, atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade (BODOUR & MAIER, 2002; ILORI *et al.*, 2005; MULLIGAN, 2005).

Várias espécies de microrganismos são conhecidas por produzirem diversos tipos de bio surfactantes, alguns disponíveis comercialmente como a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis*, o emulsan produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 e um ramnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (BODOUR & MAIER, 2002). Com reconhecido potencial industrial e inúmeras aplicações biotecnológicas, os bio surfactantes ainda representam um desafio em relação ao conhecimento de novas espécies potencialmente produtoras, métodos de análise, extração, purificação e otimização da produção. Deste modo, os bio surfactantes constituem-se em uma promissora área de investigação, mobilizando diferentes setores da indústria de cosméticos, alimento, farmacêutica e da agricultura. Aplicações dos bio surfactantes e dos bioemulsificantes, bem como as definições, modo de ação, classificação, síntese, produção, métodos de detecção e aspectos relacionados à extração e purificação serão objeto de abordagem no presente capítulo.

2. Definições e modo de ação

Um surfactante por definição é uma molécula anfipática, isto é, apresenta uma

porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A redução da tensão superficial ocorre devido à característica anfipática (porção polar/apolar) da molécula, capaz de reduzir a energia livre do sistema pela transferência de moléculas de alta energia do interior de uma solução para a interface (DESAI & BANAT, 1997; MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005). As moléculas de qualquer líquido localizadas na interface líquido/ar realizam um menor número de interações intermoleculares, comparadas com as moléculas que se encontram no interior do líquido. A tensão superficial é a força que atua na superfície dos líquidos (BODOUR & MAIER, 2002). Geralmente, é quantificada, determinando-se o trabalho necessário para aumentar a área superficial. Deste modo, quanto menor a tensão superficial, maior a facilidade para um líquido se espalhar (BEHRING *et al.*, 2004). A tensão superficial surge nos líquidos como resultado do desequilíbrio entre as forças agindo sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da solução. Assim, a força resultante que atrai as moléculas da superfície de um líquido para o seu interior, torna-se o principal obstáculo para a formação de bolhas, gotas e a nucleação de cristais em líquidos (BEHRING *et al.*, 2004).

Todos os biossurfactantes também são moléculas anfipáticas, sendo a porção hidrofílica composta por um éster, hidroxil, fosfato, carboxil, grupo carbohidrato, que podem estar carregados negativamente ou neutros. Até o momento, não existem relatos sobre biossurfactantes com a porção hidrofílica carregada positivamente, presumivelmente, devido ao seu caráter tóxico. A porção hidrofóbica é um ácido graxo que pode variar de 8-18 carbonos (BOGNOLI, 1999; MAIER, 2003). Como estas duas porções se localizam na mesma molécula, os surfactantes se posicionam preferencialmente nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio (como nas interfaces óleo/água ou ar/água e superfícies).

Em uma solução aquosa com concentrações diluídas de um surfactante, este atua como um eletrólito normal, onde uma parte é dissolvida como monômeros e a

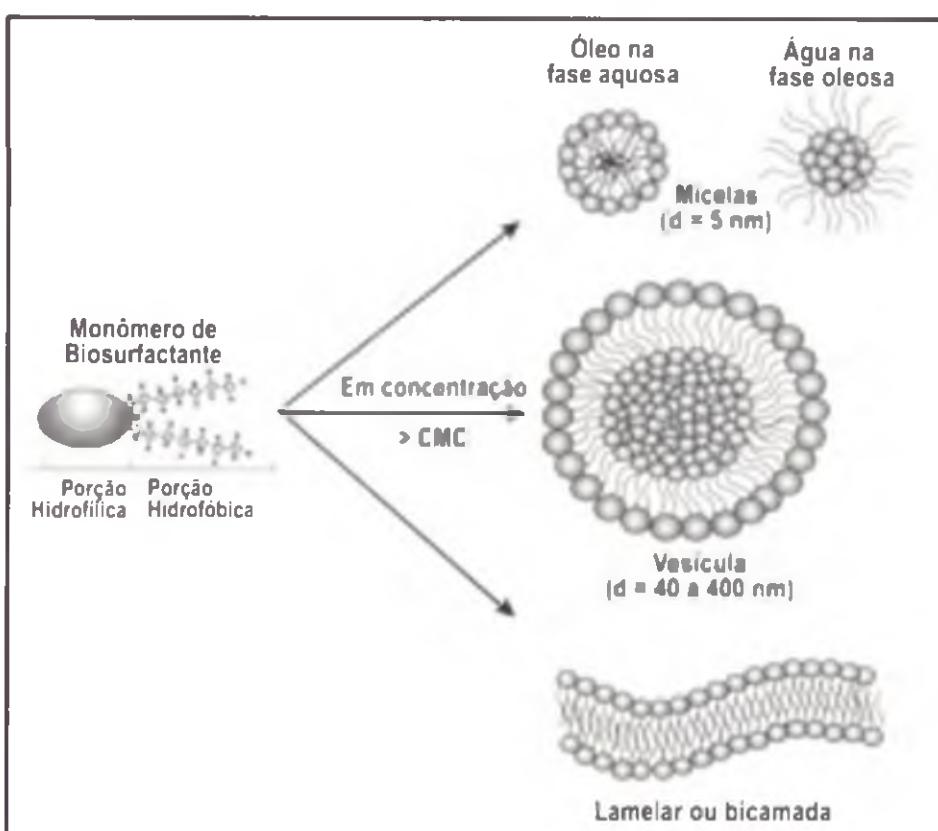


FIGURA 1. Tipos de agregados formados por biossurfactantes (adaptado de Maier, 2003).

outra parte forma uma monocamada na interface ar/água (Figura I). As moléculas da monocamada estão em equilíbrio com os monômeros no todo da solução e a cada concentração deste monômero corresponde a uma tensão superficial característica (Figura 1). Quando a concentração do monômero atinge um valor crítico, a tensão superficial ou interfacial será reduzida até que a concentração de surfactante atinja a concentração micelar crítica (CMC). Acima da CMC nenhuma redução da tensão superficial é observada

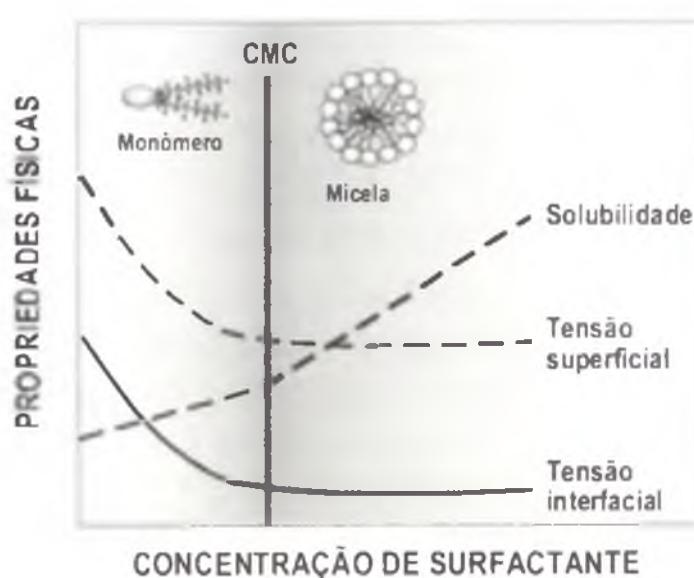


FIGURA 2. Medidas de tensão superficial e solubilização de um contaminante em função da concentração de surfactante em solução (modificado de Mulligan *et al.*, 2001; 2005).

repulsão entre as fases nas interfaces ou superfícies, permitindo que as duas fases se misturem facilmente.

Os compostos anfipáticos (porção polar e apolar) podem ser insolúveis ou solúveis em solução aquosa. Os insolúveis formam cristais líquidos ou precipitados insolúveis em meio aquoso e incluem os principais grupos de lipídios das membranas biológicas, como os fosfolipídios, os esteróides e as proteínas das membranas biológicas. A estrutura do agregado formado é basicamente comandada pela polaridade do solvente na qual o surfactante é dissolvido, não permanecendo de uma forma estável no meio de uma solução. Por exemplo, em uma solução aquosa, o grupo polar da micela vai estar orientado para fora e a porção apolar para dentro, enquanto que no óleo o grupo polar estará orientado para dentro da micela e a porção apolar para fora (Figura 1).

A propriedade conferida a todo o surfactante é sua habilidade em reduzir a tensão superficial de um meio líquido. Por exemplo, a água destilada apresenta uma tensão superficial de 73 mM m^{-1} . Um surfactante efetivo produzido por microrganismos (biossurfactante) pode reduzir este valor para uma taxa menor que 30 mM m^{-1} (LANG & WAGNER, 1987; ZHANG & MILLER, 1992; WILLUMSEN & KARLSON, 1997; MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005) (Tabela 1).

3. Biossurfactantes e bioemulsificantes

Os biossurfactantes podem ser divididos em duas grandes categorias em função do peso molecular. Os surfactantes de baixo peso molecular apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial, quando presentes em meio aquoso. Os surfactantes de alto peso molecular, chamados de bioemulsificantes, são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial, pois podem não apresentar a

(Figura 2). Na CMC os monômeros de surfactantes começam espontaneamente a se associar e formar estruturas agregadas conhecidas como micelas, vesículas e lamelas (bicamadas) (MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005). As micelas também são definidas como agregados coloidais termodinamicamente estáveis, formadas espontaneamente como resultado de numerosas interações químicas fracas entre os grupos polares e os grupos apolares (forças de van der Waals, pontes de hidrogênio). A CMC para qualquer surfactante é dependente da estrutura química, assim como do pH, da força iônica da solução e temperatura. Como resultado, os surfactantes reduzem as forças de

TABELA 1. Principais classes de biosurfactantes e técnicas utilizadas na extração de biosurfactante (adaptada de Desai & Banat, 1997 e atualizada com bibliografias mais recentes).

Tipos de Biosurfactante	Estrutura principal	Principais microrganismos	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	CMC (mg L ⁻¹)	Tensão interfacial (mN m ⁻¹)	Extração
Glicolipídios						
Ramnolipídios		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	0.1-10	0.25	Precipitação ácida,
Trehalolipídios		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32	4	14-17	acetona, isopropanol
Sophorolipídios		<i>Torulopsis homhicula</i>	33	-	1.8	Extração com solventes
Celobiolipídios		<i>Ustilago zae, U. maydis</i>	-	-	-	Centrifugação Ultracentrifugação
Lipopeptídeos e lipoproteínas						
Peptideos-lipídios		<i>Bacillus licheniformis</i>	27	12-20	0.1-0,3	
Serravectina		<i>Serratia marcescens</i>	28	-	-	Precipitação ácida,
Viscosina		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26	150	-	acetona.
Surfactina		<i>Bacillus subtilis</i>	27	23-160	-	Extração com solventes
Subtilisina		<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	
Ciramixidina		<i>Bacillus brevis</i>	-	-	-	
Polimixina		<i>Bacillus polymixa</i>	-	-	-	
Ácidos graxos						
Lipídios neutros		<i>Corynebacterium lepus</i>	30	150	2	
Fosfolipídios		<i>Nocardia erythropolis</i>	32	-	3	Extração com solventes
Surfactantes Poliméricos						
Emulsan		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				Precipitação com sulfato de amônio
Biodispersan		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
Liposan		<i>Candida lipolytica</i>				
Biosurfactantes particulados						
Vesículas e fimbrias		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
Células		<i>Várias espécies bacterianas</i>				

composição anfipática, ou seja, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (WILLUMSEN & KARLSON, 1997; ROSENBERG & RON, 1999; RON & ROSENBERG, 2001).

Uma emulsão é uma mistura estável de dois líquidos, constituindo-se em uma dispersão coloidal de gotículas de um líquido em outro. Os bioemulsificantes são também considerados uma subclasse de surfactantes que estabilizam dispersões de um líquido em outro, como por exemplo, as emulsões de óleo em água (RON & ROSENBERG, 2001). Normalmente, uma mistura de óleo e água forma fases separadas. Entretanto, se a mistura é agitada vigorosamente, o óleo vai dispersar na fase aquosa. Se a agitação cessar, as fases se separam rapidamente. Quando se adiciona um surfactante, é obtida uma mistura estável ou uma emulsão. Para a formação de gotas de óleo na água é preciso que o emulsificante seja solúvel em água e a porção hidrofóbica do bioemulsificante será adsorvida na fase oleosa dispersa e a porção hidrofílica ficará na interfase. A estabilidade da emulsão é garantida pela formação de filmes na superfície das gotículas de óleo na fase aquosa, que tende a se manter por longos períodos, refletindo a efetividade do emulsificante. Logo, ocorrerá a formação de uma gota de óleo carregada na superfície e provocará a repulsão das partículas carregadas semelhantemente, o que evita a coalescência e confere a

estabilidade da emulsão (Figura 2). As emulsões representam uma grande área interfacial e se formam à medida que a tensão é reduzida, e a estabilidade dependerá da natureza do emulsificante e das condições do meio (MAIER, 2003).

Os biossurfactantes e os bioemulsificantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono, desde substâncias hidrofílicas como a glicose, até substratos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos (DESAI & BANAT, 1997; BOGNOLI, 1999; ROSENBERG & RON, 1999; NITSCHKE & PASTORE, 2002; MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005). O principal papel fisiológico atribuído aos biossurfactantes é permitir que os microrganismos cresçam em substratos imiscíveis em água, pela redução da tensão superficial, tornando-os mais disponíveis para a captação e metabolismo.

A biodegradação de um dado composto só ocorre se enzimas microbianas estão presentes, porém a primeira etapa do processo envolve a produção e captação do substrato pela célula. Por outro lado, assumindo a presença de uma via metabólica apropriada, a solubilidade dos compostos orgânicos pode limitar a biodisponibilidade aos microrganismos. Sendo assim, foram propostas duas formas possíveis de produção dos biossurfactantes e bioemulsificantes e de captação pelas células (REDDY *et al.*, 1982; RATLEDGE, 1992; WATKINSON & MORGAN, 1990; HOMEL, 1990; KOCH *et al.*, 1991; MAIER, 2002):
 a) produção extracelular e captação pelo contato direto com microgotículas dispersas na fase aquosa, (Figura 3A);
 b) produção associada à parede celular e captação pelo contato direto das células ao composto orgânico através de modificações celulares como a hidrofobicidade celular (facilitando a penetração do hidro-carboneto no espaço periplásмico) ou fímbrias (pseudosolubilização) (Figura 3B).

Desta forma, os microrganismos podem aumentar a taxa de captação e biodegradação como resultado da produção de biossurfactantes ou emulsificantes.

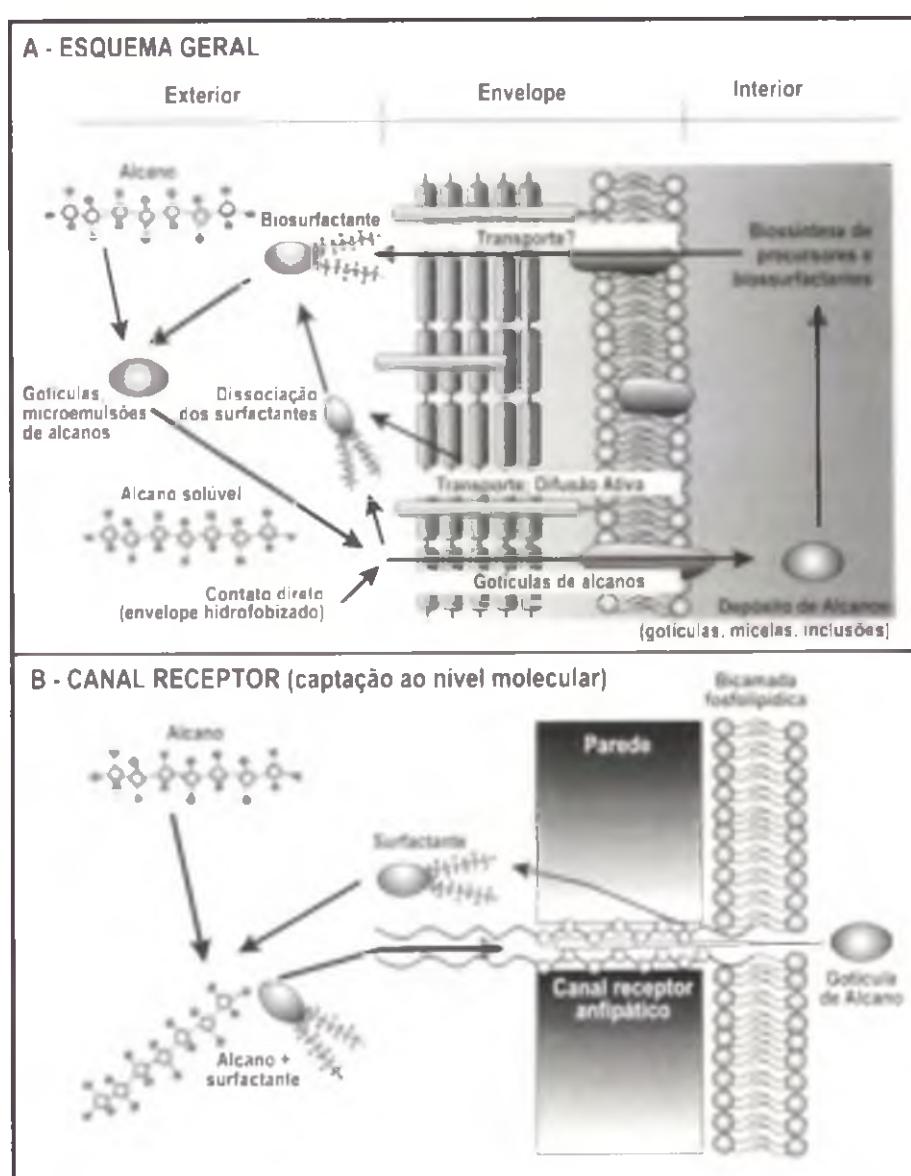


FIGURA 3. Mecanismo proposto para o processo de captação de alcanos e outros hidrocarbonetos insolúveis em água para o interior da célula microbiana (modificado de Ratledge, 1992).

Primeiramente, eles podem efetivamente aumentar a solubilidade do composto orgânico através da formação de micelas ou vesículas que se associam com os hidrocarbonetos. A seguir, podem facilitar o contato das células ao hidrocarboneto, transformando a superfície celular para mais hidrofóbica, com maior atração pelas gotículas emulsificadas de óleo (MAIER. 2003).

O crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em alcanos de cadeia longa é atribuído a síntese e excreção de ramnolípidos extracelulares. Este fato foi demonstrado pela marcada redução na fase lag durante o período de fermentação de 60 horas em hexadecano para menos de 10 horas, quando ramnolípidos foram adicionados ao meio (WU & JU, 1998). No entanto, existe uma especificidade de ação do biossurfactante associada ao modo de captação apresentada por cada espécie microbiana. Noordman & Jansen (2002) investigaram o efeito da presença e ausência de um ramnolípido na biodegradação de hexadecano por três espécies, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 e *Rodococcus erythropolis*. O ramnolípido estimulou a degradação de hexadecano pela *P. aeruginosa*. A presença do biossurfactante causou um aumento na hidrofobicidade celular, devido à extração de lipopolissacarídeos do envelope celular pelo ramnolípido, o que facilitou a captação através do contato direto entre as células e as gotículas do hidrocarboneto (NOORDMAN & JANSEN, 2002). A diferença no comportamento entre as espécies foi atribuída às diversas formas de interação com o hidrocarboneto, uma vez que o biossurfactante produzido pelo *Rodococcus erythropolis* é associado ao envelope celular (RAPP *et al.*, 1979; HOMEL, 1990; NOORDMAN & JANSEN, 2002).

O crescimento de *Candida lipolytica* em meio contendo glicose produziu um bioemulsificante extracelular, solúvel em água, com atividade emulsificante detectada na fase estacionária (BOGNOLI, 1999). As modificações durante o crescimento microbiano em hidrocarbonetos envolvem alterações ultraestruturais como invaginações da membrana citoplasmática, formação de vesículas e de inclusões intracelulares (RATLEDGE, 1992; MILLER, 1995a; BALDI, 2003). A absorção do hidrocarboneto na forma de gotícula é considerada muito comum e, freqüentemente, envolve a produção de moléculas biológicas surfactantes. Devido à variabilidade no tamanho das gotículas, os microrganismos apresentam adaptações em sua captação (WATKINSON & MORGAN, 1990). Essas adaptações têm sido extensivamente demonstradas pelas mudanças na composição lipídica da membrana que ocorrem durante o crescimento das células em n-alcanos (C_{12} - C_{20}) (WATKINSON & MORGAN, 1990; KOCH *et al.*, 1991; ZHANG & MILLER, 1992). A membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS) encontrado em *Pseudomonas oleovorans* pode ser modificada pela presença de um emulsificante, o qual é liberado gradualmente para fora da célula para formar uma camada monomolecular de LPS emulsificante, envolvendo a gotícula de hidrocarboneto (RATLEDGE, 1992). Dessa forma, não haveria a exigência da biossíntese de qualquer surfactante de baixo peso molecular para aumentar a solubilização do alcano, mas simplesmente evitaria o dispêndio da metabolização celular, de forma a modificar somente um dos seus componentes existentes.

A biodegradação de alcanos (C_{18} e C_{36}) pode ser realizada também por encapsulamento desses hidrocarbonetos em pequenas vesículas unilamelares (lipossomas). O encapsulamento aumentou a dispersão aquosa dos alcanos, intercalando o alcano dentro da dupla camada fosfolipídica da vesícula, as quais medem aproximadamente 20 a 50 nm de diâmetro. No entanto, o encapsulamento é facilitado pela liberação dos alcanos para a membrana provida de monooxigenases, ocorrendo à fusão das vesículas com a membrana celular propriamente dita (ZHANG & MILLER, 1992). Esse tipo de captação seria uma forma de pinocitose, enquanto que o processo de difusão facilitada envolve uma pseudo-solubilização do alcano e de outros hidrocarbonetos insolúveis em água pela presença de um biossurfactante (RATLEDGE, 1992). Nesse caso, a superfície celular mudaria seu caráter hidrofóbico, permitindo a entrada de gotículas do alcano emulsificado, com a liberação da molécula surfactante. A assimilação através do envelope celular, provavelmente ocorreria por difusão passiva ou através de poros criados por mudanças na estrutura do envelope celular. Essa captação do alcano é normalmente mais rápida e o excesso de alcano é coalecido em gotículas discretas que se tornam facilmente visíveis dentro da célula. Esse aprisionamento não evitaria a oxidação subsequente, mas funcionaria como uma estratégia de reserva da célula (RATLEDGE, 1992).

Alguns biossurfactantes apresentam papel essencial na sobrevivência celular ao regular suas propriedades da superfície celular, durante a adesão e liberação de um dado substrato, de acordo com a necessidade. Este fato tem sido demonstrado para *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 crescendo em óleo cru (RON & ROSENBERG, 2001) e para *Acinetobacter venetianus* em óleo diesel (BALDI *et al.*, 2003). Durante a fase exponencial de crescimento, o emulsan é ligado a célula na forma de uma minicápsula. *A. calcoaceticus* utiliza apenas alcanos de cadeia longa para crescimento e depois que estes compostos são utilizados, a bactéria ainda está aderida à gotícula de óleo, mas libera a minicápsula de emulsan. Ao mesmo tempo, a gotícula de óleo utilizada foi marcada, pois agora passa a apresentar uma superfície externa hidrofílica, não permitindo mais a adesão da bactéria.

A produção de biossurfactantes e bioemulsificantes geralmente tem sido associada com o crescimento celular em meios de cultura ou em meios mínimos (mineral) com a fonte de carbono (solúvel ou insolúvel) a ser investigada. Alguns autores reportam a redução da tensão superficial do meio na fase exponencial de crescimento (WILLUMSEN & KARLSON, 1997) e muitos outros apenas na fase estacionária, sendo considerado por muitos autores como metabólitos secundários (WILLUMSEN & KARLSON, 1997; DESAI & BANAT, 1997; WU & JU, 1998, RON & ROSENBERG, 2002; PRUTHI & CAMEOTRA, 2003; TAHZIBI *et al.*, 2004). Os bioemulsificantes são geralmente produzidos quando as culturas atingem a fase estacionária de crescimento. Em vários casos foi demonstrado que a produção de emulsificantes é induzida por sinais moleculares envolvendo *quorum-sensing*. Esta característica regulatória parece ser geral e provavelmente se aplica à produção de ambos os emulsificantes de alto e baixo peso molecular (RON & ROSENBERG, 2001). Willumsen & Karlson (1997) acompanharam a redução da tensão superficial do meio mineral durante o crescimento de microrganismos com diferentes

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (antraceno, pireno, fenantreno e fluoranteno). Para a maioria dos 57 isolados bacterianos obtidos, a redução iniciou na fase exponencial e para dois isolados, na fase estacionária. Segundo os autores, alguns aspectos fisiológicos inerentes das espécies podem estar relacionados, como resultantes das diferentes fases do crescimento, ou do alto número de células produtoras de biosurfactantes na fase estacionária do que na fase exponencial, ou ainda como o resultado de lise celular (WILLUMSEN & KARLSON, 1997).

4. Classificação dos biosurfactantes e bioemulsificantes

Os biosurfactantes e bioemulsificantes são considerados uma classe de surfactantes naturais, sendo que os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biosurfactantes são diferenciados pela natureza química da biomolécula e pela espécie microbiana produtora. Os surfactantes microbianos são moléculas complexas com uma grande diversidade de estruturas químicas. Embora a produção de biosurfactantes ocorra entre os diferentes grupos microbianos, muitas vezes o tipo de biosurfactante produzido é específico do gênero e às vezes da espécie. Por exemplo, a *P. aeruginosa* produz um glicolipídio (ramnolipídio) e a *Pseudomonas fluorescens* produz a viscosina e a tensina, identificadas como lipopeptídeos (MAIER, 2002). Basicamente, os biosurfactantes podem ser divididos em moléculas de baixo e alto peso molecular. Os surfactantes de baixo peso molecular (glicolipídios, ácidos graxos e fosfolipídios) e de alto peso molecular (polímeros), são formados por polissacarídeos ou por uma mistura (WILLUMSEN & KARLSON, 1997; RON & ROSENBERG, 2001; BODOUR & MAIER, 2002; MAIER, 2003). Os principais biosurfactantes são os glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, polímeros e biosurfactantes particulados (Tabela 1).

4.1 Glicolipídios

Entre os surfactantes microbianos, os mais estudados são os glicolipídios. Os glicolipídios têm um grupamento carbohidrato (dissacarídeos) ligado a uma ou mais cadeias longas de ácido graxo. Entre os glicolipídios incluem-se os ramnolípidos (MAIER & SOBERÓN-CHAVES, 2000), trehalose lipídio (MAIER, 2003), soforo lípido (LANG, 2002) e manosileritritol lipídio (KIM *et al.*, 2002; HUA *et al.*, 2004). O mais estudado glicolipídio é um ramnolípido que foi isolado de *P. aeruginosa* e caracterizado em 1949 (MAIER & SOBERÓN-CHAVES, 2000). Basicamente, é formado pela ligação de duas ramnoses, sendo que é possível encontrar seis formas aniônicas diferentes (BODOUR & MAIER, 2002). A produção de ramnolípido é limitada a *P. aeruginosa*, ocorrendo no final da fase logarítmica e na fase estacionária em uma grande variedade de fontes de carbono, desde glicose (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984) até hidrocarbonetos poliaromáticos (DÉZIEL *et al.*, 1996). Os ramnolípidos podem reduzir a tensão superficial para menos de 30 mM m⁻¹ (ZHANG & MILLER, 1992).

4.2 Lipoproteínas

Também referidas como lipopeptídeos, apresentam uma porção proteína e outra ácido graxo. A porção proteína pode ser neutra ou aniónica e os aminoácidos podem estar arranjados em uma estrutura cíclica. Este grupo é bastante conhecido devido às suas propriedades antimicrobianas. As lipoproteínas mais bem caracterizadas são as produzidas por *Bacillus* sp., incluindo a surfactina, iturina, entre outros. (BODOUR & MAIER, 2002). A surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* pode reduzir a tensão superficial do meio para 27 dinas cm⁻¹. Outras lipoproteínas são produzidas por diversas espécies microbianas (DESAI & BANAT, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002; BODOUR & MAIER, 2002; LANG, 2002; MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005).

4.3 Biossurfactantes poliméricos

Os biossurfactantes poliméricos são caracterizados pelo seu alto peso molecular. Estes polímeros podem ser grandes cadeias de carbohidratos ou de proteínas, podendo ter uma fração lípidica. Em alguns casos, o polímero pode ser uma mistura de carbohidrato, proteínas e lipídios. Estes compostos apresentam marcada atividade emulsificante, sendo que cada biossurfactante polimérico apresenta diferentes graus de emulsificação em função da composição diversa e em geral, não causam redução significativa na tensão superficial. O mais estudado e caracterizado bioemulsificante é produzido por diferentes espécies de *Acinetobacter* (GUTNICK *et al.*, 1993; RON & ROSENBERG, 2001; LANG, 2002). O emulsan, produzido pelo *A. calcoaceticus* RAG1 é composto por um heteropolissacarídeo ligado a ácidos graxos através de uma ligação éster com ligações amidas e uma porção protéica. O emulsan inicialmente se acumula na superfície celular como uma cápsula e então é liberado quando as células entram na fase estacionária. O emulsan pode reduzir a tensão superficial para 52 mM m⁻¹. Pode ser encontrado comercialmente. Diferentes espécies podem produzir polímeros com propriedades biodispersantes, bioflocculantes e bioespessantes (GUTNICK *et al.*, 1993). No meio aquoso, os bioemulsificantes são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão além de se ligarem fortemente às superfícies.

4.4 Fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos lipídicos

Moléculas como os fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos lipídicos fazem parte da estrutura celular e também apresentam propriedades biossurfactantes. Uma mistura de fosfolipídios e lipídios neutros foram isolados de *Thiobacillus tioxidans* com capacidade de solubilizar o enxofre. O *Acinetobacter* também pode produzir fosfolipídios e lipídios neutros, aumentando a solubilidade do hexadecano. Um composto identificado como um lipídio neutro, produzido por *Nocardia erythropolis* foi capaz de causar a redução na tensão superficial de 34 mM m⁻¹ durante o crescimento em 4% de hidrocarboneto (MAIER, 2003).

4.5 Biossurfactantes particulados

Os biossurfactantes particulados podem apresentar uma importante função na captação de alcanos por algumas espécies microbianas. *Acinetobacter* sp. apresentou na membrana externa, vesículas de 20-50 nm de diâmetro que continham cinco vezes mais fosfolipídios e cerca de 350 vezes mais polissacarídeos durante o crescimento em meio com hidrocarboneto (KAPPELI & FINNERTY, 1979).

5. Biossíntese de biossurfactantes

Conforme visto, os biossurfactantes apresentam diversidade estrutural, produzida por diferentes genes, o que implica em diversidade genética para a biossíntese. O entendimento da estrutura e dos mecanismos de regulação para a excreção de biossurfactantes pode ser o ponto chave para o desenvolvimento de métodos mais baratos para a produção em escala industrial, com capacidade de competir comercialmente com os surfactantes sintéticos (SULLIVAN, 1998). As informações sobre síntese, regulação e genética da produção de biossurfactantes são restritas a alguns tipos e em alguns casos, incompletas. Até o momento, somente o surfactante ramnolipídeo (glicolipídeo) e a surfactina (lipoproteína) têm seus mecanismos de síntese e regulação descritos. Outros biossurfactantes como a liquenezina e o bioemulsificante emulsam apresentam informações sobre a síntese e alguns indicativos de regulação (RON & ROSENBERG, 2001).

O glicolipídeo melhor estudado em relação à biossíntese é o ramnolipídeo isolado de uma *P. aeruginosa* 141. Este ramnolipídeo apresenta seis diferentes formas aniônicas, sendo as mais abundantes, o monoramnolipídeo R1 (ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato) e o diramnolipídeo R2 (ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato) produzido por esta bactéria em meio líquido

(MAIER & SOBERON-CHAVES, 2000).

A síntese do ramnolipídeo R1 e R2 ocorre a partir da síntese em separado da porção ácido graxo e da porção ramnose (Figura 4). Os ácidos graxos do ramnolipídeo são sintetizados a partir da redução do β -cetohidrodecanoil éster pela enzima *RhlG* para β -cetohidrodecanoil-S-CoA, que é o substrato para a enzima *PhaC* formar o -hidroxidecanoil-cetohidrodecanoil-hidroxidecanoil-S-CoA. A porção ramnose é sintetizada a partir da glicose-6-fosfato com a produção de D-glicose-1-fosfato por uma fosfomano mutase codificada pelo gene *AlgC* (MAIER & SOBERON-CHAVES, 2000). Na seqüência, atuam os genes *rml*,

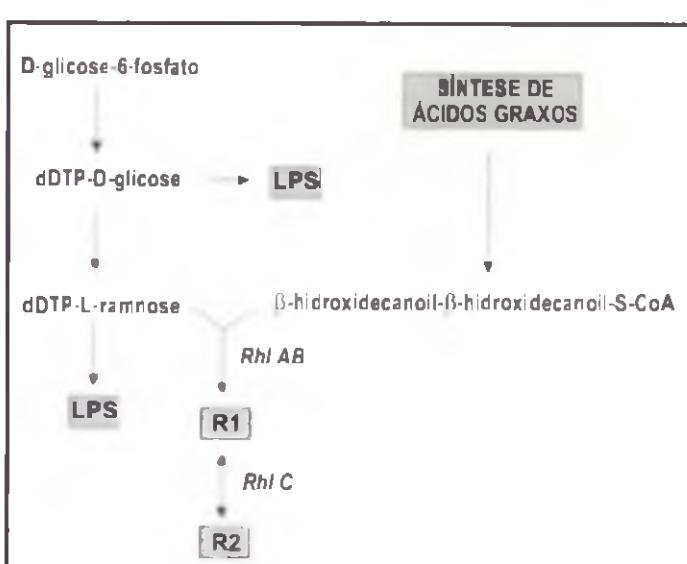


FIGURA 4. Esquema simplificado da biossíntese de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (adaptado de Maier & Soberon-Chaves, 2000).

responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas na produção final da timididina-difosfo-ramnose (dTDP-L-ramnose). A biossíntese destas moléculas tensoativas (R1 e R2) ocorre através de duas reações seqüenciais de transferência de ramnose, sendo cada uma catalizada por uma ramnozil transferase específica Rt1 e Rt2, respectivamente (Figura 4). O monoramnolipídeo (R1) é sintetizado pela Rt1, utilizando a timididina-difosfo-ramnose como doador e o β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoil-S-CoA como receptor. O diramnolipídeo é sintetizado pela Rt2 a partir da timididina-difosfo-ramnose e de monoramnolipídeos (BODOUR & MAIER, 2002).

A expressão do monoramnolipídeo R1 é regulada por um sistema de *quorum-sensing RhI/RhII*, o qual é controlado em níveis transcriptacional e postranslacional por um segundo sistema de *quorum-sensing LasR-LasI*. Estes dois sistemas são responsáveis pela expressão em cascata dos genes que são acionados por auto-indutores que interagem e ativam reguladores transcriptacionais específicos, quando em elevada densidade celular (MAIER & SÓBERON-CHAVES, 2000). A complexidade do sistema de regulação da síntese do ramnolipídeo por *P. aeruginosa* é o principal empecilho para o aumento da produção em escala comercial deste surfactante.

A lipoproteína com característica surfactante mais conhecida e mais utilizada comercialmente é a surfactina produzida por *B. subtilis*. A molécula é composta de um heptapeptídeo cíclico (Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu) ligado a uma porção de ácidos graxos com 13 a 15 átomos de carbono, tendo o ácido 3-hidroxi-13-metil tetradecanóico como principal componente. Para a síntese da surfactina são necessárias três proteínas. A primeira é a surfactina sintetase, codificada pelo operon *srfA* que codifica a síntese de quatro subunidades desta enzima. Três destas subunidades (E_{1A} , E_{1H} e E_2) são responsáveis pela adição de ácido graxo na cadeia de sete amino ácidos da surfactina e a outra subunidade é uma tioesterase envolvida na lactonização da molécula (PEIPOX *et al.*, 1999). A segunda proteína é a acil transferase, responsável pela transferência inicial do β -hidroxi ácido graxo para a surfactina sintetase, cujo gene ainda não foi caracterizado. A terceira proteína requerida é uma fosfopanteteinil transferase (Sfp) necessária para ativar a surfactina sintetase por modificação postranslacional, sendo esta enzima codificada pelo operon *sfp* (KIM *et al.*, 2000a).

A expressão da surfactina é regulada pelo operon *com* utilizado para o desenvolvimento de competência do *Bacillus*. O controle da expressão é feito por dois peptídeos sinalizadores ComX e CSF (fator de estimulação de competência). O peptídeo ComX interage com a proteína associada a membrana ComP que é fosforilada a ComA formando o complexo protéico ComA-P. Este se liga ao promotor do *srfA* e inicia a transcrição. O segundo sinal peptídico CSF é o produto do gene *phrC* e é ativado quando excretado pela parede celular. Em baixa concentração de CSF, a expressão do operon *srfA* é estimulada uma vez que a fosfatase RapC é reprimida e não interage com ComA-P, resultando no aumento da expressão do operon (LAZZERA *et al.*, 1999).

A liquenezina é um polipeptídeo produzido por *Bacillus licheniformis*, que difere estruturalmente da surfactina pela substituição de uma leucina por uma isoleucina no último amino ácido do peptídeo e na porção ácido graxo, a qual é composta por uma mistura de ácidos graxos lineares e ramificados (SULLIVAN, 1998). A biossíntese da liquenezina é similar a da surfactina, com um operon de 26.6 kb que contém três

fases de leitura aberta (ORF's), sendo a *licA* e *licB* subunidades multifuncionais e a *licC* que codificam uma peptídeo sintetase. O gene *licTE* codifica uma tioesterase que é homóloga ao gene *srfA-D* (BODOUR & MAIER, 2002).

Emulsan é um bioemulsificante de alto peso molecular produzido pelo *A. calcoaceticus* RAG1. Este biopolímero é um heteropolissacarídeo ligado a ácidos graxos através de ligações *o*-éster e amídicas, composto principalmente de N-acetil-D-galactosamina, ácido urônico e galacturônico, diamino deoxi hexosamina, entre outros. Apesar da complexidade estrutural, a biossíntese e a regulação do emulsan são realizadas na membrana e codificadas pelo gene *est* com a função de liberar o emulsan da superfície da célula (SULLIVAN, 1999). A lipase é codificada por um operon *lip*, associado com a adição de ácidos graxos ao emulsan (BODOUR & MAIER, 2002).

6. Produção de biosurfactantes

A ampla propriedade e a diversidade de estruturas oferecem aos biosurfactantes grandes vantagens em comparação aos surfactantes sintéticos. Tratam-se de moléculas biodegradáveis e menos tóxicas, as quais são efetivas em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (COOPER & ZAJIC, 1980; BANAT *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1992; MURIEL *et al.*, 1996; NEU & MAY, 1996; CAMEOTRA & MAKKAR, 2004; ROONGSAWANG *et al.*, 2002), além de serem produzidos a partir de vários substratos baratos, o que reduziria seu custo de produção.

A maioria dos biosurfactantes é de alto peso molecular, normalmente produzido sob condições altamente aeróbias. Sendo predominantemente lipídeos, sua biossíntese se promove em baixos níveis de nitrogênio (KOSARIC, 1992). Alguns dos surfactantes produzidos por microrganismos são constitutivos, mas outros requerem a presença de alcanos para induzirem sua síntese. Entretanto, vários autores constataram a produção de biosurfactantes mesmo crescendo em outras fontes que não hidrocarbonetos, como foi relatado por Zhang & Miller (1992), os quais extraíram o ramnolipídeo biosurfactante de *P. aeruginosa* ATCC 9027 depois do seu crescimento em meio contendo proteose-peptona-glicose-amônio, e limitado em fosfato.

Muitos dos surfactantes produzidos por microrganismos degradadores de combustível não são constitutivos, requerendo a presença de alcanos para induzirem sua síntese. Dois isolados de *P. aeruginosa* produziram biosurfactante em meio de cultura com glicose como única fonte de carbono, embora a adição de óleo bruto na fase estacionária do crescimento resultou em um aumento da produção do biosurfactante (ROCHA *et al.*, 1992). O consumo de glicose e a atividade emulsificante também foram acompanhado durante o crescimento de uma *Pseudomonas* sp. isolada de tanques de estocagem de óleo diesel. Após o consumo de glicose foi adicionado óleo diesel e constatado o aumento na atividade emulsificante, sugerindo a produção de compostos surfactantes (BENTO & GAYLARDE, 1996). É comum utilizar baixas concentrações do substrato insolúvel no meio de crescimento, tais como 1% óleo de azeite (CAMARGO de MORAIS *et al.*, 2003) e óleo de soja (RAHMAN *et al.*, 2002); um exemplo similar é o uso de gasolina adicionado com álcool como única fonte de carbono para a produção de surfactante pela *Serratia* sp. (CUNHA *et al.*, 2004).

Cooper (1986) constatou que mudanças no substrato freqüentemente causam alterações na estrutura e propriedades dos biossurfactantes produzidos. Como mencionado, os biossurfactantes podem ser produzidos por microrganismos crescendo em substratos solúveis, bem como não solúveis, em água. *Torulopsis petrophilum* produziu dois tipos de biosurfactante de acordo com o meio de crescimento. Em substratos insolúveis em água, foram produzidos glicolipídeos incapazes de estabelecer emulsões, enquanto que, na presença de glicose, um emulsificante foi sintetizado (COOPER & PADDOCK, 1984). Entretanto, uma espécie do actinomiceto *Nocardia* produziu os dois diferentes tipos de biosurfactante no mesmo meio com hexadecano (KIM *et al.*, 2000b).

Em certos casos, a síntese dos biossurfactantes é reprimida catabolicamente por glicose ou outros metabólitos primários, como o caso de *Arthrobacter paraffineus*, quando o hexadecano foi substituído por glicose, e de *P. aeruginosa* S7B1, quando *n*-alcanos, 1-hexadecano, ou acetil álcool foram substituídos por glicose, glicerol ou ácido palmítico (HISATSUKA *et al.*, 1972; DUVNJAK *et al.*, 1982; REDDY *et al.*, 1983). Entretanto, há muitos exemplos do uso de substratos solúveis em água, incluindo a glicose, para produção de biossurfactantes (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; REILING *et al.*, 1986). Vildanova-Martishini *et al.* (2002) pesquisaram a cinética do crescimento da produção de biosurfactante em culturas de *Rhodococcus luteus* com diferentes substratos.

O tipo, qualidade e quantidade do biosurfactante são influenciados pela natureza do substrato carbonado, a concentração de N, P, Mg, Fe e Mn no meio e as condições de cultura, tais como pH, temperatura, agitação e taxa de diluição em culturas contínuas (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; HAIDERBERGER *et al.*, 1986; DUVNJAK *et al.*, 1982; COOPER & ZAJIC, 1980; ATLAS, 1981). Mesmo assim, a produção do biosurfactante de estirpes de *Pseudomonas* MEOR 171 e MEOR 172 não foi influenciada pelas condições de temperatura, pH e concentrações de Ca e Mg presentes nos poços de petróleo (Pruthi & Cameotra, 2003).

A fonte e a quantidade de N são importantes. *A. paraffineus* ATCC 19558 produziu maiores quantidades de biosurfactante na presença de amônio ou uréia como fonte de N, do que com nitrato (DUVNJAK *et al.*, 1982). Vários autores relatam a importância de usar meio limitado em N para produzir biossurfactantes, no laboratório (BONILLA *et al.*, 2005), ou *in-situ* (HUDAK & CASSIDY, 2004).

Além do substrato, outros fatores afetam a produção, como a concentração de ferro (WEI *et al.*, 2004; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984) e a relação carbono-fosfato (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984). Estes últimos autores relataram que a produção do surfactante por *P. aeruginosa* foi relacionada a baixas taxas de crescimento. Extrato de levedura reduzia a produção, mas, num outro trabalho utilizando-se a bactéria *B. subtilis* o extrato de levedura aumentou a biomassa, sem influenciar na produção do surfactante (REIS *et al.*, 2004). A adição de alguns antibióticos, como penicilina e cloranfenicol (SYLDATK *et al.*,

1985; RUBINOVITZ *et al.*, 1982) também pode aumentar a síntese, bem como cátions multivalentes, embora outros autores relatam o aumento da produção pela adição de EDTA (REIS *et al.*, 2004), que tem a capacidade de complexar tais cátions.

Os métodos mais usados para aumentar a produção metabólica consistem de seleção de estirpes, mutagênese, manipulação de fatores ambientais e nutricionais e manipulação genética (IQBAL *et al.*, 1995). A partir da seleção de microrganismos produtores de surfactantes e do estudo das condições descritas, pode-se aplicar o melhoramento genético para otimizar o potencial para a produção de biosurfactantes, ou as suas propriedades. Como exemplo, a modificação por engenharia genética da enzima surfactina sintetase, de *B. subtilis*, produziu um biosurfactante que aumentou a atividade antimicrobiana (SYMMANK *et al.*, 2002).

O futuro das aplicações destas moléculas será determinado pelo custo dos processos de produção e isolamento, pois é necessário que sejam economicamente viáveis. Neste aspecto, são comuns as pesquisas sobre o uso de resíduos industriais ou agroindustriais como substratos para a produção dos biosurfactantes, conforme é mostrado na Tabela 2. Kosaric (1992) sugeriu o uso de “co-culturas” de bactérias ou leveduras junto com uma alga lipogênica, como a *Chlorella*, o que aumentaria a produção. No futuro, será importante associar as pesquisas atuais, numa tentativa de produzir grandes quantidades de biosurfactantes utilizando-se microrganismos ou consórcios apropriados e resíduos industriais ou agronómicos como substratos. O controle da produção através de *quorum-sensing*, sem dúvida, será uma etapa fundamental no processo. Já foi identificada uma substância do grupo homoserina lactona, que influencia na produção de biosurfactante por *Pseudomonas fluorescens*, um patógeno de brócolis (Cui *et al.*, 2005).

TABELA 2. Alguns exemplos de resíduos utilizados como substratos para a produção de biosurfactantes.

Resíduo	Indústria	Microrganismo	Referência
Processamento de azeite	Agroindústria	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sidal & Ozkale-Taskin (2003)
Processamento de soja	Agroindústria	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Kim <i>et al.</i> (2005)
Melaço de soja	Agroindústria	<i>Candida bombicola</i>	Solaiman <i>et al.</i> , (2004)
Refinaria de petróleo	Petroindústria	Levedura	Bednarsky <i>et al.</i> , (2004)
Processamento de cassava	Agroindústria	<i>Bacillus subtilis</i>	Nitschke e Pastore (2004); Nitschke <i>et al.</i> , (2004)
Óleo de babaçu	Agroindústria	<i>Candida lipolytica</i>	Vance-Harrop <i>et al.</i> , (2003); Costa <i>et al.</i> , (2005)
Processamento de batata	Indústria alimentícia	<i>Bacillus subtilis</i>	Noah <i>et al.</i> , (2005)
Óleo de motores veiculares	Petroindústria	<i>Acinetobacter</i> sp.	Koma <i>et al.</i> , (2001)

7. Métodos para a detecção da atividade surfactante e emulsificante

O interesse em se produzir surfactantes microbianos tem levado à necessidade de se desenvolver métodos rápidos e eficientes, quantitativos e qualitativos para a seleção e análise de microrganismos produtores de bio surfactantes (BODOUR & MAIER, 2002; MAIER, 2003; YOUSSEF *et al.*, 2004). Devido à grande diversidade nas propriedades físicas e químicas apresentadas pelos bio surfactantes, existe pouca homologia na codificação dos genes dos vários tipos de surfactantes, e por esta razão são pouco utilizadas técnicas de seleção molecular e bioquímica (BODOUR & MAIER, 2002).

7.1 Redução na tensão superficial ou interfacial

Os bio surfactantes podem ser quantificados através das medidas de tensão superficial e interfacial, e constituem-se em uma ferramenta comum para monitorar as modificações no meio líquido durante o crescimento de microrganismos. Esta é uma quantificação genérica e desta forma não distingue entre os diferentes tipos de surfactantes que podem estar presentes no meio líquido. Embora seja uma medida comum de encontrar em trabalhos sobre bio surfactantes, ainda é um dado difícil para se comparar ou racionalizar, pois em muitos casos tratam-se de produtos específicos de microrganismos, crescendo em condições específicas como tipo e concentração de nutrientes, pH, aeração e fonte de carbono (Bognolo, 1999).

A *tensão superficial* mede a força exigida para mover um anel de platina ou a placa de Wilhelmy que está sobre um líquido através do ar. A concentração micelar crítica (CMC) é determinada pela medida da tensão superficial em uma série de amostras diluídas de um tampão fosfato (0,1 M pH:7,0) (MILLER & ZHANG, 1997). Os dados da concentração do surfactante (log) versus as medidas de tensão superficial podem ser utilizados para se estimar a CMC de um surfactante em estudo (Figura 2). A *tensão interfacial* mede a força necessária para mover um anel imerso em um líquido, no caso um hidrocarboneto, através da interfase de um outro líquido, no caso a água. O procedimento de se determinar a concentração do surfactante na amostra pela medida da tensão interfacial é similar a medida da tensão superficial.

Método do anel de Platina (Du Nouy) ou Placa de Wilhelmy: entre os métodos mais utilizados estão o método de anel de platina Du Nouy e da placa de Wilhelmy. Este método é amplamente utilizado devido a sua reprodutibilidade, facilidade de utilização e de rápida obtenção (BOGNOLO, 1999; MAIER, 2002; BODOUR & MAIER, 2002; YOUSSEF *et al.*, 2004). No entanto, este método exige equipamento apropriado e apresenta limitação em relação ao volume de amostra necessário para a análise. Alguns componentes do meio, dissolvidos na solução, como a glicose, não interferem com o método do anel (Du Nouy). Outros componentes como a peptona ou solventes como o metanol ou etanol, podem reduzir a tensão superficial na ausência de um surfactante. Desta forma, é preciso ter cautela no momento de realizar as

medidas, consideradas controle de tensão superficial. Como as medidas de tensão superficial e interfacial são dependentes da temperatura, logo as amostras devem ser medidas à temperatura ambiente.

Teste de Colapso da Gota: o teste de colapso da gota tem sido utilizado na seleção de microrganismos produtores de biossurfactante e também como um método quantitativo para se determinar a concentração de surfactante (JAIN *et al.*, 1991; BANAT, 1995; BODOUR & MAIER, 1998, 2002; AYUB *et al.*, 1998; BATISTA, 2002; HERNANDEZ-ANGUIANO *et al.*, 2004; YOUSSEF *et al.*, 2004; ILORI *et al.*, 2005). Este teste constitui-se na observação de que gotas de suspensões celulares de microrganismos produtores de biossurfactantes colapsam em uma superfície coberta com óleo. Suspensões sem surfactante permanecem com a mesma configuração da gota de água utilizada como controle. Trata-se de um ensaio rápido, fácil de realizar e com a utilização de poucos equipamentos. Este teste pode ser utilizado para uma seleção qualitativa de microrganismos produtores de biossurfactantes (BODOUR *et al.*, 2003) ou em um teste quantitativo, utilizando curvas com concentrações padrão de surfactantes sintéticos como o sódio dodecil sulfato (SDS) e microbianos como um ramnolipídio (BODOUR & MAIER, 1998; 2002).

Lâmina de vidro inclinada: esta técnica qualitativa foi utilizada, originalmente, para selecionar a produção de biossurfactante por *Pseudomonas* sp. e *Vibrionaceae* sp. (BODOUR & MAIER, 2002). Neste teste, o organismo cresce em placas com ágar nutritivo para bactérias. Uma colônia é misturada em uma gotícula de uma solução de cloreto de sódio (0,9%) que é colocada sobre a extremidade de uma lâmina de vidro. A seguir, a lâmina é inclinada; se o biossurfactante está presente, a gotícula se movimentará pela lâmina de vidro. Se a gotícula não se movimentar pela lâmina, a amostra não apresenta biossurfactante. Este teste tem a vantagem de ser rápido, simples e não exige equipamento especializado, porém em alguns casos, uma colônia bacteriana pode produzir resultados falsos negativos (BODOUR & MAIER, 2002).

Hemólise: alguns biossurfactantes têm propriedades de lisar hemácias (células vermelhas do sangue). Os resultados são avaliados como positivos para a produção de biossurfactantes, quando zonas de hemólise são detectadas ao redor das colônias das bactérias em meio ágar sangue (5% sangue de carneiro). Entretanto, apenas os ramnolipídios são capazes de causar a hemólise e o método pode ser também afetado por íons divalentes e outras hemolisinas produzidas pelo microrganismos sob investigação. Para confirmar se a hemólise é uma consequência da produção de biossurfactante (ramnolipídio que é estável ao calor) ou devido a uma hemolisina (fosfolipase, sensível ao calor) é necessário fazer a extração e secagem do biossurfactante. A seguir, diluir o estrato seco em água (1/10) e testar a atividade hemolítica em diferentes temperaturas (IQBAL *et al.*, 1995; AYUB *et al.*, 1998; TULEVA *et al.*, 2002; BODOUR & MAIER, 2002; TAHZIBI *et al.*, 2004; YOUSSEF *et al.*, 2004).

Análise do perfil da gota: uma técnica modificada da análise pela forma aximétrica de uma gota foi utilizada para acompanhar a produção de biossurfactantes

por onze espécies de *Streptococcus* sp. Esta técnica consiste em adicionar 100 µL de uma cultura da bactéria crescida durante 12 horas (centrifugada e suspendida em uma solução tampão fosfato na concentração de 5×10^9 células mL⁻¹) sob uma superfície de teflon. A forma da gota sob a superfície é acompanhada com o auxílio de um vídeo e de um software específico, capaz de acompanhar as modificações na forma da gota, pela presença de um surfactante (BODOUR & MAIER, 2002).

Teste colorimétrico: outro método que pode ser utilizado é o método da placa de ágar, específico para biosurfactantes aniônicos que consiste na detecção de ramnolipídios extracelulares. Estes biosurfactantes formam um par iônico insolúvel com o surfactante catiônico brometo de cetilmethylamônio e o corante básico azul de metileno que são adicionados no meio mineral com ágar em placas de petri (SIEGMUND & VAGNER, 1991). Este método indica a produção de ramnolipídios pelas colônias inoculadas, através da presença de halos no meio com o azul de metileno em torno das colônias (TULEVA *et al.*, 2002; BENTO *et al.*, 2005a). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para selecionar ramnolipídios, mas pode ser utilizada para selecionar qualquer biosurfactante aniônico de baixo peso molecular (BODOUR & MAIER, 2002).

7.2 Atividade emulsificante

A informação prévia da capacidade de emulsificação de hidrocarbonetos pelos microrganismos é possível de ser visualizada durante o crescimento dos microrganismos em meio mínimo (meio mineral), através de macro ou micro emulsões formadas na fonte insolúvel de carbono (como o óleo cru, óleo diesel, querosene, gasolina), comparando-se com o controle (sem microrganismos).

Índice de emulsificação (IE 24%): uma técnica simples de selecionar a atividade de emulsificação foi desenvolvida por Cooper & Goldenberger (1987) e é baseada no índice de emulsificação (E_{24}). Este índice é obtido adicionando-se 2 mL da cultura e 2 mL de hidrocarboneto em um tubo de ensaio com fundo reto. A solução é agitada por dois minutos e deixada em repouso. Após 24 horas, é calculado a altura da emulsão (camada entre a fase aquosa e o hidrocarboneto) dividido pela altura total dos 4 mL e multiplicado por 100. Desta forma, é obtido o IE 24(%) (índice de emulsificação) no hidrocarboneto que se deseja avaliar. Existem trabalhos avaliando a emulsão obtida no tubo de ensaio após 24 horas, com óleo diesel (AYUB *et al.*, 1998; BICCA *et al.*, 1999; JESUS, 1998; ILORI *et al.*, 2005; BENTO *et al.*, 2005 a,b), com gasolina (CUNHA *et al.*, 2004) e querosene (MURIEL *et al.*, 1996; HABA *et al.*, 2000; NASCIMENTO, 2003; TULEVA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005).

Uma emulsão é definida como estável se o IE após 24 horas foi 50% melhor do que a emulsão após 2 horas de agitação. Sendo que um bom isolado produtor de biosurfactante deverá apresentar um IE > 0,5 (equivalente a 50% de emulsificação do óleo diesel). Para o melhor entendimento da produção do biosurfactante, ou seja, se é extracelular ou se está associado à célula, é aconselhável que se obtenham os

índices com ou sem células (amostras centrifugadas). A redução da tensão superficial e a atividade emulsificante podem ou não estar correlacionadas, sendo atribuído à superfície celular, ou a produtos extracelulares ou ainda a modificações no envelope celular e a fase do crescimento.

Ensaios de turbidez: a atividade emulsificante pode ser estimada pela turbidez de um surfactante causada pela dispersão de hidrocarbonetos em uma solução aquosa (BANAT *et al.*, 1991; MURIEL *et al.*, 1996; BENTO & GAYLARDE, 1996). Um ensaio de emulsificação, baseado em medidas de turbidez foi proposto inicialmente por Rosenberg e colaboradores em 1979, e tem sido modificado e adaptado por diferentes autores (BANAT *et al.*, 1991; MURIEL *et al.*, 1996; BENTO & GAYLARDE, 1996; JACOBUCCI *et al.*, 2001). O ensaio consiste em filtrar 10 mL do caldo de cultura e a seguir secar o filtrado. O filtrado seco é colocado a 1,5 mL de tampão Tris e a densidade ótica medida a 446 nm. Em seguida são adicionados 0,2 mL de hidrocarboneto e a mistura é agitada por 2 minutos. Após 10 minutos a densidade ótica é medida novamente. A atividade emulsificante é obtida pela diferença entre a medida inicial e a final. Segundo Bodour & Maier (2002) este é um resultado difícil de comparar com os obtidos na literatura, uma vez que os biossurfactantes mostram seletividade e não é utilizado um padrão de hidrocarboneto. Desta forma, é preciso realizar medidas com controle positivo e negativo. Uma outra forma de se estimar a atividade emulsificante é a adição direta da cultura (35 µL) a um tubo com 5 mL de tampão Tris (20 mM, pH:8,0). A seguir é adicionado 35 µL de xileno ou outro hidrocarboneto (tolueno, benzeno) e a mistura é agitada por 45 segundos e depois de 20 minutos é realizada a leitura da densidade ótica da solução a 660 nm. Alta absorbância indica alto nível de dispersão do xileno ou óleo no tampão e desta forma, a presença de biossurfactantes; baixa absorbância indica baixa concentração ou ausência de biossurfactantes (BANAT *et al.*, 1991; BENTO & GAYLARDE, 1996; JACOBUCCI *et al.*, 2001; BODOUR & MAIER, 2002).

Hidrofobicidade celular: Pruthi & Cameotra (1997) sugeriram a identificação rápida de bactérias produtoras de biossurfactantes utilizando técnicas para avaliar a modificação da hidrofobicidade da superfície celular. Estes autores encontraram uma correlação direta entre a hidrofobicidade e a produção de biossurfactante. A técnica consiste em avaliar isolados bacterianos quanto a hidrofobicidade, com testes de interação hidrofóbica cromatográfica, teste de agregação de sais, teste de adesão a hidrocarbonetos e teste de aderência ao poliestireno. Entretanto, não está claro nesta técnica qual o método para medir a hidrofobicidade da superfície celular é mais apropriado para uma seleção geral de microrganismos produtores de biossurfactantes (YOUSSEF *et al.*, 2004). O teste de adesão a hidrocarbonetos, originalmente proposto por Rosenberg *et al.* (1980), consiste em determinar as mudanças na hidrofobicidade do envelope celular durante o crescimento em meio mineral com fonte de carbono solúvel e insolúvel. A afinidade pelos hidrocarbonetos pode ser acompanhada durante as diferentes fases do crescimento (exponencial e estacionária) dos microrganismos tanto com substrato solúvel (glicose) ou insolúvel (hexadecano). Após o crescimento, as células são

centrifugadas, lavadas e suspendidas em solução tampão e a seguir são dispensadas (1,2 mL) em tubos de ensaio com 10 mm de diâmetro 0,2 mL de diferentes hidrocarbonetos (dodecano, hexadecano, pristano) são adicionadas, e as amostras são agitadas por 2 minutos e deixadas por 15 minutos em repouso a temperatura ambiente. A turbidez (660 nm) da fase aquosa é medida antes e depois da agitação. Os resultados são expressos em percentagem da absorbância depois da mistura com a suspensão antes da agitação (PHALE *et al.*, 1995; PRUTHI & CAMEOTRA, 1997; TULEVA *et al.*, 2002) conforme a equação: % de células transferidas para o hidrocarboneto = [(Absorbância 660mn após a agitação) ÷ (Absorbância 660 mn antes da agitação)] x 100.

8. Extração e caracterização

A recuperação de biossurfactantes depende principalmente de características como a carga iônica, solubilidade em água e localização (intracelular, extracelular ou ligado a célula) (DESAI & BANAT, 1997). Geralmente, a baixa concentração e a natureza anfipática dos surfactantes microbianos limitam o processo de recuperação. Como ainda são poucas as estruturas de biossurfactantes que têm sido completamente elucidadas em termos de sua biosíntese, regulação e qual informação é codificada geneticamente, o conhecimento destas biomoléculas tem crescido à medida que diferentes populações e espécies vem sendo isoladas e caracterizadas dos mais distintos ambientes. Desta forma, é apresentado um resumo de diversas técnicas citadas na literatura para a extração e caracterização de biossurfactantes, envolvendo diferentes espécies microbianas.

8.1 Extração

A razão pelas quais poucos biossurfactantes têm sido elucidados estruturalmente é pelo fato do processo exigir técnicas laboriosas de extração, purificação e análise da molécula (MAIER, 2003). Inicialmente, todos os processos de extração do biossurfactante passam pela separação inicial das células, através da centrifugação. Conforme apresentado na Tabela 1, algumas técnicas têm sido utilizadas para a extração, porém com base na literatura, foi observado que uma determinada técnica, como por exemplo, a precipitação com acetona, tanto pode ser utilizada para a recuperação de um glicolipídio (PRUTHI & CAMEOTRA, 1997) como para um lipopeptídeo (ILORI *et al.*, 2005). Dependendo da natureza da biomolécula (inerente da espécie) e das condições de crescimento (fonte de carbono, disponibilidade de nutrientes, pH, concentração salina, aeração e temperatura) podem ser produzidos biossurfactantes e ou bioemulsificantes com características estruturais completamente distintas. Desta forma, em cada caso deve-se procurar conhecer pelo menos o gênero dos microrganismos estudados e testar diferentes métodos de extração, visando ao melhor rendimento do biossurfactante recuperado do meio de cultura (KUYUKINA *et al.*, 2001; COELHO, *et al.*, 2004).

Vários trabalhos apresentam a precipitação (podendo ser ácida, com acetona ou com sulfato de amônio) do biosurfactante, seguida ou não da extração com diferentes combinações de solventes tais como: clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butano, etil acetato, pentano, hexano, entre outros. A precipitação ácida é muito utilizada na primeira parte da extração da surfactina (SIM *et al.*, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002; NITSCHKE & PASTORE, 2004; NITSCHKE, *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2004) como a de glicolipídios (MERCADÉ *et al.*, 1996; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; HABA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2005). Para glicolipídios, pode ser utilizada também a precipitação por acetona (PRUTHI & CAMEOTRA, 1995; 1997; COELHO *et al.*, 2004; BENTO *et al.*, 2005c), por isopropanol (BRYANT, 1990) e por sulfato de amônio (Kim *et al.*, 2000b) e por sulfato de alumínio (SCHENK *et al.*, 1995). Os glicolipídios produzidos por *Rodococcus* spp. são predominantemente associados ao envelope celular, que por sua vez podem ser efetivamente isolados pela extração com solventes orgânicos (KUYUKINA *et al.*, 2001), como por exemplo por isopropanol (BRYANT, 1990). Um glicolipídio produzido por diferentes espécies de *Candida*, pode ser extraído com clorofórmio-metanol (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984), com etil acetato (KIM *et al.*, 1999) ou com etanol-butanol-clorofórmio (KIM *et al.*, 2002). Desta forma, podemos encontrar diferentes combinações de solventes orgânicos podem produzir diferentes quantidades de biosurfactante recuperado do meio de cultura (KUYUKINA *et al.*, 2001).

A recuperação do biosurfactante pode ser realizada através da centrifugação (em várias etapas e velocidades) e pode resultar em um meio efetivo, simples e rápido de recuperação do biosurfactante. O meio de cultura centrifugado a várias forças (100 g, 1000 g e 20.000 g) pode ser testado, garantindo que a possibilidade de lise celular contribua para uma maior concentração de compostos com ação surfactante. No entanto, para a identificação das propriedades surfactantes e emulsificantes apresentados pelos produtos de lise celular, é necessário analisar a capacidade emulsificante e atividade superficial desse estrato em solução aquosa (PHALE *et al.*, 1995). A ultracentrifugação com membranas (100kDa) também tem sido utilizada na extração do biosurfactante produzido pelo *Bacillus licheniformis*, resultando em 95% de recuperação da biomolécula (RAMMANI *et al.*, 2005).

8.2 Purificação e caracterização

A etapa de purificação do biosurfactante tem sido realizada através de cromatografia delgada fina e da cromatografia gasosa líquida. Segundo Maier (2003) esta é ainda uma etapa laboriosa e que necessita de participação de outros profissionais e equipamentos especializados. Poucos trabalhos apresentam a metodologia de purificação e caracterização do biosurfactante, como no caso do ramnolipídio da *P. aeruginosa* (SCHENK *et al.*, 1995; SIM *et al.*, 1997; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; Haba *et al.*, 2000; Maier, 2003), da *Nocardia* spp. (KIM *et al.*, 2000a), da *Candida* spp. (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; KIM *et al.*,

al., 1999), do *Rhodococcus* (BRYANT, 1990; MERCADÉ *et al.*, 1996; KUYUKINA *et al.*, 2001), do *Acinetobacter* (BACH *et al.*, 2003) e de *Bacillus* (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997). Alguns trabalhos sugerem a simples precipitação, secagem e pesagem do biosurfactante, sem nenhuma técnica de purificação (PRUTHI & CAMEOTRA, 1995). Outros utilizam a etapa de diálise logo após da precipitação (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; PATIL & CHOPODE, 2001; NOORDMAN & JANSSEN, 2002, BACH *et al.*, 2003). Uma técnica frequentemente empregada para a caracterização de biosurfactantes tem sido a cromatografia delgada fina, para uma purificação parcial (BRYANT, 1990; SIM *et al.*, 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; HABA *et al.*, 2000; ILORI *et al.*, 2005). Embora esta análise possa fornecer informação sobre o conteúdo quali-quantitativo dos biosurfactantes, envolvem procedimentos de pré-purificação como a extração e precipitação orgânica (BOGNOLI, 1998).

A grande maioria dos trabalhos faz uma caracterização bioquímica preliminar do precipitado com base no conteúdo de proteínas, carboidrato e lipídios (BRYANT, 1990; CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; PRUTHI & CAMEOTRA, 1995; MERCADÉ *et al.*, 1996; WU & JU, 1998; PATIL & CHOPODE, 2001; ILORI *et al.*, 2005). O conteúdo de ramnose também tem sido monitorado como uma forma de quantificar os biosurfactantes ramnolipídios (SCHENK *et al.*, 1995; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; HABA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2002), porém não informa sobre a possibilidade de uma possível mistura de biosurfactantes. Desta forma, métodos que utilizam à análise em cromatografia líquida (HPLC) são mais precisos em quantificar frações de interesse como ácidos graxos (SCHENK *et al.*, 1995; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999).

A HPLC representa uma alternativa efetiva para a análise de biosurfactante com a sensibilidade desejada. Porém, é um método que exige muitas vezes a utilização de procedimentos de diálise após a precipitação do biosurfactante. Esta técnica tem sido utilizada na análise quantitativa e ou para a purificação de alguns lipopeptídeos (BOGNOLI, 1999) e de ramnolipídios (SCHENK *et al.*, 1995; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999). Outras técnicas utilizadas na análise química de biosurfactantes incluem a análise de infravermelho Fourier que possibilita visualizar grupos funcionais como ácidos carboxílicos e carbonila (WU & JU, 1998; TULEVA *et al.*, 2002; GARTSHORE *et al.*, 2000; NITSCHKE, *et al.*, 2004) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa (LIN, 1996; MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; TAHZIBI *et al.*, 2004; NITSCHKE *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005).

9. Propriedades e aplicações

Os biosurfactantes de origem microbiana têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petrolífera e de óleos. Essas moléculas devem ser biodegradáveis, não tóxicas e devem ser produzidas por fermentação com custos inferiores aos dos sintéticos (BANAT *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1992). Os biosurfactantes têm diferentes aplicações, incluindo

tratamento de derrames de óleo no mar ou na terra, remoção de pesticidas do solo, estabilizadores de espuma, nas indústrias de alimento e farmacêutica, e na produção de sabões e detergentes (COOPER, 1986). Além destes, são utilizados na indústria de petróleo para melhorar a recuperação do óleo (recuperação terciária), para despoluir áreas contaminadas e no transporte da fração pesada do petróleo em tubulações (CARRILLO *et al.*, 1996). A seguir, algumas das principais aplicações dos biossurfactantes.

Antimicrobianos: entre as muitas propriedades dos biossurfactantes destaca-se a sua atividade antimicrobiana (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004). Vários biossurfactantes possuem alta atividade antifúngica, antibacteriana e anviral. Outros usos relevantes para as ciências biomédicas incluem o papel dos biossurfactantes como agentes antiadesivos contra os patógenos, sendo muito utilizado no tratamento de muitas doenças e como agente terapêutico e probióticos. Entre os biossurfactantes do grupo dos Iturina, o primeiro trabalho que abordou a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes foi a iturina A, um potente lipopeptídeo antifúngico, produzido por *B. subtilis* (BESSION, 1976). Nas células de leveduras a iturina A lesa a membrana plasmática pela formação de pequenas vesículas e agregação de partículas intramembranosas, liberando eletrólitos e produtos de alto peso molecular e degrada também os fosfolipídios (THIMON *et al.*, 1995). Uma nova espécie de bactéria do gênero *Paenibacillus* produz um componente antifúngico similar a iturina, a qual poderia ser mais efetiva contra doenças causadas por fungos. A surfactina é um dos biossurfactantes mais conhecidos pela suas propriedades antimicrobianas. Existem três diferentes tipos de surfactinas denominadas A, B a C, aos quais são classificadas de acordo com as diferenças nas suas seqüências de aminoácidos. A surfactina A tem a L-leucina, a surfactina B tem a L-valina e a surfactina C tem a L-isoleucina na posição do aminoácido envolvido com a formação do anel de lactona com o ácido graxo $\beta\text{C}_{14}\text{-C}_{15}$. Além das propriedades antifúngicas e antibacterianas, a surfactina inibe a formação de coágulos, induz a formação de canais iônicos nas membranas lipídicas da bicamada, inibe a formação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e exibe atividades antivirais e antitumorais (KIM *et al.*, 1998). Surfactina é ativa contra vários vírus, incluindo o vírus da herpes, vírus do estomatite vesicular, vírus do imunodeficiência simian, e o vírus do encefalomiocardite. A inativação de vírus envelopados, especialmente o herpes vírus e retrovírus, foi significativamente mais eficiente do que para vírus não envelopados, sugerindo que a ação antiviral da surfactina é primariamente devido à interação físico-químico entre o surfactante ativo de membrana e o lipídio da membrana do vírus (VOLLENBROICH *et al.*, 1997). Entre os biossurfactantes do grupo dos lipídios manolisteritol, destacam-se algumas estirpes de *Candida antartica* que produzem dois tipos de lipídios manosilerititol (MEL A e MEL B), que exibem atividade antimicrobiana, particularmente contra bactérias gram-positivas. 22MEL-A é um dos mais utilizados até hoje.

Antiadesivos: os biossurfactantes podem ser utilizados como estratégia preventiva impedindo o crescimento dos biofilmes microbianos em cateteres e outros instrumentos médicos cirúrgicos, diminuindo o número de infecções hospitalares, sem a utilização de drogas sintéticas e químicas. Os biossurfactantes podem apresentar

algumas propriedades que interferem no processo de formação de biofilme pelas bactérias. Uma de suas propriedades é a de inibir a adesão de bactérias patogênicas a superfícies sólidas ou a sítios de infecção. A surfactina diminui a quantidade de biofilme formado por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em poços de placas de polivinil (placas de imunoensaio) assim como em cateteres de vinil utilizados em uretras (MIRELES *et al.*, 2001). A aplicação de uma solução de surfactina em cateteres antes da utilização foi tão efetiva quanto à adição de surfactina no meio de cultura. Dada a importância nas infecções oportunísticas com as espécies de *Salmonella*, incluindo as infecções do trato urinário de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), estes resultados apresentam um grande potencial em aplicações práticas.

A adesão inicial do biossurfactante às superfícies sólidas pode constituir-se em uma nova e efetiva maneira de combater a colonização por microrganismos patogênicos tanto na área de microbiologia médica como na qualidade microbiológica de alimentos. Neste sentido, foi avaliado um biossurfactante produzido por *P. fluorescens*, que foi capaz de inibir a adesão de *Listeria monocytogenes* LO28 em superfícies de aço inox e politetrafluoroetileno (MEYLHEUC *et al.*, 2001). Foi demonstrado que o pré-tratamento da superfície provoca uma considerável redução na adesão microbiana, que chegou a 77% no caso da adesão ao vidro por *Enterococcus faecalis* (VELRAEDS *et al.*, 1996) e 85% com relação à adesão de *Candida albicans* na borracha de silicone (BUSSCHER *et al.*, 1997).

Os biossurfactantes também podem ser incorporados em preparações probióticas para combater as infecções do trato urogenital. Como tratam-se de microrganismos que são biologicamente seguros, os biossurfactantes produzidos podem ser uma alternativa viável aos agentes antimicrobianos sintéticos (SINGH & CAMEOTRA, 2004). Existem trabalhos sobre a inibição do biofilme formado por uropatogênicos e leveduras na borracha de silicone por biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (VELRAEDS *et al.*, 1998). Esta característica do papel de biossurfactantes no corpo humano não é um fenômeno novo. O surfactante pulmonar é um complexo lipoproteíco sintetizado e excretado pelas células epiteliais dos pulmões no espaço extracelular, onde o surfactante baixa a tensão superficial entre a interface ar/líquido dos pulmões e também apresenta uma função importante na defesa contra infecções e inflamações. Este fato sugere uma interessante linha de terapia para as doenças infecciosas e inflamatórias dos pulmões (WRIGHT, 2003).

Biorremediação de hidrocarbonetos: o principal uso dos biossurfactantes tem sido na remediação de ambientes contaminados, especialmente com hidrocarbonetos, devido a sua propriedade de estabilização. Esta propriedade aumenta a solubilidade e disponibilidade de poluentes hidrofóbicos, aumentando o potencial para a biodegradação (BENTO *et al.*, 2003). Um ramo importante da pesquisa atual sobre biorremediação é a busca destes biossurfactantes, que podem ser utilizados como aditivos para solos contaminados com compostos pouco solúveis, facilitando, nesta maneira, sua biodegradação. Mulligan (2005) apresenta uma extensa revisão que inclui as aplicações ambientais dos biossurfactantes para o tratamento de solo e da água. Os biossurfactantes são promissores devido a sua biodegradabilidade, baixa

toxicidade e efetividade em aumentar a biodegradação e solubilização de compostos de baixa solubilização. No entanto, mais informações são necessárias para se poder predizer um modelo de comportamento das biosurfactantes. Até o presente momento, a maioria dos trabalhos, tem sido realizada com rhamnolipídios e outros biosurfactantes precisam ser investigados, pois podem apresentar muitas propriedades promissoras (BENTO *et al.*, 2005).

Biorremediação de metais: metais não são degradados química e biologicamente e a grande maioria encontra-se adsorvida na matriz coloidal, em baixa disponibilidade. Deste modo, as estratégias se restringem a alteração na especiação para formas não tóxicas e o aumento da biodisponibilidade para que as reações de detoxificação ocorram (CAMARGO *et al.*, 2004). Conforme descrito, biosurfactantes são compostos microbianos que reduzem a tensão superficial e produzem emulsão. Especificamente, os biosurfactantes podem ser utilizados para aumentar a disponibilidade dos metais na solução aquosa. De acordo com Miller (1995b), os biosurfactantes aumentam a desorção de metais pesados no solo da seguinte forma: a) complexando as formas livres do metal na solução, decrescendo a atividade dos metais na solução que são então desorvidos de acordo com o princípio de Le Chatelier; b) pelo contato direto do biosurfactante com o metal adsorvido na interface sólido-solução, onde a redução da tensão superficial permite que o biosurfactante se acumule nesta interface. A forma mais prática de remoção de metais por biosurfactantes utiliza uma betoneira onde o solo contaminado é colocado com biosurfactantes. Com o revolvimento, o metal forma complexo solúvel com o surfactante, que é retirado por lavagens. O complexo solúvel metal-biosurfactante é tratado ou precipitado deixando o metal na solução para recuperação. A ligação entre o metal (+) e o surfactante (-) é forte o suficiente para remover o complexo da matriz coloidal do solo (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Recuperação de petróleo: os biosurfactantes podem ser produzidos em grandes quantidades por microrganismos e dessa forma, não necessitam ser dependentes de produtos derivados do petróleo (KOCH *et al.*, 1991). O interesse por surfactantes microbianos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente por seu potencial na recuperação de óleos, redução da viscosidade de óleos crus (emulsificação), na biorremediação, como espumantes pesados, entre outros. A mais importante aplicação dos biosurfactantes, concentra-se dentro da microbiologia do petróleo, dentro do processo MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery), incluindo aplicações na limpeza de tanques de óleo, extração de betume, bombeamento de óleo cru, uso como bioemulsificantes, redução da viscosidade de frações pesadas dos óleos crus, entre outros (FINNERTY & SINGER, 1984; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; COOPER, 1986; KOSARIC *et al.*, 1987).

Limpeza de tanques: os biosurfactantes são utilizados na limpeza de tanques e seu modo de ação é a dispersão de componentes oleosos pesados por meio da redução da viscosidade do resíduo oleoso, formando macro e micro emulsões de óleo na água ou de água no óleo. A emulsão menos viscosa é facilmente bombeada e a fração oleosa pode ser facilmente separada após a quebra da emulsificação. Banat *et al.* (1991) produziram biosurfactantes com a estirpe bacteriana denominada PET

1006, que foi crescida em glicose e hidrocarboneto como fonte de carbono. Esses autores desenvolveram uma planta-piloto com uma produção de duas toneladas de cultura com atividade biossurfactante. O produto foi utilizado como um substituto para o surfactante químico na limpeza de um tanque de estocagem de óleo da Companhia de Óleo do Kuwait. A limpeza foi feita sucessivamente removendo o resíduo oleoso do fundo do tanque, e também permitiu a recuperação de mais de 90% de hidrocarboneto aderido ao resíduo oleoso.

Controle biológico: alguns surfactantes têm sido utilizados no controle biológico de patógenos de plantas em substituição a pesticidas. Stanghellini *et al.* (1996) estudando o efeito de surfactantes sintéticos no controle de *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici* infectando abóbora e pimenta verificou a lise dos zoosporos fúngicos devido à presença de biossurfactantes, produzido por *P aeruginosa* (ramnolipídio). Verificou-se que o biossurfactante produzido apresentava ação zoosporicida contra estas espécies fúngicas mais a *Plasmopara* em concentrações entre 5-30 µL mL⁻¹, onde atuava rompendo e lisando a membrana. Biossurfactantes também têm sido utilizados na formulação de pesticidas orgnofosforados, como é o caso do emulsificante produzido por *Bacillus* que foi hábil em formar emulsões na presença do pesticida fenthion (PATEL & GOPINATHAN, 1986). Biossurfactantes também podem ser importantes na biodegradação de pesticidas conforme descrito por Singh & Cameotra (2004b).

Mineração: os biossurfactantes podem ser utilizados na mineração como dispersantes de minérios e em processos industriais que necessitem desta propriedade. Rosenberg *et al.*, (1988) observou que a produção de um polissacarídeo aniônico chamado biodispersan pelo *A. calcoaceticus* A2 previou a floculação e aumentou em 10% a dispersão da rocha calcária em meio aquoso. Neste caso específico, o biodispersan atuou como dispersante, surfactante e foi responsável pela fratura da rocha em partículas menores. Mais recentemente, Rosenberger & Ron (1999) sugeriram que o pH deve ser alcalino durante o processo de moagem e nesta situação, o biodispersan entra nas microrupturas da rocha e diminui a energia necessária para fraturar a rocha. A indústria Kao Chemical Co (Japão) utilizou *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Alcaligenes* para a produção de biossurfactantes para a estabilização do efluente de carvão, durante o transporte (SINGH & CAMEOTRA, 2004b).

Cosméticos: biossurfactantes têm sido utilizados em grande escala na composição de cosméticos devido às suas propriedades humectantes e compatibilidade com a pele (Brown, 1991). Biossurfactantes como sorolipídios são produzidos por algumas bactérias (Tabela 1), utilizando diferentes substratos. Grande parte dos sorolipídios misturados com propileno glicol é compatível com a pele humana e são encontrados em formulações comerciais como hidratante (YAMANE, 1987). Algumas outras indústrias utilizam biossurfactantes como a Sofina (sorolipídio) nas formulações das maquiagens.

Indústria de alimentos: na indústria de alimentos, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes durante o processamento de materiais crus. Neste

caso, os emulsificantes têm a função de proporcionar a consistência e a textura adequada. São utilizados em molhos, na fabricação de pães e em frigoríficos, os quais influenciam propriedades reológicas como o sabor (SINGH & CAMEOTRA, 2004b).

Outras aplicações: o uso de biosurfactantes é bastante amplo e variado. Além dos exemplos anteriores, são utilizados na indústria de papel, têxtil, cerâmicas, tintas, e no processamento de minérios, entre outras possibilidades.

10. Considerações finais

A partir dos anos 60, do século XX, um grande número de microrganismos tem sido relatado como produtores de inúmeras classes e tipos de surfactantes. Os biosurfactantes e os bioemulsificantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento nas mais diferentes fontes de carbono, desde substâncias hidrofílicas como a glicose, até substratos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos. Os biosurfactantes permitem que os microrganismos cresçam em substratos imiscíveis em água, pela redução da tensão superficial, tornando-o mais disponível para a captação e metabolismo. Os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biosurfactantes são diferenciados pela natureza química da biomolécula e pela espécie microbiana produtora. Os surfactantes microbianos são moléculas complexas com uma grande diversidade estrutural, ocorrendo à produção entre os diferentes grupos microbianos, sendo, entretanto, muitas vezes específico do gênero e às vezes da espécie. Simplificadamente, os biosurfactantes podem ser divididos em moléculas de baixo e alto peso molecular. Os surfactantes de baixo peso molecular (glicolipídios, ácidos graxos e fosfolipídios) e de alto peso molecular (polímeros), são formados por polissacarídeos ou por uma mistura. Os surfactantes de baixo peso molecular apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial do meio, quando presentes no meio aquoso. Os surfactantes de alto peso molecular, chamados de bioemulsificantes, são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial. O interesse em se produzir surfactantes microbianos tem levado ao desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes, quantitativos e qualitativos para a seleção e análise de microrganismos produtores de biosurfactantes. Devido a grande diversidade nas propriedades físicas e químicas apresentadas pelos biosurfactantes, existe pouca homologia na codificação dos genes dos vários tipos de surfactantes, e por esta razão são pouco utilizadas técnicas de seleção molecular e bioquímica. A diversidade estrutural dos biosurfactantes codificada por diferentes genes, implica em diversidade genética para a biossíntese. O entendimento da estrutura e dos mecanismos de regulação para a excreção de biosurfactantes pode ser o ponto chave para o desenvolvimento de métodos mais baratos para a produção em escala industrial, com capacidade de competir comercialmente com os surfactantes sintéticos e um dos principais indicadores de pesquisa futura. A amplitude de usos, propriedades e de estruturas oferecem aos biosurfactantes grandes vantagens em comparação aos surfactantes sintéticos. Trata-se de moléculas biodegradáveis e menos tóxicas,

as quais são efetivas em condições extremas de temperatura, pH e salinidade, além de serem produzidos a partir de vários substratos baratos, reduzindo o custo da produção. Os biossurfactantes de origem microbiana têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petrolífera e de óleos. Os biossurfactantes têm diferentes aplicações, incluindo tratamento de derrames de óleo no mar ou na terra, remoção de pesticidas do solo ou de metais, estabilizadores de espuma, nas indústrias de alimento e farmacêutica, e na produção de sabões e detergentes. Com reconhecido potencial industrial e inúmeras aplicações biotecnológicas, os biossurfactantes ainda representam um desafio em relação ao conhecimento de novas espécies potencialmente produtoras, métodos de análise, extração, purificação e otimização da produção, mobilizando diferentes setores da indústria de cosméticos, alimento, farmacêutica, da agricultura e ambiente.

Referências

- ATLAS. R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons – an environmental perspective. *Microbiological Review*, v.45, p.180-209, 1981.
- AYUB. M.A.Z.; BENTO, F.M.; BICCA, F.; ESTEVES, J.C.; GYLARDE, C.C.; JESUS, H.S.; MORAN. A.; OLIVEIRA, N. & SINERIZ, F. "A comparison of methods for the testing of microbial isolates for emulsifying activity". In: III Simpósio Latino Americano de Biodeterioração, LABS 3, Florianópolis. *Livro de Resumos*, p.33, 1998.
- BACH. H.; BERDICHEVSKY, Y.; GUTNICK. D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.5, p.2608-2615, 2003.
- BALDI, F.; PEPL, M.; CAPONE, A.; GIOVAMPAOLA, C.; MILANESI, C.; FANI, R.; FOCARELLI, R. Envelope glycosylation determined by lectins in microscopy sections of *Acinetobacter venetianus* induced by diesel fuel. *Research in Microbiology*, v.154, p.417-424, 2003.
- BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.7, n.1, p.80-88, 1991.
- BANAT, I.M. Characterization of Biosurfactants and their Use in Pollution removal-State of the Art (Review). *Acta Biotechnologica*, v.15, n.3, p:251-267, 1995.
- BATISTA, S.B. *Bactérias de Ambientes contaminados com petróleo ou derivados produtores de biossurfactantes e bioemulsificantes*. 32p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.
- BEDNARSKY, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*, v.95, p.15-18, 2004.
- BEHRING, J.L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I.O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação a CMC de surfactantes no ensino de química. *Química Nova*, v.27, n.3, p.492-495, 2004.
- BENTO, F.M. & GYLARDE, C.C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. *International Biodegradation & Biodeterioration*, v.38, n.1, p:31-33, 1996.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER, W.T. Jr. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, n.1, p.65-68, 2003.
- BENTO, F.M.; R.J.S. JACQUES, M.C.R. PERALBA., C.C. GYLARDE, P.A. SELBACH, CAMARGO, F.A.O. Screening of biosurfactant producing-bacteria from landfarming site to enhance bioremediation process - Part I In: *First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology* I-BSPB, Natal, CD-room, 2005a.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; GYLARDE, C.C.; FRANKENBERGER, W.T. Jr. Biosurfactant production by microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil.In: *First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology* I-BSPB, Natal,CD-room, 2005b.

- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER, W.T. Jr. Biosurfactant production by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *Current Opinion in Microbiology*, *in press*, 2005c.
- BESSON, C. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Antibiotics*, v.29, p.1043-1049, 1976.
- BICCA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubra* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, v.30, p.231-236, 1999.
- BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, v.32, p.273-280, 1998.
- BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Biosurfactants: Types, screening methods and applications. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, p.750-770, 2002.
- BODOUR, A.A.; DREES, K.P.; MAIER, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.6, p.3280-3287, 2003.
- BOGNOLI, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects*, v.152, p.41-52, 1999.
- BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VASQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.456-463, 2005.
- BROWN, M.J. Biosurfactants for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science*, v.13, p.61-64, 1991.
- BRYANT, F. Improved method for the isolation of biosurfactant glycolipids from *Rhodococcus* sp Strain H 13A *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.5, p.1494-1496, 1990.
- BUSSCHER, H.J.; van HOOGMOED, C.G.; GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.I.; van der KUIJL-BOOIJ, M.; van der MEI, H.C. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactant inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.3810-3817, 1997.
- CAMARGO DE MORAIS, M.M.; RAMOS, S.A.F.; PIMENTEL, M.C.B.; DE MORAIS, M.A.; LIMA, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.191-194, 2003.
- CAMARGO, F.A.O., BENTO, F.M., OKEKE, B., FRANKENBERGER, W.T. Hexavalent chromium reduction by immobilized cells and the cell free extract of *Bacillus ES29*. *Bioremediation Journal*, v.8, p.1-8, 2004.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, p.262-266, 2004.
- CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETTI, A.M. Isolation and Selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.12, p.82-84, 1996.
- CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, p.747-750, 1984.
- COELHO, R.S.; JACKISCH-MATSUURA, A.B.; DURRANT, I.R. Evaluation of four isolation methods for biosurfactants produced by *Planococcus citreus*, *Pantoea agglomerans* and *Bacillus mycoides*. In: Fifth Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium, LABS 5, Campeche, Mexico. *Anais*, v.1, p.57, 2004.
- COOPER, D.G. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*, v.3, n.5, p.145-149, 1986.
- COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. Production of biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, p.173-176, 1984.
- COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E. Surface-active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, v.26, p.229-253, 1980.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.2, p.224-229, 1987.
- COSTA, G.N.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, *in press*, 2005.
- CUI, X.; HARLING, R.; MUTCH, P.; DARLING, D. Identification of N-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing. *European Journal of Plant Pathology*, v.111, p.297-308, 2005.
- CUNHA, C.D.; ROSARIO, M.; ROSADO, A.S.; LEITE, S.G.F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry*, v.39, p.2277-2282, 2004.

- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.47-64, 1997.
- DÉZIEL, É.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINE, F.; BISSALLON, J-G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1908-1912, 1996.
- DUVNJAK, Z.; COOPER, D.G.; KOSARIC, N. Production of biosurfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p.165-175, 1982.
- FINNERTY, W.R.; SINGER, M.E. 1984. A microbial biosurfactant physiology, biochemistry, and applications. **Developments in Industrial Microbiology**, v.25, p.31-146, 1984.
- GARTSHORE, J.; LIM, Y.C.; COOPER, D.G. Quantitative analysis of biosurfactant using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. **Biotechnology Letters**, v.22, p.169-172, 2000.
- GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.2, p.301-305, 1984.
- GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.A.; DUARTE, M.S.; LIMA, G.M.S.; ARAUJO, J.M. Bactérias produtoras de Surfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p.39-45, 2003.
- GUTNICK, D.L.; AVIGARD, R.; BLATT, Y.; MINAS, W.; ALLON, R. Amphiphatic microbial capsules as industrial products. **Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement**, v.74, p.125S-135S, 1993.
- HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.
- HAFFERBERGER, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.P. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v.33, p.53-93, 1986.
- HERNANDEZ-ANGUIANO, M.; SUSLOW, T.V.; LELOUP, L.; KADO, C.I. Biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* and soft-rotting of harvested florets of broccoli and cauliflower. **Plant Pathology**. p.1-6, 2004.
- HISATSUKA, K.; NAKAHARA, T.; YAMADA, K.. Protein-like activator for alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa* S7B1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.36, p.1361-1369, 1972.
- HOMEL, R.K. Formation and physiological role of biosurfactants reduced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. **Biodeterioration**, v.1, p.107-116, 1990.
- HUA, Z.; CHEN, Y.; DU, G.; CHEN, J. Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.25-29, 2004.
- HUDAK, A.J.; CASSIDY, D.P. Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p.861-868, 2004.
- ILORI, M.O.; AMOBI, C.J.; ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, 2005 *in press*.
- INOH, Y. et al., Biosurfactants of MEL-A increase gene transfection mediated by acationic liposomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.289, p.57-61, 2001.
- IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n.3, p.176-179, 1995.
- JACOBUCCI, D.F.C.; VASCONCELOS, C.K.; MATSUURA, A.B.; FALCONI, F.A.; DURRANT, L.R. Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains. **Soil Sediment & Water**, p.1-9, 2001.
- JAIN, D.K.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE, H.; REVORS, J.T. A drop-collapse test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiology Methods**, v.13, p.271-279, 1991.
- JESUS, H.S. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Biodegradadoras de Hidrocarbonetos e Produtoras de Biosurfactantes**. 120 p. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1998.
- KÄPPELI, O.; FINNERTY, W.R.. Partition of alkanes by extracellular vesicles derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v.140, p.707-712, 1979.
- KIM, K. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. **Biochemistry Pharmacology**, v.55, p.975-985, 1998.
- KIM, S.H.; YOON, B.D.; CHOUNG, D.H.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.713-721, 1999.
- KIM, H.S.; KIM, S.B.; PARK, S.H.; OH, H.M.; PARK, Y.; KIM, K.; KATSURAGI, T.; TAM, Y.; YOON, B.D.; Expression of *gfp* gene and hydrocarbon degradation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v.22, p.1431-1436, 2000a.

- KIM, S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.31, p:249-253, 2000b.
- KIM, S.H.; JEON, J.W.; LEE, H.W.; PARK, Y. SEO, W.T.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; YOON, B.D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v.24, p.225-229, 2002.
- KIM, H.S., KIM, Y.B., LEE, B.S., KIM, E.K. Sophorolipid production by *Candida bombicola* ATCC 22214 from a corn-oil processing by-product. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.55-58, 2005.
- KOCH, K.A.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.13, p.4212-4219, 1991.
- KOMA, D., HASUMI, F., YAMAMOTO, E., OHTA, T., CHUNG S.Y., KUBO, M. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engines by *Acinetobacter* sp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.91, p.94-96, 2001.
- KOSARIC, N.; GRAY, N.C.C.; CARNS, W.L. Biotechnology and the surfactant industry. In: **Biosurfactants and Biotechnology**. Surfactant Science Series. New York, M. Dekker. v.25, p.1-19, 1987.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Applied Chemistry**, v.64, n.11, p.1731-1737, 1992.
- KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; PHILP, J.C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S.; RITCHKOVA, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v.46, p.149-156, 2001.
- LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.7, p.12-20, 2002.
- LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactant. In: **Biosurfactants and Biotechnology**. Surfactant Science Series, New York, M. Dekker, v.25, p.21-45, 1987.
- LAZAZZERA, B.A.; KURTSER, I.G.; McQUADE, R.S.; Grossman, A.D. An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.5193-5200, 1999.
- LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemistry Technological Biotechnology**, v.66, p.109-120, 1996.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUG, M.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the Folin-Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v.52, p.101-121, 2003.
- MAIER, R.M.; SOBERÓN-CHAVES, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p.625-633, 2000.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.37-42, 1997.
- MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography**, p.211-220, 1999.
- MERCADÉ, M.E.; MONLEON, L.; ANDRES, C.; RODON, I.; MARTINEZ, E.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.161-166, 1996.
- MEYLHEUC, T. et al., Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO 28. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.822-832, 2001.
- MILLER, R.M. Chapter 3: Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In: **Bioremediation Science and Applications**. p.33-54, 1995.
- MILLER, R.M. Biosurfactant facilitated remediation of contaminated soil. **Environmental Health Perspective**, v.103, n.1, p.59-62, 1995b.
- MILLER, R.M., ZHANG, Y. Chapter 4 Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Bioremediation Protocols**, p.59-66, 1997.
- MIRELES, J.R. et al., *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilm forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5848-5854, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183-198, 2005.
- MURIEL, J.M.; BRUQUE, J.M.; OLÍAS, J.M.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, v.18, n.3, p.235-240, 1996.
- NASCIMENTO, A.P. *Isolamento, Seleção e Caracterização de Microrganismos Produtores de Biosurfactantes*. 71p. Dissertação de Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Piracicaba, USP, Piracicaba, SP, 2003.

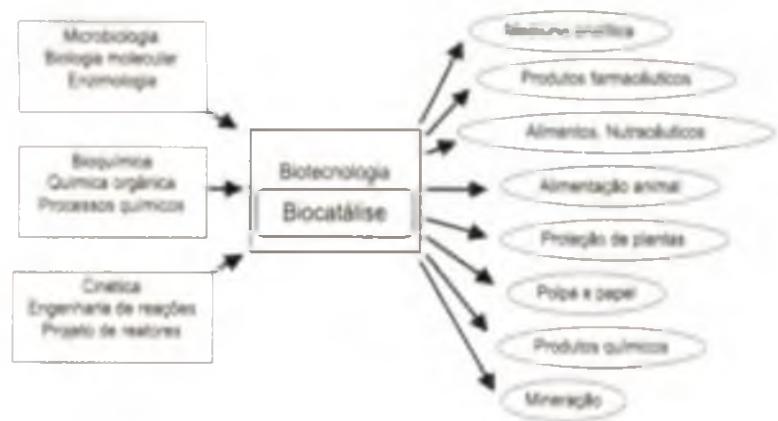
- NEU, T.R.; MAY, M. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological Reviews**, v.60, n.1, p.151-166, 1996.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v.25 (5), p.772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C., PASTORE, G. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.81-85, 2004.
- NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.112, p.163-172, 2004.
- NITSCHKE, M., HADDAD, R.; COSTA, G.N.; GILIOLI, R.; MEURER, E.C.; GATTI, M.S.V.; EBERLIN, M.N.; HOEHR, N.F; PASTORE, G.M. Structural Characterization and Biological Properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science Biotechnology**, v.13 (5), p.591-596, 2004.
- NOAH, K.S., BRUHN, D.F. BALA, G.A. Surfactant production from potato processing effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, p.465-473, 2005.
- NOORDMAN, W.T.; JANSSEN, D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p.4502-4508, 2002.
- PATEL, M.N., GOPINATHAN, K.P. Lyzozyme sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.1224-1226, 1986.
- PATIL, J.R.; CHOPODE, B.A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.290-298, 2001.
- PEIPOX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.553-563, 1999.
- PHALE, P.; SAVITHRI, H.S.; RAO, N.A., VAIDYANATHAN, C.S. Production of biosurfactant "Biosur-Pm" by *Pseudomonas maltophilia* CSV89: characterization and role in hydrocarbon uptake. **Archives in Microbiology**, v.163, p.424-431, 1995.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Rapid method for monitoring biosurfactant production obtained by acetone precipitation. **Biotechnology Techniques**, v.9, n.4, p.271-276, 1995.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.9, p.671-674, 1997.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactant by *Pseudomonas putida* - a Gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants Detergents**, v.6, p.65-68, 2003.
- RAHMAN, K.S.M., RAHMAN, T.J., MCCLEAN, S., MARCHANT, R., BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v.18, p.1277-1281, 2002.
- RAMMANI, P.; KUMAR, S.S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. **Process Biochemistry**, v.40, p.3352-3359, 2005.
- RAPP, P.; BOCK, H.; WRAY, V.; WAGNER, F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n- alkanes. **Journal of General Microbiology**, v.115, p.491-503, 1979.
- RATLEDGE, C. Biochemistry of aliphatic hydrocarbon assimilation and degradation. In: FIRST LATIN AMERICAN BIODETERIORATION SYMPOSIUM, Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão, p.236-250, 1992.
- REDDY, P.G.; SINGH, H.D.; ROY, P.K.; BARVAH, J.N. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.1241-1269, 1982.
- REDDY, P. G., SINGH, H. D., PATHANK, M. G., BHAGAT, S. D., BARUAH, N.. Isolation and functional characterization of hydrocarbon emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.387-401. 1983.
- REILING, H.E; THANEI-WYSS, U; GUERRA-SANTOS, L.H; HIRT, R; KAPPELI, O; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.985-9, 1986.
- REIS, FASL, SERVULO, E.FC; DE FRANCA, F.P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113, p.899-912, 2004.
- ROCHA, C.; SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; VIERNA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.125-128, 1992.

- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v.3, n.4, p.229-237, 2001.
- ROONGSAWANG, N., THANIYAVARN, J., THANIYAVARN, S., KAMEYAMA, T., HARUKI, M., IMANAKA, T., MORIKAWA, M., KANAYA, S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, v.6, p.499-506, 2002.
- ROSENBERG, E., RUBINOVITZ, A., GOTTLIEB, A., ROSENHAK, S., RON, E. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Applied Environmental Microbiology*, v.54, p.317-322, 1988.
- ROSENBERG, E., PERRY, A., GIBSON, D. T., GUTNICK, D. L., Emulsifier of *Arthrobacter RAG-1* – isolation and emulsifying properties. *Applied Environmental Microbiology*, v.37, p.402-408, 1979.
- ROSENBERG, E.; GUTNICK, D.L. ROSENBERGER, E.Z. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, v.9, p.29-33, 1980.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.52, p.154-162, 1999.
- ROSENBERG, M., KJELLBERG, Hydrophobic interactions – role in bacterial adhesion. *Advances in Microbial Ecology*, v.9, p.353-393, 1985.
- RUBINOVITZ, C., GUTNICK, D.L., ROSENBERG, E. Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. *Journal of Bacteriology*, v.152, p.126-132, 1982.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chromatography*, v.693, p.7-13, 1995.
- SIDAL, U., OZKALE-TASKIN, E. Rhamnolipid production from olive oil mill effluent using the rotating disc bioreactor. *Biologia*, v.58, p.1081-1086, 2003.
- SIEGMUND, I., WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Technology*, v.5, p.265-268, 1991.
- SIM, L.; WARD, O.P.; LI, Z.Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.232-238, 1997.
- SINGH, P., CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, v.22, n.3, p.142-146, 2004a.
- SINGH, P., CAMEOTRA, S.S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.319, p.291-297, 2004b.
- SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D., NUNEZ, A., FOGLIA, T.A. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnology Letter*, v.26, p.1241-1245, 2004.
- STANGHELLINI, M.E., KIM, D.H., RAMUSSEN, S.L., RORABAUGH, P.A. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with non-ionic surfactant. *Plant Disease*, v.80, p.1113-116, 1996.
- SULLIVAN, E.R. Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, v.9, p.263-269, 1998.
- SYLDATK, C., MATULOVIC, U., LANG S., WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from normal-alkanes or glycerol by resting cells. *Naturforschung*, v.40, p.61-67, 1985.
- SYMMANK, H., FRANKE, P., SAENGER, W., BERNHARDT, F. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engineering*, v.15, p.913-921, 2002.
- TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M.M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iranian Biomedical Journal*, v.8, n.1, p.25-31, 2004.
- TULEVA, B.J.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Naturforsch*, v.57, p.356-360, 2002.
- THIMON, L. Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters*, v.128, p.101-106, 1995.
- VELRAEDS, M.M. van der Mei, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, v.8, p.51-61, 1996.
- VILDANOVA-MARTISHINI, R.I., TUROVSKY, A.A., ZAIKOV, G.E. Research of kinetic parameters of growth of the bacterial strain *Rhodococcus luteus* on different substrates. *Oxidation Communications*, v.25, p.587-595, 2002.
- VOLLENBROICH, D. Mechanism of inactivation of enveloped viruses, by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, v.25, p.289-297, 1997.

- WATKINSON, R.J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, v.1, p.79-92, 1990.
- WEI, Y.H.; WANG, L.F.; Chang, J.S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, v.20, p.979-983, 2004.
- WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v.7, p.415-423, 1997.
- WRIGHT, J.R. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense: *Journal of Clinical Investigation*, v.111, p.1453-1455, 2003.
- WU, J.; JU, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, v.59, p.193-2002, 1998.
- YAMANE, T. Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v.64, p.1657-1662, 1987.
- YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v.56, p.339-347, 2004.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (Biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.10, p.3276-3282, 1992.

Importância Ambiental da Biocatálise

**Viridiana Santana Ferreira-Leitão¹, Maria Antonieta Ferrara² e
Elba P. S. Bon³**



I. Introdução

A biocatálise é a aplicação de enzimas livres ou de células íntegras como agentes catalisadores (BEILEN & LI, 2002). Alguns autores preferem utilizar definições mais específicas e considerar a tecnologia enzimática como a aplicação competitiva de enzimas em bioprocessos de grande escala (PANKE & WUBBOLTS, 2002). Neste capítulo utilizaremos a primeira definição.

A biocatálise industrial é amplamente vista com a “terceira onda” da biotecnologia, em seguida às ondas farmacêutica e agrícola. No centro desta tecnologia estão os catalisadores biológicos, ou melhor, as enzimas industriais (MARRS, 1999). Os catalisadores biológicos em geral são bastante atraentes para aplicação industrial, principalmente pela sua ação eficiente e seletiva. As reações mediadas por biocatalisadores resultam em elevados rendimentos com excelentes níveis de pureza, minimizam a formação de subprodutos e em geral promovem régio-, estereo-especificidade. Todas estas vantagens asseguradas pelos biocatalisadores ocorrem em condições reacionais brandas. A biocatálise apresenta muitas aplicações em diferentes setores industriais e muitas são também as áreas do conhecimento com interface no desenvolvimento, aplicação e avanço da tecnologia enzimática, conforme representado na Figura 1.

Nem todo catalisador biológico pode ser utilizado como uma enzima industrial. Alguns aspectos precisam ser considerados para a sua aplicação industrial: estabilidade, viabilidade e produtividade. Na Figura 2 estão descritos de forma mais detalhada alguns parâmetros que devem ser avaliados para aplicação industrial de biocatalisadores e todos os passos que devem ser considerados (BEILEN & LI, 2002; SCHMID *et al.*, 2001). A Figura 2 é chamada de ciclo da biocatálise. O primeiro passo no desenvolvimento de um processo biocatalítico é descobrir a reação-alvo. O biocatalisador é definido, selecionado, caracterizado e modificado. Posteriormente, o

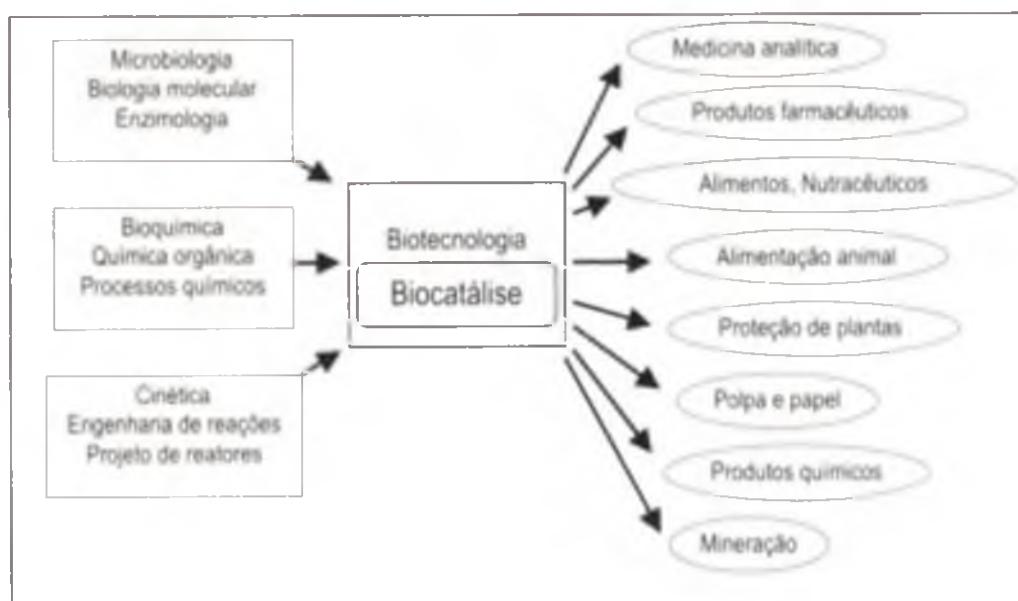


FIGURA 1. Correlação da biocatálise com outras áreas do conhecimento e os principais setores de aplicação (Bommarius & Riebel, 2004).

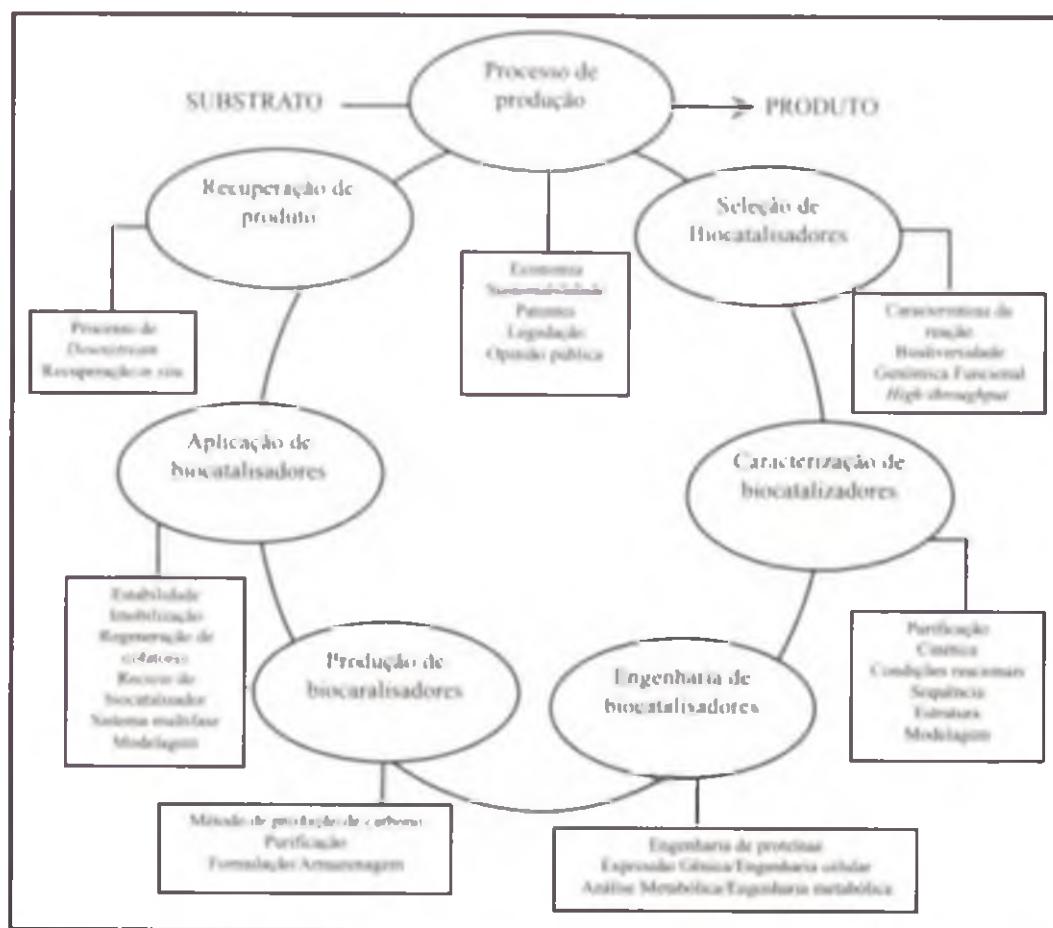


FIGURA 2. O ciclo da biocatálise (Beilen & Li, 2002; Schmid *et al.*, 2001).

TABELA 1. Tecnologias que dão suporte ao desenvolvimento da tecnologia enzimática (Beilen & Li, 2002).

Tecnologia	Avanços proporcionados
Genômica funcional	<ul style="list-style-type: none"> • Descoberta de enzimas • Correlação de genoma e atividade enzimática • Genômica para o descubrimento de drogas relacionadas à atividade enzimática
Determinação da estrutura protéica	<ul style="list-style-type: none"> • Genômica estrutural
Métodos de alta velocidade (<i>high-throughput</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Descoberta e otimização de enzimas/Imobilização de enzimas em sistemas sol-gel • Métodos de seleção de alta velocidade (<i>high-throughput</i>) • Evolução dirigida para otimização de enantioseletividade • Evolução dirigida e biocatálise • Novas atividades enzimáticas através de modificações químicas • Enzimas artificiais
Engenharia enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Polimerização enzimática • Glicosilação de compostos bioativos • Biosensores, biorreatores e células biocombustíveis • Metabolitos como produtos químico industriais • Biocatálise industrial • Imobilização enzimática em diferentes materiais • Técnica de proteção de grupos enzimáticos
Biocatálise combinatorial	<ul style="list-style-type: none"> • Re-enovelamento protéico para processos industriais • Fermentações contínuas em estado semi-sólido • Novos desenvolvimentos em bio-separação
Bioeletrocatalise Engenharia metabólica Engenharia de bioprocessos	<ul style="list-style-type: none"> • Organismos geneticamente modificados • Redução de resíduos e poluição
Produção de proteínas e processos de downstream	
Aspectos regulatórios	

biocatalisador é produzido, aplicado na bioconversão e o produto é recuperado (BEILEN & LI, 2002).

O crescimento da biocatálise também está relacionado ao desenvolvimento de novas tecnologias e aplicação de tecnologias vigentes na descoberta e aprimoramento de biocatalisadores, conforme descrição apresentada na Tabela 1.

2. Mercado de enzimas

O mercado de enzimas industriais, que incluem enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal, foi estimado em dois bilhões de dólares em 2004, com expectativa de crescimento anual de 3%, atingindo assim 2,4 milhões em 2009 (Business Communication Company, 2004). A produção de enzimas “in house” deve corresponder a aproximadamente 10% do mercado de enzimas (GODFREY, 2002; MAISTER, 2001). Considerando o seu uso em larga escala, os maiores nichos correspondem às indústrias do amido (α -amilase, glicoamilase e glicose isomerase), de detergentes (proteases alcalinas), têxtil (amilases e celulases) e de laticínios (renina). Outras aplicações relevantes ocorrem em panificação, cervejaria, produção de sucos de frutas, ração animal, indústria de papel e celulose, aromatizantes, processamento de óleos e gorduras, hidrólise de proteínas, processamento de couro, química fina e tratamento de efluentes. Proteases e amilases são as enzimas de maior uso, correspondendo a 25% e 20% do mercado total, respectivamente (Business Communication Company, 2004). O crescimento do mercado das enzimas para ração animal é significativo, impulsionado em grande parte pelo crescente uso da enzima fitase.

Este mercado é, entretanto, majoritariamente suplantado pelas enzimas com aplicação em medicina e pelas chamadas enzimas especializadas (utilizadas em analítica, biotecnologia e pesquisa).

O mercado mundial de biocatalisadores é dominado pelos países desenvolvidos. Assim, a Europa e a América do Norte detêm mais de 66% deste mercado, ficando aproximadamente 30% para o restante do mundo (GODFREY, 2002). O Brasil, apesar da sua biodiversidade e enorme disponibilidade de biomateriais, que lhe conferem uma vocação para o desenvolvimento da biotecnologia, corresponde a apenas 2% do mercado mundial de enzimas (BON & PEREIRA Jr., 2000).

A produção e o uso de biocatalisadores industriais é uma área em expansão pela grande diversidade natural de biocatalisadores e também devido a disponibilidade de técnicas modernas para o melhoramento e otimização na seleção, produção, estabilização e modificação das enzimas industriais. Estas técnicas possibilitam a inserção de novos biocatalisadores nos processos industriais por contribuírem também na viabilidade econômica. A utilização de enzimas como catalisador traz vantagens imediatas aos processos que as utilizam: sua especificidade minimiza a formação de subprodutos e as condições mais brandas de reação resultam num menor consumo energético (temperaturas entre 25 a 40°C, pressão atmosférica e pH em torno da neutralidade) (ROZZELL, 1999). Adicionalmente, os efluentes de processos industriais catalisados por enzimas apresentam menor impacto ao meio ambiente. O desenvolvimento deste tipo de tecnologia é uma tendência mundial e vem crescendo bastante em países desenvolvidos, gerando inúmeras patentes e aplicações industriais rentáveis (BELICZEY *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 1999; BRUHN *et al.*, 1995; DÜNNWALD *et al.*, 1999, KOELLER & WONG, 2001).

3. Sustentabilidade dos bioprocessos

Inicialmente as enzimas eram obtidas como produtos naturais de tecidos animais, vegetais ou microbianos. Com o desenvolvimento dos processos fermentativos, os catalisadores de origem microbiana foram tomando espaço.

Otto Rohm, em 1908, empregou tripsina no tratamento de couro. Em 1913, esta mesma enzima foi utilizada na formulação do detergente BURNUS na Alemanha. Logo, estes são os primeiros relatos sobre a utilização industrial de enzimas. Além disso, em 1874, o químico dinamarquês Christian Hansen extraiu renina de estômagos secos de bezerros e esta preparação foi utilizada para produção de queijos. É importante lembrar também que a diastase foi extraída do malte em 1833. Assim, entre 1833 e 1876, portanto entre 170 e 130 anos atrás, proteases e amilases, que são as enzimas industriais mais utilizadas até os dias de hoje, foram pela primeira vez extraídas de tecidos animais e vegetais (BON & PEREIRA Jr., 2000). O primeiro processo industrial utilizando enzimas imobilizadas foi desenvolvido por Chibata e colaboradores em 1969, para a produção de L-aminoácidos a partir de misturas racêmicas usando L-aminoacilase imobilizada em DEAE-Sephadex, pela companhia japonesa Tanabe Seiyaku. Quase simultaneamente foi colocado em operação nos Estados Unidos o processo de produção de xarope de frutose a partir de amido de milho utilizando glicose isomerase imobilizada (LIESE *et al.*, 2000). Logo, estes são os primeiros relatos sobre a utilização industrial de enzimas.

No mínimo 134 processos de biotransformação para a *obtenção de produtos ou precursores para síntese química* já se encontravam desenvolvidos em escala industrial em 2002 (STRAATHOF *et al.*, 2002). Muitos destes processos estão relacionados à produção de fármacos ou agroquímicos. A Figura 3 apresenta dados da evolução de processos industriais biocatalisados desde a década de 60 até o presente. Estes dados se referem às últimas cinco décadas. Neste período, a biotecnologia e muitas ciências afins evoluíram de forma surpreendente. Logo, acredita-se que a tendência de crescimento seja ainda maior para os próximos anos. A transição da indústria química tradicional para a biocatálise deve ser bastante ampliada nos países desenvolvidos e deve iniciar um crescimento mais intenso nos países em desenvolvimento. Hoje, o que impulsiona a expansão de processos biocatalíticos não é somente a idéia de preservação do meio ambiente e o desenvolvimento de tecnologias limpas e sim aspectos econômicos que serão tratados nos estudos de casos que serão apresentados.

Dentre os 134 processos biocatalisados citados por Straathof, a

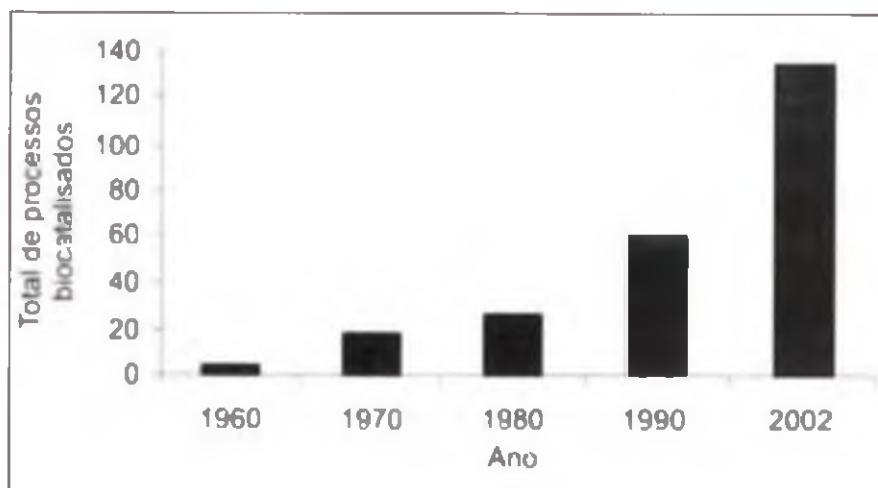


FIGURA 3. Evolução na implantação de processos industriais biocatalisados na indústria química (Straathof *et al.*, 2002).

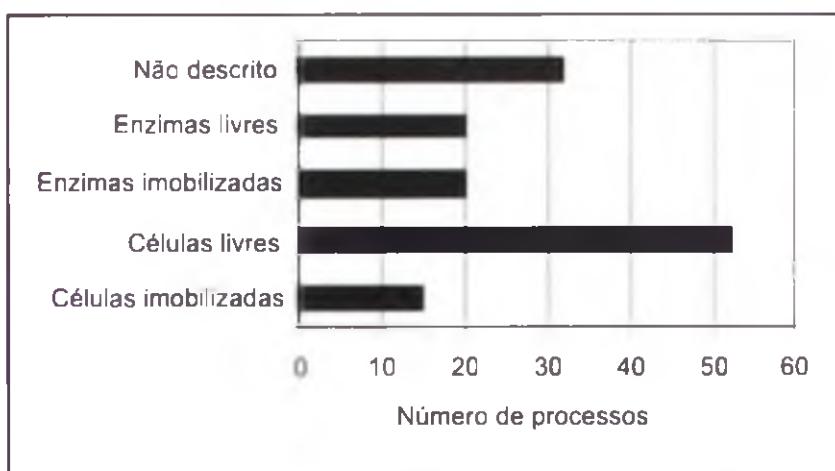


FIGURA 4. Forma de utilização do biocatalisador na indústria química (Straathof *et al.*, 2002).

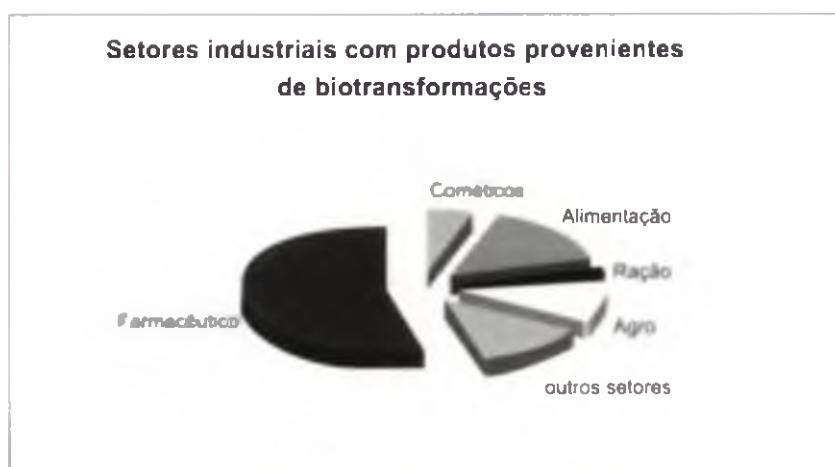


FIGURA 5. Setores industriais que aplicam biocatálise na obtenção de produtos (Straathof *et al.*, 2002).

biocatalisados, quando comparados aos processos químicos tradicionais e aos processos microbianos, está exemplificada na Figura 6, que compara esses três processos para a produção de acrilamida.

A Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) organizou em 2000 uma reunião em Paris para discutir o papel da biotecnologia na sustentabilidade do desenvolvimento industrial. Esta organização possui duas importantes publicações: Biotecnologia para produtos e processos limpos e Aplicação da Biotecnologia para sustentabilidade industrial (www.oecd.org/bookshop). Nestas duas publicações, vários aspectos da biotecnologia industrial são discutidos, sendo apresentadas avaliações atuais e futuras da implementação de novos bioprocessos. Abaixo, são apresentados alguns casos interessantes:

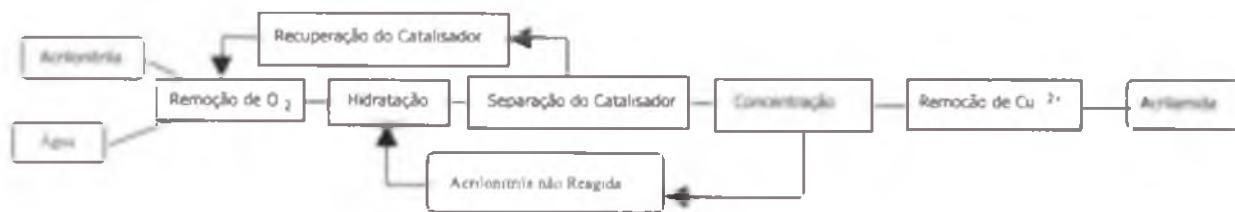
Caso 1: Produção de acrilamida (Mitsubishi Rayon, Japão).

- O uso do processo enzimático para a produção deste *commodity* reduziu significativamente a produção de resíduos, em função da alta seletividade inerente aos processos enzimáticos.
- Houve diminuição do consumo de energia (1,9 MJ/kg no processo antigo contra 0,4 MJ/kg para o processo enzimático).

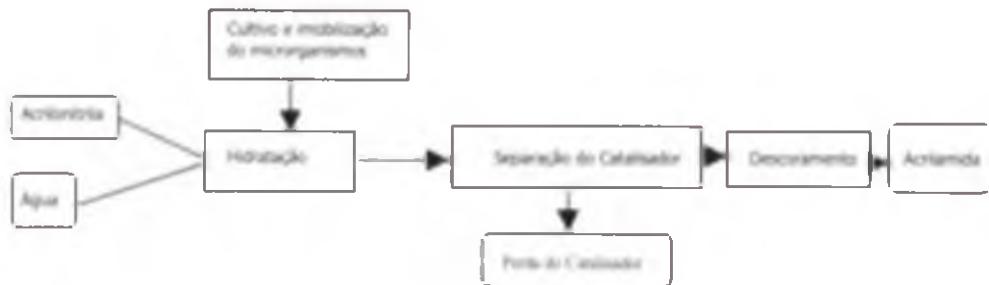
maioria utiliza células livres como agente catalítico (Figura 4). Muitos processos não descrevem detalhes de utilização dos biocatalisadores e quase a mesma quantidade de processos são conduzidos com enzimas livres ou imobilizadas. Menos de 20 processos utilizam células imobilizadas.

Na Figura 5 estão apresentados setores industriais com produtos provenientes de processos biocatalisados. Neste aspecto, a indústria farmacêutica recebe grande destaque, seguida pela indústria de alimentos, agroindústria e cosmético. Entre os processos biocatalisados, já pode ser relatada a produção de *commodities* como a acrilamida (OGAWA & SHIMIZU, 1999; WANDREY *et al.*, 2000). As vantagens técnicas e econômicas, relacionadas anteriormente, vinculados aos processos

(A) Processo catalisado por cobre



(B) Processo Microbiano



(C) Processo Enzimático

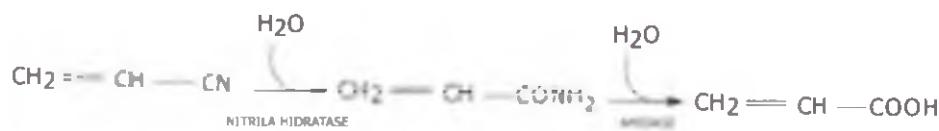


FIGURA 6. Comparação entre os três processos para a produção de acrilamida. (A) Catálise metálica, (B) Transformação por via microbiana. (C) Catálise enzimática (Ogawa & Shimizu, 1999).

- Ocorreu redução das emissões de CO₂. O processo antigo produzia 1,5 kg CO₂/kg de produto enquanto o enzimático produz 0,3 kg CO₂/kg de produto.

Caso 2: Produção de vitamina B2 (Hoffman La-Roche, Alemanha).

- A utilização de um microrganismo geneticamente modificado substituiu um processo químico constituído de várias etapas.
- A disposição final de resíduos perigosos foi reduzida significativamente.
- Os efluentes líquidos foram reduzidos em 66%.
- As emissões gasosas foram reduzidas em 50%.
- O custo do processo foi reduzido em 50%.

Caso 3: Produção do antibiótico 7-amino cefalosporan (Bichemie, Alemanha).

- A síntese química foi substituída por processo biológico.
- A rota química utilizava solventes clorados e produtos químicos perigosos.

- O processo biológico utiliza reagentes não tóxicos.
- Houve uma redução na emissão de gases, efluentes líquidos e disposição final de resíduos sólidos.

Caso 4: Produção do antibiótico cefalexina (DSM, Holanda).

- Substituição da síntese química pelo processo biológico.
- O processo químico produzia 30-40 kg de resíduo por kg de produto.
- O processo biológico eliminou a necessidade de uso do cloreto de metileno como solvente de síntese.
- Houve diminuição significativa de geração de resíduos e emissão de gases.

Caso 5: Síntese de poliéster (Baxeden, Inglaterra).

- O processo químico utilizava titânio como catalisador a 200°C.
- O processo enzimático é energeticamente mais eficiente.
- O novo processo eliminou a necessidade de utilização de solventes orgânicos e ácidos inorgânicos.
- Ocorreram de forma concomitante ganhos ambientais e na qualidade do produto.

Caso 6: Remoção de resíduos da indústria têxtil (Windel, Alemanha).

- A eliminação do peróxido de hidrogênio usado como alvejante de tecidos requer sucessivos ciclos de lavagem. O uso da catalase elimina estas etapas.
- Redução nos custos de produção.
- Redução do consumo de energia em 14%.
- Redução no consumo de água em 18%.

Caso 7: Processamento de polpa de madeira (Leykam, Áustria).

- No processamento tradicional, a madeira é aquecida na presença de alguns agentes químicos para a obtenção da polpa.
- A biopolpação (tratamento da madeira com fungo) usa as enzimas fúngicas para degradar seletivamente a lignina.
- Se a etapa posterior é o tratamento mecânico, verifica-se uma redução de 30 -40% nos gastos energéticos.
- Se a etapa posterior é o tratamento químico, verifica-se uma redução nos gastos de cloro para clareamento da polpa. Isto ocorre devido a uma eficiente remoção da lignina, 30% a mais se comparado ao processo tradicional.
- Redução dos gastos de energia e no consumo de produtos químicos.

Caso 8: Processamento de zinco (Budel Zinc, Holanda).

- Nos processos tradicionais, o efluente possui metais pesados, ácido sulfúrico e gipsita.
- O novo processo biológico empregado foi desenvolvido utilizando bactérias redutoras de sulfato.
- Este processo permite que o zinco e o sulfato sejam convertidos em sulfeto de zinco, que pode ser reciclado.
- Como resultado, verifica-se a não produção de gipsita, a qualidade da água foi melhorada e o zinco pode ser reciclado, observando-se ganhos ambientais e no custo da produção.

Caso 9: Produção de biopolímero (Cargill Dow, Estados Unidos).

- A produção de ácido polilático (PLA) a partir de açúcar de milho substitui os processos tradicionais de produção de plástico, onde o petróleo é a matéria-prima.
- PLA pode substituir o polietileno tereftalato (PET), polyesters e poliestirenos.
- PLA é compostável.
- No futuro, o PLA será feito a partir da utilização de material ligno-celulósico.

4. Principais enzimas em síntese orgânica

Três principais motivos têm chamado atenção dos químicos orgânicos para utilização de enzimas como catalisadores em síntese:

- as enzimas são capazes promover reações químicas de interesse em condições brandas de pH, temperatura e pressão;
- as enzimas são catalisadores quirais, assim sendo, são capazes de produzir moléculas opticamente ativas;
- os biocatalisadores podem mediar transformações muito difíceis de serem obtidas através da química orgânica tradicional.

Conseqüentemente, o emprego da biocatálise em química orgânica minimiza gastos energéticos relacionados aos processos, permite o desenvolvimento de processos mais eficientes e minimiza o impacto ambiental causado por este ramo industrial (ADAM *et al.*, 1999; KOLLER & WONG, 2001). Em decorrência dos aspectos expostos, pode-se concluir que os processos que empregam biocatalisadores são tecnologias limpas, cujo desenvolvimento está muito favorecido atualmente. O avanço destas tecnologias, também chamadas de “tecnologias verdes”, é ferramenta importante para o crescimento econômico e tecnológico, fornecendo subsídios para a implementação de políticas de desenvolvimento sustentável. A Tabela 2 mostra enzimas freqüentemente utilizadas em síntese orgânica e a Tabela 3 reúne alguns exemplos de empresas que utilizam processos

TABELA 2. Enzimas freqüentemente utilizadas em síntese orgânica (Koeller & Wong, 2001; Adam *et al.*, 1999).

Enzimas	Reações catalisadas
Lipases, esterases	Hidrólise de ésteres
Amidases (proteases, acilases)	Hidrólise de amidas
Desidrogenases	Oxirredução de álcoois e cetonas
Oxigenases (mono e di-oxigenases)	Oxidação
Peroxidases	Oxidação, epoxidação, halogenação
Quinases	Fosforilação (dependente de ATP)
Aldolases, transacetolases	Reação de aldol (C-C)
Glicosidases, glicosiltransferases	Formação de ligação glicosídica
Fosforilases, fosfatases	Formação e hidrólise de fosfato
Sulfotransferase	Formação de éster sulfato
Transaminases	Síntese de aminoácidos
Hidrolases	Hidrólise
Isomerase, liase, hidratase	Isomerização, adição, eliminação, substituição

TABELA 3. Alguns exemplos de processos industriais que utilizam enzimas livres de células como catalisadores.

Empresa	Enzima	Produto	Aplicação	Referência
BASF Alemanha	oxidase	Ácido (R) 2-fenilpropioníco	Intermediário na produção de herbicida	Dingler <i>et al.</i> , (1996)
BASF Alemanha	D-aminoácido oxidase	Ácido α -ceto-adipil-7-aminocefalosporínico	Precursor de fármaco	Tanaka <i>et al.</i> , (1993)
LILLY Estados Unidos	Desidrogenase	(S)-(2,3-metilenodioxyfenil)-2-propanol	Precursor de fármaco	Anderson <i>et al.</i> , (1995)
BASF Alemanha	Lipase	(S)-1-feniletilamina	Intermediário quiral	Balkenhohl. (1997)
MITSUBISHI Japão	Nitrila hidratase	Acrilamida (10.000 toneladas/ano)	Monômero na síntese de poliacrilamidas	Shimizu <i>et al.</i> , (1997)
GLAXO WELLCOME Grã-Bretanha	Epimerase e aldolase	Ácido N-acetyl-neuramínico	Precursor de drogas	Mahmoudian, (1997)

biocatalisados nas suas linhas de produção. As enzimas utilizadas, assim como os produtos e suas aplicações, estão também apresentados.

5. Biocatálise ambiental

Conforme apresentado e amplamente discutido no início deste capítulo, os processos biocatalisados apresentam várias vantagens ambientais diretas e indiretas,

podendo estes também ser utilizados para o tratamento de resíduos e efluentes industriais. O uso de enzimas no tratamento de efluentes foi primeiramente proposto nos anos 30 do século passado (Grumman Aerospace Corp., 1970; *apud* DUNFORD, 1999). Entretanto, o conceito da utilização de enzimas para a destruição de poluentes-alvo só foi desenvolvido 40 anos após. Um aspecto importante do uso de enzimas na degradação de poluentes consiste na sua seletividade e eficiência (AITKEN 1993; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2002).

Um grande número de enzimas de diferentes fontes vegetais e microbianas têm sido estudadas visando a sua aplicação em efluentes industriais. Peroxidases ou fenoloxidases podem agir em compostos recalcitrantes específicos promovendo a precipitação destas substâncias ou a sua transformação em compostos mais facilmente degradáveis pelos processos convencionais. Como exemplo, as tirosinases catalisam a hidroxilação de fenóis e desidrogenação de *o*-difenóis, resultando em excelentes níveis de remoção destes compostos. Na presença de mediadores tipo ABTS ou HBT, as lacases também promovem a degradação oxidativa dos fenóis. Já na ausência destes mediadores, as reações de polimerização são preferenciais. A imobilização destas enzimas em vários suportes tem sido tema de estudo de muitos grupos de pesquisa que têm verificado que a imobilização destas enzimas não compromete a sua eficiência. Além disso, o aumento da vida útil da enzima acarreta uma direta redução nos custos relacionados a sua aplicação no tratamento ou pré-tratamento de compostos recalcitrantes (DURÁN & ESPOSITO, 2000).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas nas duas últimas décadas com o objetivo de investigar novas possibilidades de aplicações de enzimas em catálise ambiental pelos motivos abaixo relacionados:

- A taxa de introdução de xenobióticos e recalcitrantes orgânicos no meio ambiente é muito elevada. Consequentemente, é cada vez mais difícil atender aos padrões de remoção destes contaminantes utilizando métodos químicos e biológicos tradicionais.
- Existe consenso de que as enzimas podem ser usadas para atingir poluentes-alvo.
- Avanços biotecnológicos relacionados, por exemplo, ao melhoramento genético de microrganismos produtores, têm permitido uma sensível diminuição do custo de produção de enzimas.

Sumarizando e de acordo com Karam & Nicell em 1997, são as seguintes as vantagens da aplicação de enzimas no tratamento de efluentes:

- aplicação a compostos biorefratários;
- utilização em altas e baixas concentrações de contaminantes;
- aplicação em um amplo intervalo de pH, temperatura e salinidade;
- ausência de choque por carga orgânica;
- ausência do período de aclimatação;
- ausência de geração de biomassa;
- menor tempo de retenção e maior facilidade de controle durante os processos.

TABELA 4. Alguns poluentes ambientais bastante comuns e possibilidades de tratamento enzimático (Aitken, 1993; Karam & Nicell, 1997).

Poluentes ambientais	Fontes poluidoras	Enzimas aplicáveis
Anilinas, fenóis, corantes, PCBs, PAHs	Indústrias químicas em geral: petróleo, plástico, textil, corantes	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxidases • Tirosinase • Lacase
Resíduos de papel e celulose	Indústria de papel e celulose	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxidases • Lacase • Celulases
Pesticidas	Atividade agrícola em geral	<ul style="list-style-type: none"> • Paration hidrolase ou fosfotriesterase • Peroxidases
Cianeto	Indústria química e farmacêutica, produção de intermediários químicos, fibras sintéticas, borracha	<ul style="list-style-type: none"> • Cianidase • Cianeto hidratase
Resíduos da indústria de alimentos	Laticínios, processamento de carnes, extratos vegetais e processamento de grãos	<ul style="list-style-type: none"> • Proteases • Amilases • Pectinesterase • Lactase • Quitinase • Pectinase • Lipase
Resíduos sólidos e lodo	Indústrias que descartam material celulósico e ligno-celulósico	<ul style="list-style-type: none"> • Ligninases • Lipase • Lisozima • Celulose
Metais pesados	Atividade industrial e de mineração	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatases

Na Tabela 4 estão apresentados alguns dos poluentes ambientais mais comuns e as enzimas aplicáveis na sua solução. É bastante interessante destacar o uso de oxidases, incluindo peroxidases, no tratamento de resíduos da indústria química e farmacêutica. Já as hidrolases são principalmente aplicadas ao tratamento de resíduos provenientes das indústrias de alimentos.

6. Considerações finais

O uso de biocatalisadores visando a produção de bens e serviços é um ramo da biotecnologia que tem permitido ganhos ambientais e econômicos. A biotecnologia, por definição, é a aplicação de conhecimento científico e dos princípios da engenharia no processamento de materiais utilizando agentes biológicos. A biotecnologia moderna conta com ferramentas poderosas, tais como: a engenharia genética, engenharia metabólica, bioeletrônica, nanobiotecnologia, engenharia de proteínas, obtenção de plantas e animais transgênicos, engenharia de órgãos e tecidos, ensaios imunológicos, genoma e proteoma, biosseparação, engenharia de biorreatores, entre outros. A reunião

de todas estas ciências e a aplicação dos conhecimentos gerados diminuem a nossa dependência por recursos e combustíveis não renováveis, previnem o aumento da poluição, aumentam a economia associada à produção e permitem a obtenção de muitos produtos novos e tradicionais (GAVRILESCU & CHISTI, 2005).

Referências

- ADAM, W.; LAZARUS, M.; SAHA-MÖLLER, C.R.; WEICHOOLD, O.; HOCH, U.; HÄRING, D.; SCHREIER, P. Biotransformations with peroxidases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v.63, p.73-108, 1999.
- AITKEN, M.D. Waste water applications of enzymes: opportunities and obstacles. *The Chemical Engineering Journal*, v.52, p.49-58, 1993.
- ANDERSON, B.; HANSEN, M.; HARKNESS, A.; HENRY, C.; VINZENZI, J.; ZMIJESWSKI, M. Application of practical biocatalytic reduction to an enantioselective synthesis of 5H-2, 3-benzodiazepine LY 300164. *Journal of American Chemical Society*. v.117, p.12358, 1995.
- AZEVEDO, W.D.; PLOEG, J.D.V.; LEISINGER, T.; KIENER, A.; HEINZMANN, K.; GILLIGAN, T. Process for the production of L-alaninol and gamma-glutamyl isopropylamide and a microorganism strain of genus *Pseudomonas*. World Patent application 1999, WO9907199A 19990218.
- BALKENHOHL, F.; DITRICH, K.; HAUER, B.; LADNER, W. Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation. *Journal für praktische Chemie*. v.339, p.381-384, 1997.
- BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*. v.13, p.338-344, 2002.
- BELICZEY, J.; KRAGL, U.; WANDREY, C.; COENEN, H.; HAMACHER, K.; TIERLING, T. Enzymatic synthesis of 3-fluorouraminic acid (5-acetamido-3,5-dideoxy-3-fluoro-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonic acid derivatives) and other 3,5-dideoxy-3-fluorononulopyranosonic acid derivatives. US Patent 1998, 09/156322.
- BOMMARIUS, A.S.; RIEBEL, B.R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Germany, 2004.
- BON, E.P.S.; PEREIRA JR., N. *Tecnologia Enzimática*, 1999.
- BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY, INC., RC-147U *Enzymes for Industrial Applications*, 25 Van Zant Street, Norwalk, EUA, 2004.
- BRUHN, H.; POHL, M.; MESCH, K.; KULA, M.R. Method for the production of acyloins, use of suitable pyruvate decarboxylase as well as its production and DNA sequence of the coding gene. German Patent Application, 1995, DE 195 23 269.
- DINGLER, C.; LADNER, W.; KREI, G.; COOPER, B.; HAUER, B. Preparation of (R)-2-(hydroxyphenoxy) propionic acid by biotransformation. *Pesticides Science*, v.46, p.33, 1996.
- DUNFORD, H.B. *Heme Peroxidases*. Wiley-VCH, Germany, 1999.
- DUNNWALD, T.; GREINER, L.; IDING, H.; LIESE, A.; MÜLLER, M.; POHL, M. Stereoselective synthesis of 2-hydroxyketone. German Patent Application, 1999, DE 199 18 935 8.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*. v.28, p.83-99, 2000.
- GAVRILESCU, A.; CHISTI, Y. Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, in press, 2005.
- GODFREY, T. The industrial enzymes market: A summary. Disponível em: http://www.biocatalysts.com/frames/biocatalysts_01, 1998.
- KOELLER, K.M.; WONG, C.H. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. v.409, p.232, 2001.
- KARAM, J.; NICELL, J. Potential application of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v.69, p.141-153, 1997.
- LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. *Industrial Biotransformation*. Wiley-VCH, Germany, 2000.
- MAISTER, P. (2001). Growing market for industrial enzymes. Disponível em: <http://atlanta.bizjournals.com/atlanta/stories/2001/03/19/focus7>
- MARRS, B.; DELAGRAVE, S.; MURPHY, D. Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, v.2 p.241-245, 1999.
- MAHMOUDIAN, M.; NOBLE, D.; DRAKE, C.; MIDDLETON, R.; MONTGOMERY, D.; PIERCEY, J.E.; RAMLAKHAN, D.; TODD, M.; DAWSON, M. An efficient process for production N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic aldolase. *Journal of Enzyme and Microbial Technology*, v.45, p.393, 1997.

- OGAWA, JUN; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.13-20, 1999.
- PANKE, S.; HELD, M.; WUBBOLTS, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.272-279, 2004.
- PERALTA-ZAMORA, P.; TIBURTIUS, E.R.L.; MORAES, S.G. Degradação enzimática de corantes têxteis. **Química Têxtil**, v.25, p.32-38, 2002.
- ROZZELL, J.D. Commercial scale biocatalysis: Myths and realities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7, p.2253-2261, 1999.
- SCHMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, WITHOLT, B. Industrial Biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v.409, p.258-268, 2001.
- SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK, J.B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.359-366, 2002.
- SHIMIZU, S.; KATAOKA, M.; KOBAYASHI, M. In: **New Enzymes for Organic Synthesis**; SCHEPER, T. Springer: New York, 1997; 45.
- STRAATHOF, A.J.J.; PANKE, S.; SCHIMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.548-556, 2002.
- TANAKA, A.; TOSA, T.; KOBAYASHI, T. **Industrial application of immobilized biocatalysts**, Marcel Dekker, New York, 1993.
- WANDREY, C.; LIESE, C.; KIHUMBU, D. Industrial biocatalysis: Past, present and future. **Organic Process Research & Development**, v.4, p.286-290, 2000.

*Estratégias de Isolamento de
Microrganismos Envolvidos na
Degradação de Xenobióticos*

Itamar Soares de Melo e João Lúcio de Azevedo



Foto: J.S. Melo

I. Introdução

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

Os estudos relativos às enzimas envolvidas no processo de biodegradação auxiliam a estabelecer correlações sobre estrutura-biodegradabilidade. Também, o isolamento pode explicar que tipo de degradação pode estar ocorrendo no ambiente, se catabólica (mineralização) ou cometabólica. Na mineralização, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores, que posteriormente serão metabolizadas por reações que geram energia. Conseqüentemente, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e a concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana. A mineralização significa que a molécula é degradada completamente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal como: CO₂, CO, H₂O, NH₃, H₂S, HCl. É, portanto, o único meio de eliminar um composto xenobiótico do ambiente. Em alguns casos, uma porção da molécula pode ser degradada e outra porção pode se acumular no solo. Por outro lado, no cometabolismo, não há nenhum dispêndio de energia. Em geral, alta persistência no ambiente ocorre com pesticidas degradados por processos cometabólicos. No cometabolismo, o crescimento microbiano requer a presença de um outro substrato, isto é, um substrato secundário é requerido como fonte de carbono e energia. Desta forma, os microrganismos podem transformar a molécula sem dela retirar energia para o seu desenvolvimento.

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

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

2. Estratégias de isolamento

Antes de passarmos a discorrer sobre as etapas de isolamento de microrganismos é fundamental um amplo conhecimento sobre metabolismo microbiano,

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

Termo Usual	Metabolismo	Cometabolismo
Principal suporte para o crescimento	Pesticidas	Outros substratos
Número de pesticidas de interesse	Poucos	Muito
Fontes de carbono energia	Baixas quantidades mas específicas	As vezes grandes quantidades mas alta competição com os demais microrganismo
Microflora envolvida	Poucas linhagens bacterianas específicas	Freqüentemente organismos omnívoros como os fungos
Principal problema agrícola	Adaptação à degradação após suplementação microbiana	Persistência accidental excessiva
Principal problema ambiental	Mobilidade	Excesso de pesticida ou persistência de metabólito e mobilidade

já que as tecnologias de biorremediação estão respaldadas na exploração do metabolismo microbiano que catalisam reações bioquímicas.

A biodegradação de um composto pode ser estudada de diversas maneiras. Uma delas é avaliar a atividade metabólica e dissipação do xenobiótico em condições ambientais bem definidas, sem, contudo, levar em consideração a comunidade microbiana envolvida no processo. Em contraste, colônias isoladas são usadas para identificar vias metabólicas específicas, enzimas envolvidas na transformação de moléculas e os mecanismos de controle genético.

Os processos envolvidos incluem: níveis de concentração do contaminante, metabolismo simultâneo de vários compostos, e degradação seqüencial de misturas químicas de enzimas não-específicas. Desse modo, sob condições favoráveis, microrganismos catalizam substratos complexos, fornecendo à célula C e energia. Segundo Atlas & Bartha (1981), as taxas de crescimento microbiano são, parcialmente, uma função das concentrações do substrato e da diversidade do substrato. Por exemplo, se o ambiente contém grandes quantidades de material prontamente degradável, não-tóxico, repressão catabólica pode ocorrer e por conseqüência a degradação também. Noutras circunstâncias, materiais prontamente biodegradáveis podem ser menos disponíveis e a repressão catabólica poderá ser reprimida. Em concentrações muito baixas do substrato, as taxas de crescimento microbiano tendem a ser mínima, mantendo-se o limite mínimo necessário para o metabolismo.¹

Muitos contaminantes são encontrados em concentrações extremamente baixas, as vezes, da ordem de ppb (parte por bilhão). Contudo, pode ser possível um organismo metabolizar contaminantes presentes em baixas concentrações se a população microbiana for suportada por um outro composto presente em concentrações adequadas. Por outro lado, é sabido que quando presente em altas concentrações, qualquer composto pode ser tóxico (KUNC & RYBAROVA, 1983).¹

Para propósito de biorremediação é interessante que o xenobiótico seja usado como fonte de carbono e energia para a microrganismo, que por sua vez induz à

síntese de enzimas apropriadas. Estas são, via de regra, altamente específicas, e outras não, isto é, uma dada enzima pode exibir atividade catalítica contra um análogo estrutural do composto alvo que, presumivelmente, fornece pressão seletiva para sua evolução. Mais adiante, neste capítulo, serão abordados ensaios para a seleção de microrganismos produtores de enzimas envolvidas na degradação de xenobióticos.

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

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

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

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

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

O solo, contudo, permanece como o mais importante reservatório para o isolamento de microrganismos. A comunidade microbiana, o número e tipos de microrganismos presentes num solo em particular, são muito influenciados pela localização geográfica, temperatura, textura e estrutura, pH, conteúdo de matéria orgânica, cultivo, aeração e umidade. Por exemplo, as actinobactérias são encontradas em pequeno número em solos alagados com baixa tensão de oxigênio. Solos de florestas contêm uma predominância de *Streptomyces* que são tolerantes à acidez

(DAVIS & WILLIAMS, 1970), enquanto solos ácidos e solos alcalinos podem conter menor número de *Streptomyces* e maior número de *Actinoplanes* e *Streptosporangium*.

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

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

Sendo os xenobióticos substâncias orgânicas sintéticas, e, portanto, estranhas ao ambiente, eles são difíceis de serem degradados pelos microrganismos que evoluíram e adquiriram mecanismos genéticos para o catabolismo e reciclagem de produtos biossintéticos. Desse modo, a procura de microrganismos degradadores pode ser dirigida àqueles locais com problemas detectados de contaminação ou de uso intensivo de pesticidas. Porém, o insucesso no isolamento do microrganismo ideal pode estar relacionado à recalcitrância da molécula em estudo, fato este que incrementa ainda mais os problemas de poluição ambiental.

2.1 Coleta de amostras de solo

Quando o objetivo da coleta é somente o isolamento de microrganismos úteis com potencial para degradação, não é necessário, em geral, proceder à coleta de amostras representativas da área em estudo. Procede-se, nesse caso, à coleta diretamente daquele local, tomando-se o cuidado de coletar pequenas sub-amostras, misturá-las e homogeneizá-las. Informações adicionais da área amostrada, tais como: tipo de solo, horizonte do solo, devem ser obtidas para referências futuras. Do mesmo modo, o transporte e armazenamento dessas amostras requerem alguns cuidados, podendo-se manter o solo à temperatura ambiente por vários meses antes do

isolamento. No entanto, as condições de armazenamento podem induzir mudanças nas populações microbianas chegando, sob condições extremas, a matar microrganismos úteis. O ideal seria manter as amostras de solo no laboratório conservando as mesmas características físicas, químicas e biológicas, tais como aquelas encontradas *in situ*. Isso é quase impossível e, assim, recomenda-se proceder ao isolamento imediatamente após as coletas ou poucos dias depois. É aconselhável, portanto, evitar o armazenamento de amostras de solo se os objetivos foram de avaliar a atividade enzimática e contagem de microrganismos. A secagem do solo durante o armazenamento resulta no aumento da acidez do solo, redução de Mn e aumento da solubilidade e oxidação da matéria orgânica (BARTLETT & JAMES, 1980).

Há evidências de mudanças na população microbiana dentro de poucas horas da amostragem e, portanto, as amostras deveriam ser analisadas dentro de, aproximadamente, 6 horas após a coleta (JENSEN, 1968). É, pois, questionável se solo armazenado mesmo em condições consideradas ótimas mantém suas propriedades. Estudos de Stotzky *et al.* (1962) mostraram que o número de microrganismos, excetuando-se actinobactérias, diminuiu após três meses de armazenamento. Já Wollum (1994), verificou que o armazenamento do solo por um período de 7 a 21 dias não alterou显著mente algumas propriedades fundamentais, tais como biomassa total, contagem de grupos microbianos específicos, N disponível e atividades enzimáticas. Desse modo, verifica-se que o armazenamento do solo a 4°C por um período curto, de até 3 semanas, no escuro, pode ser aceitável. Para minimizar as variações na aeração e conteúdo de umidade das amostras é preferível coletar grandes blocos de solo e subdividi-los em pequenas sub-amostras imediatamente antes do uso. Já para amostras de solo que serão utilizadas para análises químicas é mais satisfatório, em geral, congelar ou secar as amostras imediatamente. No entanto, há exceções como, por exemplo, no caso de análise de nitrito, em que a secagem não é recomendada. Para análise de nitrato, o solo deveria ser seco dentro de um período de 24 horas, do contrário, o nível de nitrato é aumentado durante o processo de secagem (PAUL & CLARK, 1989).

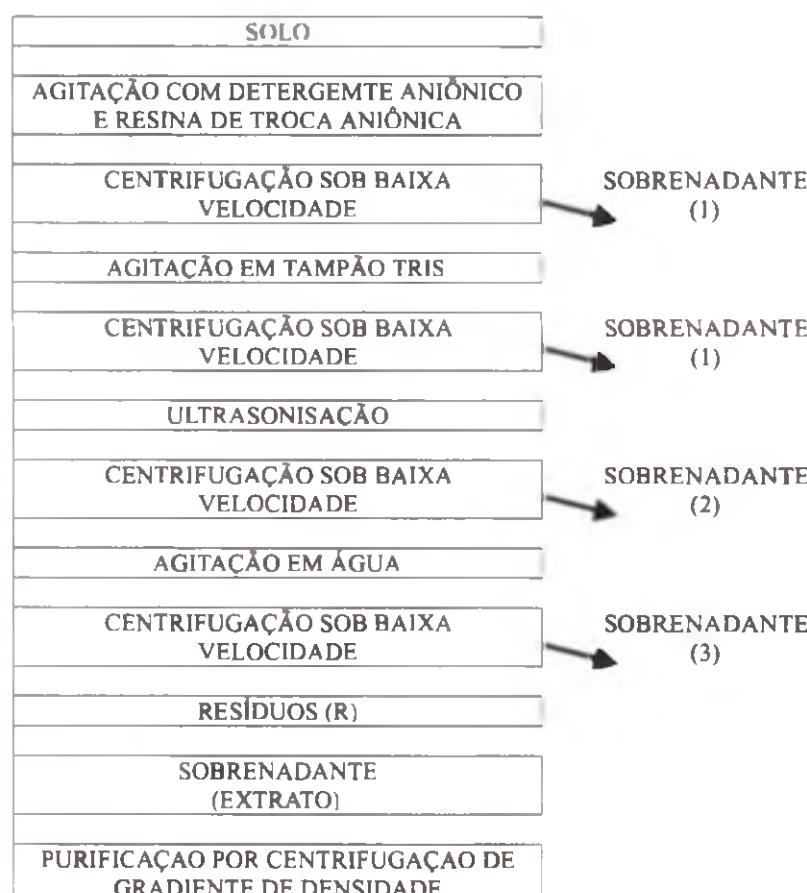
É comum acondicionar as amostras no laboratório em sacos de polietileno, os quais permitem uma razoável aeração. Para manter a umidade, estes sacos podem ser selados com outro saco, contendo algumas gotas de água (CASIDA *et al.*, 1964).

Quando o objetivo da coleta também inclui estudos sobre dinâmica de populações, biomassa de microrganismos e enumeração de microrganismos degradadores, é essencial que os procedimentos de amostragem sejam planejados a fim de que os erros de amostragem sejam minimizados. No mínimo, mais de duas amostras deveriam ser tomadas a partir de uma área e analisadas separadamente para evitar qualquer erro ocasionado pela variabilidade. Várias pequenas sub-amostras de um local são preferíveis a uma grande amostra de solo. A umidade do solo deveria ser muito homogênea. Quando a área em estudo é heterogênea, com horizontes de solos distintos, aconselha-se subdividi-la em unidades menores, mais homogêneas e analisá-las separadamente. Na impossibilidade de se processar amostras de solos trazidas do campo, é recomendado que todas as amostras sejam pré-incubadas por 5 – 7 dias em condições de laboratório antes da análise. Essa prática atenua alguns dos distúrbios associados com a amostragem, mas, no entanto, permite mensuração de situações dinâmicas.

Via de regra, amostras deveriam ser coletadas nos primeiros 5¹⁰ cm do perfil do solo, já que é nesta profundidade que tem lugar a maior atividade microbiana. Se na área amostra da não se encontrar um grande número de microrganismos, pode-se recorrer ao isolamento a partir de solo rizosférico ou de raízes. É nesta zona que ocorre a maior atividade microbiana. Ademais, há preferência de certos microrganismos pelas raízes de plantas. Bactérias, em geral, são colonizadoras de raízes e são capazes de utilizar glucose, alanina, acetato etc.

Solos secos ao ar e homogeneizados devem ser peneirados através de uma peneira de 2 mm de malha. Peneiramento do solo é indicado para remover restos de material vegetal, grandes torrões de terra, pedra, diminuindo a heterogeneidade da amostra. Amostras de solo pequenas (20 gr) são preferidas devido à economia de coleta, espaço e armazenamento, mas, aumenta-se a variância da amostra, quando comparado com amostras maiores. Amostras de 50 gramas, obtidas a partir de sub-amostras compostas bem misturadas são indicadas. Uma porção do solo (1-10 g) é diluída em solução salina (0,85%) ou tampão Tris e agitada por alguns minutos, a 100-150 rpm. Uma leve agitação da mistura (solo + sol. tampão), realizada em um banho-maria ultrasônico, de baixa energia, pode ser usada para liberar microrganismos de partículas de solo.

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



Para facilitar a liberação de microrganismos durante a agitação, Mac-Donald (1986) usou uma resina quelante de troca iônica e um detergente aniónico para querlar cátions di e polivalentes que causam flocação e evitar as interações adesivas entre as partículas do solo.

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

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

Existem técnicas especiais para recuperação de fungos não-esporulantes do solo. Geralmente as hifas tendem a aderir às partículas mais pesadas no solo e, nesse caso, a semeadura de 5 a 10 mg de solo diretamente na superfície do meio de cultura solidificado pode resultar em maior número de colônias.

2.2 Meios de cultivo e seleção de colônias

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

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

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

A seleção de microrganismos em meio de cultivo requer muita habilidade por parte do técnico, no sentido de distinguir colônias de degradadoras daquelas oligocarbofílicas acidentais. Os meios de cultura para isolamento geralmente são compostos de uma solução de sais minerais suplementada com o composto xenobiótico em estudo, que é usado, via de regra, como fonte de carbono. Em alguns casos, a identificação de colônias de degradadoras pode ser melhor visualizada através de talos ao redor das colônias. Em meio para isolamento de celulolíticos é adicionado

carboximetilcelulose, cuja hidrólise é visualizada por meio de uma zona clara ao redor das colônias, após inundar as placas com solução aquosa de 1% de brometo de amônio hexadeciltrimetil (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977). Para isolamento de quitinolíticos, por exemplo, Hsu & Lockwood (1975), empregaram um meio mineral suplementado com quitina coloidal.

Um diagnóstico rápido para identificar biodegradadores é observar a mudança de cor do meio de cultura, ou halo de degradação ao redor das colônias, em função do uso de indicadores ácido-base. A viragem é causada por um processo metabólico específico de linhagens degradadoras. Um exemplo ilustrativo pode ser apresentado com o herbicida atrazina, onde usa-se o indicador vermelho de bromocresol em um meio de sais minerais com 2,4-D como única fonte de carbono e extrato de levedura como fator de crescimento (SANDMAN & LOOS, 1984). A oxidação microbiana do 2,4-D resulta na produção de HCl, que muda a cor do meio de vermelho (pH 7.0) para amarelo (pH 5.2). Desse modo, esse ou outros indicadores ácido-base como: azul de bromotimol e eosina-azul de metíleno, incorporados ao meio de cultura, podem ser usados para isolamento de microrganismos degradadores de pesticidas organoclorados. Utilizando reagentes indicadores, Bordeleau & Bartha (1969) isolaram microrganismos do solo que cometabolizam anitinas substituídas e azobenzenos. Os autores recorreram ao uso de p-anisidina ou p-anisidina-H₂O, que foram pulverizadas sobre as colônias desenvolvidas em meio de cultura não seletivo após incubação das mesmas. A condensação oxidativa da p-anisidina é detectada através da descoloração marrom-avermelhada das colônias. O uso de indicadores em meio de cultura facilita e agiliza a seleção de um número considerável de microrganismos degradadores, ao mesmo tempo em que simplifica as determinações através do número mais provável de microrganismos degradadores e evita as quantificações futuras de centenas de prováveis microrganismos via cromatografia.

Em muitos casos, o próprio xenobiótico, usado no meio de cultura sólido, é usado para indicar e identificar colônias de degradadores. Isolamento de *Pseudomonas* sp. degradadoras do herbicida atrazina foi feito em um meio de cultivo sólido contendo sais minerais e 0,1% de citrato de sódio como fonte de carbono e atrazina (100 ppm) como única fonte de nitrogênio (MANDELBAUMET *et al.*, 1995). Como o meio contendo atrazina torna-se opaco como resultado de partículas finas, é possível visualizar zonas claras ao redor de colônias degradadoras. Outros substratos xenobióticos podem ser testados a despeito do objetivo de trabalho em estudo, no sentido de facilitar a etapa laboriosa de seleção de potenciais agentes degradadores.

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

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

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

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

Na segunda etapa, 50 µL de cada uma das 10 culturas com bom crescimento foram adicionados a 5 mL do segundo meio de seleção (1,5% de extrato de solo de jardim fervido e filtrado foi adicionado ao primeiro meio de seleção) contendo 2 mL de tolueno. Essas subculturas foram incubadas aerobicamente à temperatura ambiente por 4 dias. 50 mL de cultura foram então vertidos no segundo meio de seleção, contendo 1,5 de ágar. O ágar, vertido sobre as culturas, apresentava uma fina camada de 2 mm de tolueno. Com esse procedimento, os autores isolaram 26 linhagens de microrganismos tolerantes a tolueno.

O isolamento de microrganismos capazes de degradarem polímeros tem sido possível em laboratório. Os polímeros estão entre os compostos orgânicos mais recalcitrantes. Todavia, muitos deles, incluindo nylon, borracha vulcanizada, muitos plásticos e corantes poliméricos são suscetíveis ao ataque microbiana sob condições apropriadas. O biodegradação de corantes poliméricos, por exemplo, está relacionada ao sistema de degradação de lignina por muitos fungos. Assim, muitos fungos, principalmente os basidiomicetos, têm sido usados com sucesso para descoloração de corantes da indústria têxtil. Enzimas envolvidas no processo de degradação de muitos corantes, como, por exemplo, Poly B-411, Poly R-478 e Remazol Brilliant Blue-R. pertencem ao sistema ligninolítico (Os capítulos 13, 14 e 16 tratam com maior profundidade sobre as enzimas envolvidos nesse processo).



FIGURA 2. Visualização da descoloração do corante remazol pelo fungo *Ganoderma* sp.

A seleção de um grande número de isolados fúngicos capazes de degradar corantes poliméricos pode ser

avaliada diretamente em placas de petri contendo meio de cultivo contendo o corante. Fungos que apresentam o sistema enzimático inespecífico atuando na degradação do corante formam halo visível de descoloração (Figura 2).

2.3 Avaliação da atividade enzimática

A presença de diversas enzimas microbianas, incluindo as pirocatecates e peroxidases, envolvidas na quebra de muitos compostos orgânicos sintéticos tem sido usado como indicador de degradação. As peroxidases, [lignina-peroxidase(LiP) e manganês-peroxidase(MnP)], por exemplo, catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio. Podem ser dependentes, ou não, do manganês e estão envolvidas na degradação da lignina e muitos xenobióticos. A LiP catalisa reações de degradação da lignina e poluentes aromáticos na presença de H_2O_2 . Essas reações incluem oxidação do álcool benzílico, quebra de cadeias laterais, reações de abertura de anéis aromáticos, demetilações e descolorações oxidativas. Todas elas são compatíveis com o mecanismo envolvido na degradação não-específica desta enzima. A atividade de LiP é determinada pela oxidação do álcool veratrílico.

As MnPs participam de reações de despolimerização de cloroligninas, desmetilação de ligninas e branqueamento de polpa. Tanto a LiP como a MnP têm despertado interesse por causa dos possíveis aplicações para descontaminação de efluentes e de solo. A atividade do MnP é avaliada pelo vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio.

2.3.1 Fenol – Oxidase

A obtenção de microrganismos produtores de fenol-oxidases, enzimas envolvidas na degradação de substâncias fenólicas, pode ser feita em meio de cultivo sólido contendo ácido gálico. A seleção de linhagens produtoras é acompanhada por meio do halo de intensidade da cor marrom, característica da “reação de Bavendamm” que indica a presença de fenol-oxidases (NOBLE, 1965).

As fenoloxidases são sub-divididas em duas classes: tirosinases e lacases, ambas reagem com oxigênio, não necessitando, todavia, de co-fatores. São enzimas que têm menor finalidade com os substratos do que as hidrolases.

A maioria dos substratos usados *in vitro* para medir a atividade da fenol-oxidase não é adequada para uso em amostras ambientais por causa da baixa solubilidade ou por causa de necessidade de se medir a absorbância em espectrofotômetro. Os ensaios para determinação de fenol-oxidase envolvem a oxidação de L-3,4-dihidroxifenilanina (DOPA), que pode ser medido com ou sem a adição de peróxido de hidrogênio.

A lacase (bengenediol: oxigênio oxidoredutase), uma polifenoloxidase, catalisa a oxidação via transferência de elétrons de radicais fenóis por radicais fenoxila. A especificidade da enzima ao substrato, todavia, depende da origem da lacase. Assim, lacases produzidas por fungos diferentes podem oxidar diversos substratos, incluindo, corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, HAPs, organofosforados, dentre outros.

2.3.2 Pirocatecates

O metabolismo do catecol pode ocorrer tanto por clivagem entre os grupos hidroxida (clivagem orto ou intradiol), como por clivagem adjacente a um dos grupos hidroxida (clivagem meta ou extraadiol). Com relação à clivagem orto, algumas linhagens bacterianas que metalizam as cloroanilinas produzem altos níveis da enzima pirocatecase II, que atua na via metabólica da degradação das cloroanilinas. Por outro lado, a presença da enzima pirocatecase I está envolvida na degradação da anilina evidenciando a existência de duas enzimas isofuncionais que atuam clivando orto desses compostos aromáticos.

A avaliação de atividade da pirocatecates é baseada na formação do ácido cismucônico a partir da oxidação do catecol da metodologia de cultivo bacteriano, sonicação de celulas para extração introcelular e avaliação da pirocatecase podem ser encontrados em Scramin *et al.* (2003).

3. Biodegradação acelerada

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

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

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

Estratégias genéticas e bioquímicas para adaptação e biodegradação acelerada incluem indução enzimática, mudanças de população, mutação, transferência e rearranjo de material genético. Estes mecanismos isolados ou em combinação contribuem para uma mudança nas taxas de biodegradação, observadas depois que as comunidades microbianas naturais são expostas a novos substratos. Spain & Vanveld (1983) citam que, quando compostos xenobióticos são adicionados a concentrações

abaixo de 100 ppb (000 ng/mL), as taxas de degradação podem ser mil vezes superiores em populações que são pré-expostas ao composto. Um longo período de adaptação poderia acomodar mudanças genéticas como um mecanismo de adaptação microbiana.

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

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

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

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

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

Em geral, as falhas ou ineficiência advindas das aplicações de pesticidas para o controle fitossanitário têm sido atribuídas ao desenvolvimento de resistência dos organismos-alvo. Para muitos pesticidas, essas falhas são devidas à rápida degradação microbiana que se manifesta após aplicações continuadas do mesmo pesticida, cujo fenômeno é chamado de degradação acelerada, justamente porque tem-se verificado uma taxa mais rápida de degradação em campos agrícolas previamente tratados, do que em campos não tratados. Uma degradação acelerada por populações microbianas adaptadas tem resultado num reduzido controle de pragas (ROETH, 1986; FELSOT, 1989). Esse fenômeno tem sido verificado para muitos pesticidas suscetíveis à degradação acelerada (Tabela 2). Falha no controle de insetos por carbofuran foi verificada quando o composto foi previamente aplicado, por 2 a 4 anos (FELSOT *et al.*, 1981). O herbicida butilato é mineralizado mais rapidamente em solos que têm sido repetidamente tratados com este produto, do que em solos sem exposição prévia (SKIPPER *et al.*, 1986).

É possível também observar populações microbianas envolvidas na degradação acelerada com relação a um pesticida degradarem uma outra molécula estruturalmente similar. Esse fenômeno tem sido denominado de adaptação cruzada. Obrigawitch *et*

TABELA 2. Relação parcial de pesticidas suscetíveis à degradação acelerada.

Pesticidas	Referências
2,4-D	Audus (1949)
Carbofuran	Felsot <i>et al.</i> (1981) 1989
Iprodione, vinclozolin	Walker (1987)
Procimidone	Slade <i>et al.</i> (1992)
Diazinon	Forrest <i>et al.</i> (1981)
Fensulfotion	Read (1983)
Isfoenfós	Racke & Coats (1990)
Butilato	Skipper <i>et al.</i> (1986)
EPTC	Tal <i>et al.</i> (1982)
Atrazina	Assaf & Turco (1994)
Trialato	Cotterill & Owen (1989)
Carbendazim, benomil	Yarden <i>et al.</i> (1985)
Aldicarb	Suett & Jukes (1993)
Diphenamid	Avidov <i>et al.</i> (1990)
Isoticiamato de metila	Smelt <i>et al.</i> (1989)
Fenamifós	Davis <i>et al.</i> (1993)
Napropamide	Walker <i>et al.</i> (1996)

al. (1983) observaram que vernolato e butilato foram degradados mais rapidamente em solos com uma população microbiana adaptada ao EPTC, do que em um solo não exposto a este herbicida. Há casos, no entanto, em que a adaptação cruzada tem sido verificada com moléculas que não são estruturalmente similares. Por exemplo, populações microbianas de solos adaptadas ao herbicida trialato degradaram o herbicida EPTC em taxas aumentadas, mas também degradaram o inseticida carbofuran em taxas superiores (COTTERILL & OWEN, 1989).

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

4. Avaliação da biodegradação

Tradicionalmente, os estudos de biodegradação freqüentemente envolvem o enriquecimento de culturas, seguindo-se o isolamento de culturas puras de microrganismos capazes de crescerem no xenobiótico como única fonte de carbono e energia.

Os principais problemas associados com o enriquecimento convencional incluem: 1-isolados obtidos podem ou não ser importantes na degradação do xenobiótico em ambientes naturais pobres em nutrientes, porque a pressão de enriquecimento, submetida na fermentação das culturas a altas concentrações do compostos, está relacionada às máximas taxas de crescimento específico para os vários microrganismos; 2 – alguns xenobióticos podem empreender uma degradação parcial ou extensiva por cometabolismo e, portanto, a população microbiana ativa deverá requerer um substrato para crescimento; 3 – a degradação do xenobiótico pode requerer a interação complexa de vários membros de um consórcio microbiano que, freqüentemente, conduz à tentativas frustradas para se isolar culturas puras capazes de degradar o poluente; 4 – em níveis relativamente altos do xenobiótico, geralmente empregados para culturas enriquecidas, o xenobiótico e/ou seus produtos de transformação podem ser tóxicos aos microrganismos presentes no inóculo; e 5 – interfaces ambientais, alternando mudanças na aeração ou potencial redox do ambiente e/ou gradientes podem ser necessários para promover a biodegradação.

Quase sempre, nos estudos de biodegradação de muitas substâncias orgânicas avaliadas em condições de laboratório, se valia de concentrações químicas exageradamente superiores àquelas encontradas no campo. Portanto, uma extrapolação de resultados obtidos nessas condições pode não refletir a situação real sob condições naturais. Nesse sentido, é que o uso de radioisótopos, têm possibilitado as pesquisas sobre transformação com informações seguras sobre a mineralização e/ou cometabolismo em concentrações comumente encontradas em ambientes naturais. O isótopo ^{14}C possui meia-vida de 5770 anos, permitindo a sua utilização como traçador em experimentos de longa duração. Sua desintegração se dá através da emissão de partículas beta negativas de 156 Kev de energia.

A conversão do xenobiótico ^{14}C para $^{14}\text{CO}_2$ (mineralização) serve como um indicador de biodegradação. Atualmente, são utilizados alguns métodos de estudo para quantificação das taxas de mineralização. Em todos eles a substância química radiomarcada é incubada no solo, em frascos que são continuamente amostrados. Os dois sistemas mais usados são o frasco de cal sodada e frasco de Bartha–Prammer. O CO_2 é coletado em armadilhas especiais contendo KOH 0,2M ou NaOH 0,2M ou monoetanolamina pura ou diluída em água. O dióxido de carbono desprendido é medido por espectrometria de cintilação líquida. A molécula original e os metabólitos formados devem ser determinados frente a padrões, por meio de cromatografia. Maiores detalhes sobre avaliação da mineralização são encontrados em Monteiro (2000).

5. Considerações finais

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

O uso de microrganismos isolados tem a sua finalidade, em muitos casos, na biorremediação cujo objetivo é estimular o crescimento de microrganismos

indígenas ou introduzidos em áreas contaminadas e, assim, fornecer um contato direto entre microrganismos e contaminantes. Para alguns contaminantes orgânicos que podem ser usados como substratos primários, a biodegradação acelerada é mais fácil de ser alcançada. Esta, por sua vez, está ligada a constantes aplicações do mesmo ou de compostos estruturalmente similares no ambiente.

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

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

Referências

- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIOOVE, E.; YAROEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of the fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.O.; COATS, R. (Ed.). **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.113-127 (ACS Symposium Series, 426).
- ALEXANOER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. New York: Academic Press, 1994. 302p.
- ASSAF, N.A.; TURCO, R.F. Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. **Biodegradation**, v.5, p.29-35, 1994.
- AUDUS, L.J. The biological detoxification of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. **Plant and Soil**, v.2, p.31-36, 1949.
- AVIOOV, E.; AHARONSON, N.; KATAN, J. Involvement of soil microorganisms in the accelerated degradation of diphenid. **Weed Science**, v.38, p.186-193, 1990.
- BARLETT, R.; JAMES, B. Studying dried, stored soil samples - some pitfalls. **Soil Science Society of America Journal** v.44, p.721-724.
- BARTHA, R. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: LABAOA, O.P., ed. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**. McGraw Hill, 1990. p.283-307.
- BOROELEAU, M.; BARTHA, R. Rapid technique for enumeration and isolation of peroxidase-producing microorganisms. **Applied Microbiology**, v.18, p.274-275, 1969.
- BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, O.; AUST, S.O. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science**, v.228, p.1434-1436, 1985.
- CASIDA, L.E.; KLEIN, O.A.; SATORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v.98, p.371, 1964.
- COTTERIL, E.G.; OWEN, P.G. Enhanced degradation in soil of etri-allate and other carbamate pesticides following application of tri-allate. **Weed Research**, v.29, p.65-68, 1989.
- DAVIS, R.F.; JOHNSON, A.W.; WAUCHOPE, R.O. Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. **Journal of Nematology**, v.25, p.679-685, 1993.
- FELSOT, A.E.; MADDOX, J.V.; BRUCE, W. Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of carbofuran use. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.26, p.781-788, 1981.
- FELSOT, A.S. Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.453-476, 1989.

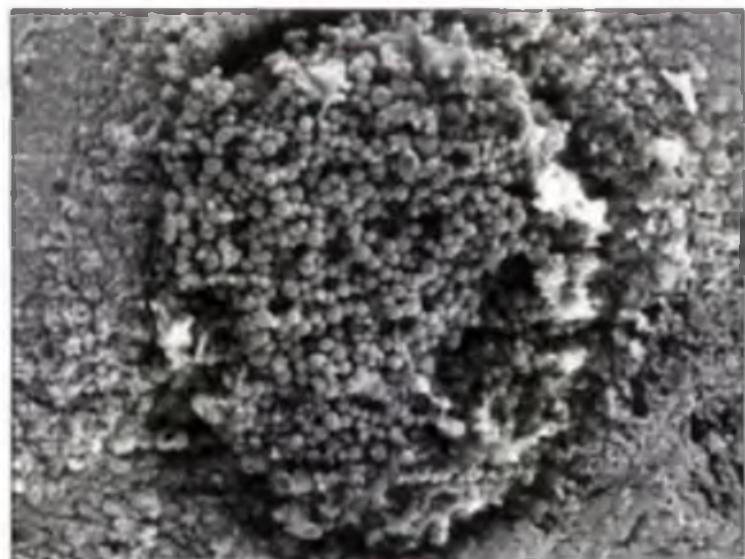
- FORREST, M.; LORO, K.A.; WAKER, N.; WOOVILLE, H.E. The influence of soil treatments on the bacterial degradation of diazinon and other organophosphorus insecticides. *Environmental Pollut Ser. A.*, v.24, p.93-104, 81.
- FOURNIER, J.C.; CATROUX, C.; CHARNAY, M.P.; GUNALAN. Behavior of soil microflora in pesticide degradation. In: MANSOUR, M. (Ed.) **Fate and prediction of environmental chemicals in soils, plants, and aquatic systems**. Boca Raton: Lewis, 1993. p.199-208.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect CX cellulose activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* v.98, n.1, p.109-115, 1977.
- HOPKINS, D.W.; MACNAUGHTON, S.J.; O'DONNELL, A.G.: A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.23, p.217-225, 1991.
- HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*, v.29, p.422-426, 1975.
- HSU, T.S.; BARTHA, R. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides diazion, parathion in the rhizosphere of the bush bean plant. *Applied and Environmental Microbiology*, v.37, p.36-41, 1979.
- JENSEN, V. The piare count technique. In: GREY, T.R.G.; PARKINSON, D. (Ed.). **The ecology of soil bacteria**. Liverpool: Liverpool University Press, 1968. p.158-170.
- KANAZAWA, S.; TAKESHIMA, S.; OHTA, K. Effects of waring blender treatment on the counts of soil microorganisms. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.32, p.81-89, 1986.
- LINKFIELD, T.G.; SUFLITA, J.M.; TIEDJE, M. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of halobenzoates. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p.2773-2778, 1989.
- Mac DONALD, R.M. Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms by elutriation. *Soil Biology and Biochemistry*, v.18, p.399-406, 1986.
- MANDELBAUM, R.T.; DEBORAH, L.A.; WACKETT, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-Triazine herbicide Atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.4, p.1451-1457, 1995.
- MELO, L.S.; SILVA, C.M.M.S. Ocorrência de resistência a benomil em linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Orthezia praelonga*. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, 1996, Foz-do-Iguaçu. p.447.
- MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação em Solos In: C.M.M.S. Silva, M.R.A. Roque e I.S. Melo (eds.) **Microbiologia Ambiental - Manual de Laboratório**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 98 p. (Documentos).
- MOORMAN, T.E. Adaptation of microorganisms in subsurface environment: significance to pesticide degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990. p.167-180 (ACS Symposium Series, 426).
- MUELLER, J.G.; SKIPPER, H.D.; KLINE, E.L. Loss of butylate utilizing ability by a *Flavobacterium*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.32, p.189-196, 1988.
- MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M., NEVES, M.e.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.341-356.
- NAKAJIMA, H.; KOBAYASHI, H.; AONO, R.; HORIKOSHI, K. Effective isolation and identification of toluene tolerant *Pseudomonas* strains. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, v.56, n.11, p.1872-1873, 1992.
- NOBLE, M.K. Identification of cultures of wood inhabiting hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*, v.43, p. 1097-1139, 1965.
- OAVIS, F.L.; WILLIAMS, S.T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. In: The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biochemistry*, v.2, p.227-238, 1970.
- OBRIGAWITCH, T.; MARTIN, A.R.; ROETH, F.W. The influence of temperature, moisture and prior EPTC application on the degradation of EPTC in soils. *Weed Science*, v.30, p.175-181, 1983.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1989. 275p.
- RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced biodegradation of insecticides in the midwestern corn soil. In: KACKE, K.D.; COATS, J.R. (Ed.), **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.68-81.
- READ, D.C. Enhanced microbial degradation of carbofuran and fensulphothion after repeated applications to acid mineral soil. *Agriculture Ecosystems and Environment*, v.10, p.37-46, 1983.

- REDDY, B.R.; SETHUNATHAN, N. Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.826-829, 1983.
- ROETH, F.W. Enhanced herbicide degradation in soil with repeat application. **Review of Weed Science**, v.2, p.45-65, 1986.
- SANDMANN, E.R.I.C.; LOOS, M.A. Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media: high populations associated with sugarcane. (*Saccharum officinarum*). **Chemosphere**, v.13, n.9, p.1073-1084, 1984.
- SKIPPER, H.D.; MURDOCK, E.C.; GOODEN, D.T.; ZUBLENA, J.P.; AMAKIRI, M.A. Enhanced herbicide biodegradation in South Carolina soils previously treated with butylate. **Weed Science**, v.34, p.558-563, 1986.
- SLADE, E.A.; FULLERTON, R.A.; STEWART, A.; YOUNG, G.H. Degradation of the dicarboximide fungicides iprodione, vinclozolin and procymidone in patimahoe clay loam soil New Zealand. **Pesticide Science**, v.35, p.427-438, 1992.
- SMELT, J.H.; CRUM, S.J.H.; TEUNISSEN, W. Accelerated transformation of the fumigant methyl isothiocyanate in soil after repeated application of metham-sodium. **Journal of Environmental Science and Health**, v.24, p.437-455, 1989.
- SPAIN, J.C.; VAN VELO, P.A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure. **Applied and Environmental Mycology**, v.45, n.2, p.428-435, 1983.
- STRICKLAND, T.C.; SOLLINS, P.; SCHIMEL, O.S.; KEARLE, E.A. Aggregation and aggregate stability in front and range soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.52, p.829-833, 1988.
- SUETI, O.L.; JUKES, A.A. Stability of accelerated degradation of soil applied insecticides: laboratory behaviour of aldicarb and carbofuran in relation to their efficacy against cabbage root fly in previously treated field soils. **Crop Protection**, v.12, p.431-442, 1993.
- TAL, A.; RUBIN, B.; KATAN, J.; AHARONSON, N. Fate of ¹⁴C-EPTC in a soil exhibiting accelerated degradation of carbamothioate herbicides and its control. **Weed Science**, v.37, p.434-439, 1989.
- TAM, A.C.; BEHKI, R.M.; KHAN, S.U. Isolation and characterization of an s-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate -degrading *Anthrobacter* strain and evidence for plasmid-associated s-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1088-1093, 1987.
- WALKER, A. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. **Pesticide Science**, v.21, p.219-231, 1987.
- WALKER, A.; WELCH, S.J.; ROBERTS, S.J. Induction and transfer of enhanced biodegradation of the herbicide napropamide in soils. **Pesticide Science**, v.47, p.131-135, 1996.
- WALTON, B.T.; ANOERSON, T.A. Plant-microbe treatment systems for toxic waste. **Current Opinion in Biotechnology**, v.3, p.267-270, 1992.
- WOLLUM, G.A. Soil sampling for microbiological analysis. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S. (Ed.). **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994, pt.2, p.2-13.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEM-YEPHET, Y. Oelayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**, v.75, p.763-767, 1985.

Biodegradação Anaeróbia

**Rosana Filomena Vazoller¹, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic² e
Juliana Calábria Araújo¹**

*Para Rosana Elda Gregori,
Pesquisadora pioneira sobre a
biodegradação anaeróbia de resíduos no Brasil.*



I. Introdução



Pasteur, 1822-1895

É inegável que os microrganismos anaeróbios atraem a curiosidade de cientistas e tecnólogos há dezenas de anos, sobretudo devido à sua importância na produção e deterioração de alimentos e bebidas, bem como na conversão da matéria orgânica poluente a metano e na geração de combustíveis como o álcool.

Desde os primórdios da ciência moderna, os estudos sobre transformações microbianas de compostos revelam que o metabolismo anaeróbio integra a gama de acontecimentos que resultou no nascimento da Microbiologia. Foi Louis Pasteur, então professor de Química da Universidade de Lille no norte da França, quem revelou a existência de células vivas capazes de mediar a conversão de açúcar em ácido lático. Em seu artigo de 1857, Pasteur afirmou que as células eram o fermento, e que a fermentação do açúcar era importante para as suas vidas. Assim, ele desenvolvia a teoria do germe, descobria a vida sem oxigênio e eliminava a teoria da geração espontânea, que durante séculos propunha que a vida poderia surgir espontaneamente a partir de matéria orgânica. Mais tarde, a frase atribuída a Pasteur “fermentação é a consequência de vida sem ar” viria resumir uma de suas principais descobertas, a existência do mundo sob anaerobiose (DARMON, 1995; DUBOS, 1998).

Em função dos estudos sobre a fermentação natural e dos tipos específicos de fermentação microbiana, foi inevitável a revolução nos processos químicos industriais, o que de certa forma marcou o início da Biotecnologia. Por sua vez, para a medicina, o reconhecimento da vida anaeróbia esclareceu o papel de germes causadores da septicemia e da gangrena e possibilitou o desenvolvimento de técnicas para eliminar agentes microbianos patogênicos, bem como controlar os mecanismos de contaminação (DARMON, 1995; DUBOS, 1998).

Desde o início do século XX, um número crescente de compostos derivados de reações anaeróbias tem sido produzido pela indústria química e/ou bioquímica. Porém, nos anos 50 e 60, a pesquisa sobre os processos metabólicos anaeróbios diminuiu, muito em função da expansão da Biologia Molecular no âmbito da microbiologia. Posteriormente, durante o período da crise energética, notadamente no início dos anos 70, vários cientistas redescobriram o metabolismo anaeróbio e seu potencial gerador de energia, e assim muitas investigações foram iniciadas ou retomadas sobre os processos anaeróbios de produção de combustíveis, como o álcool (metabolismo facultativo de leveduras), o hidrogênio (bactérias fotossintetizantes anoxigênicas) e o metano (arqueias metanogênicas). No mesmo período, a conscientização da sociedade em relação aos cuidados com o meio ambiente deu origem a discussão sobre os impactos das práticas da agricultura intensiva em solos férteis e na qualidade das águas, estimulando a pesquisa sobre o metabolismo da desnitrificação. Por conseguinte, consagrava-se

assim a ampliação de sistemas e processos anaeróbios no campo da Biotecnologia Energética e Ambiental (ZINDER, 1993; VAZOLLER, 1995b; WOLFE, 1999).

A história dos anaeróbios encerra ainda o ganho no desenvolvimento de técnicas apropriadas à manipulação dos grupos microbianos anaeróbios estritos no final dos anos 60 e início dos anos 70. O cultivo em laboratório das células anaeróbias mais exigentes pode requerer concentrações de oxigênio nos frascos da ordem de 10 moléculas por litro de meio, em outras palavras, potenciais de óxido-redução de -350 a -400mV. Tal restrição fomentou a busca de métodos de manipulação de culturas eficientes tanto na preparação como na manutenção física e química de meios reduzidos, levando ao desenvolvimento do sistema de distribuição simultânea de gases em frascos e tubos de ensaio, como descrito em Hungate (1969), Balch *et al.* (1979), da câmara anaeróbia (EDWARDS & MCBRIDE, 1975) e de vidraria especializada para impedir o acesso do oxigênio no sistema de cultivo (MILLER & WOLLIN, 1974; LJUNGDAHL & WIEGEL, 1986; VAZOLLER, 1995a; NAKAYAMA, 2005).

A otimização dos procedimentos para o cultivo dos anaeróbios, de maneira geral, possibilitou o isolamento de muitos exemplares microbianos, cujas características morfo-fisiológicas das células conduziram a estudos sobre a distinção de estruturas de parede e membrana, bem como de vias metabólicas peculiares dentre os procariontes. Certamente, essas constatações em muito estimularam os trabalhos conduzidos por Carl Woese e colaboradores no início dos anos 80, em direção a reclassificação dos seres vivos. Por conseguinte, três grandes Domínios foram definidos: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, a partir do estudo do RNAr 16S de organismos anaeróbios metanogênicos. Novamente, uma significativa explosão no conhecimento dos anaeróbios ocorreu e o progresso nessa área é atualmente muito rápido (OLSEN *et al.*, 1985; WOLFE, 1999; SCHÄFER *et al.*, 1999; HOWLAND, 2000).

Muito embora a compreensão de vários aspectos do metabolismo anaeróbio energético e de síntese celular seja atraente e de enorme interesse, o presente capítulo direcionará essencialmente seu conteúdo para descrever os processos metabólicos anaeróbios responsáveis pela degradação de compostos orgânicos sob metanogênese, bem como exemplificar algumas rotas metabólicas únicas no uso de compostos inorgânicos sob anaerobiose. Assim, o enfoque será apresentar a biodegradação anaeróbia como solução de problemas ambientais de poluição, através do emprego de processos biológicos comuns ao saneamento ambiental, como a biodigestão anaeróbia de resíduos, e apontar o emprego de microrganismos, sob anaerobiose, na biorremediação de compostos tóxicos.

Inicialmente, alguns tópicos gerais sobre ecologia microbiana e biodegradação anaeróbia serão apresentados, a fim de facilitar a compreensão entre os processos anaeróbios naturais e os tecnológicos. Apesar da relevância indiscutível dos microrganismos facultativos em várias áreas da ciência e tecnologia, especialmente para a Biotecnologia Energética no Brasil devido a produção do etanol, os processos fermentativos facultativos serão considerados de maneira sucinta apenas no escopo da Biotecnologia Anaeróbia aplicada ao meio ambiente.

2. Ecologia microbiana anaeróbia

"Study of obligate anaerobes continually provides that extra challenge for all procedures, but for some of us, challenge is what it is all about".

Ralph Wolfe, 1999.

Os microrganismos anaeróbios incluem espécies de procariôntes, bactérias e arqueias, bem como de eucariôntes como fungos e protozoários. São amplamente encontrados na natureza em ambientes com baixos potenciais de óxido-redução, como no interior de solos comuns aos diversos hemisférios, na rizosfera de plantas, nos sedimentos de mares, rios e lagos, em alagados, pântanos, mangues, habitats geotermais, mantas microbianas (microbial mats), assim como no trato gastrointestinal de animais ruminantes e de insetos (cupins). A ocorrência de certos anaeróbios associados a protozoários de vida livre também é comum. Mais recentemente, os estudos sobre ambientes extremos realçam a presença dos anaeróbios em locais cuja faixa de valores de temperatura, pH e salinidade é a mais improvável para a existência de vida, tais como fendas vulcânicas em oceanos e geleiras dos pólos ártico e antártico.

Quando se avalia o vasto universo de reações que caracteriza os ciclos biogeoquímicos dos elementos, tem-se a exata dimensão das atividades de transformação de compostos mediadas por anaeróbios em um sistema natural. Assim, para exemplificar aspectos da ecologia microbiana anaeróbia é imprescindível considerar pelo menos um desses ciclos na natureza, como o do carbono (Figura 1), no qual localiza-se com certa facilidade o papel dos seres vivos na formação dos compostos oxidados e reduzidos do carbono, incluindo o gás metano, a forma mais reduzida desse elemento no ambiente.

Algumas rotas relacionadas a um número significativo de tipos microbianos cujo metabolismo é de fato independente do oxigênio são ilustradas na Figura 2 (adaptada de ROGERS & WHITMAN, 1991). O esquema mostra um perfil em corte de um corpo d'água e suas margens, destacando as várias reações mediadas por organismos aeróbios e anaeróbios em um ambiente natural.

Observando-se a figura, verificam-se quatro zonas distintas, marcadas a partir do sedimento (esquema ampliado) e ao longo da coluna d'água. A zona mais profunda mostra as reações dos organismos anaeróbios estritos produtores do gás metano e aponta a origem dos

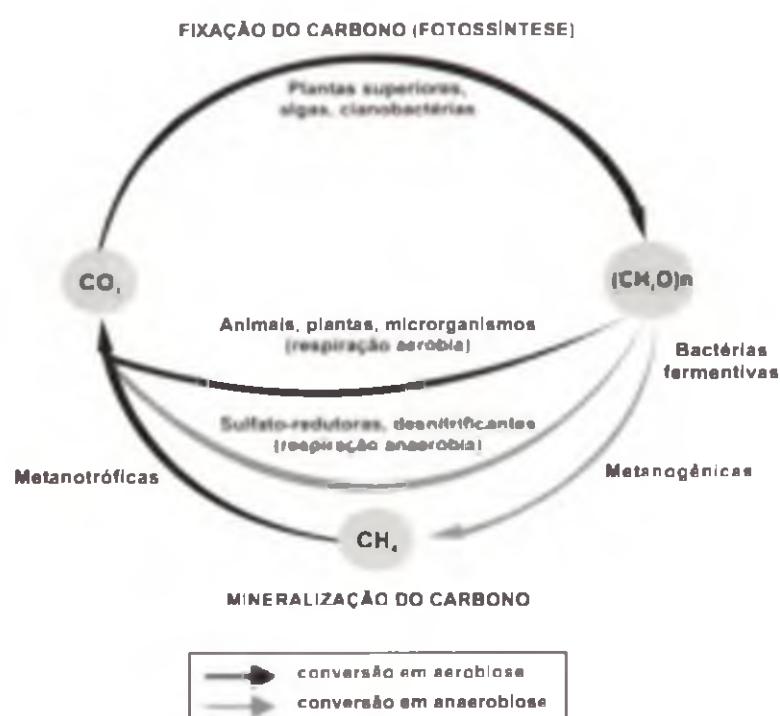


FIGURA 1. Esquema simplificado do Ciclo do Carbono. Fonte: adaptado de Vandecasteele, 2005.

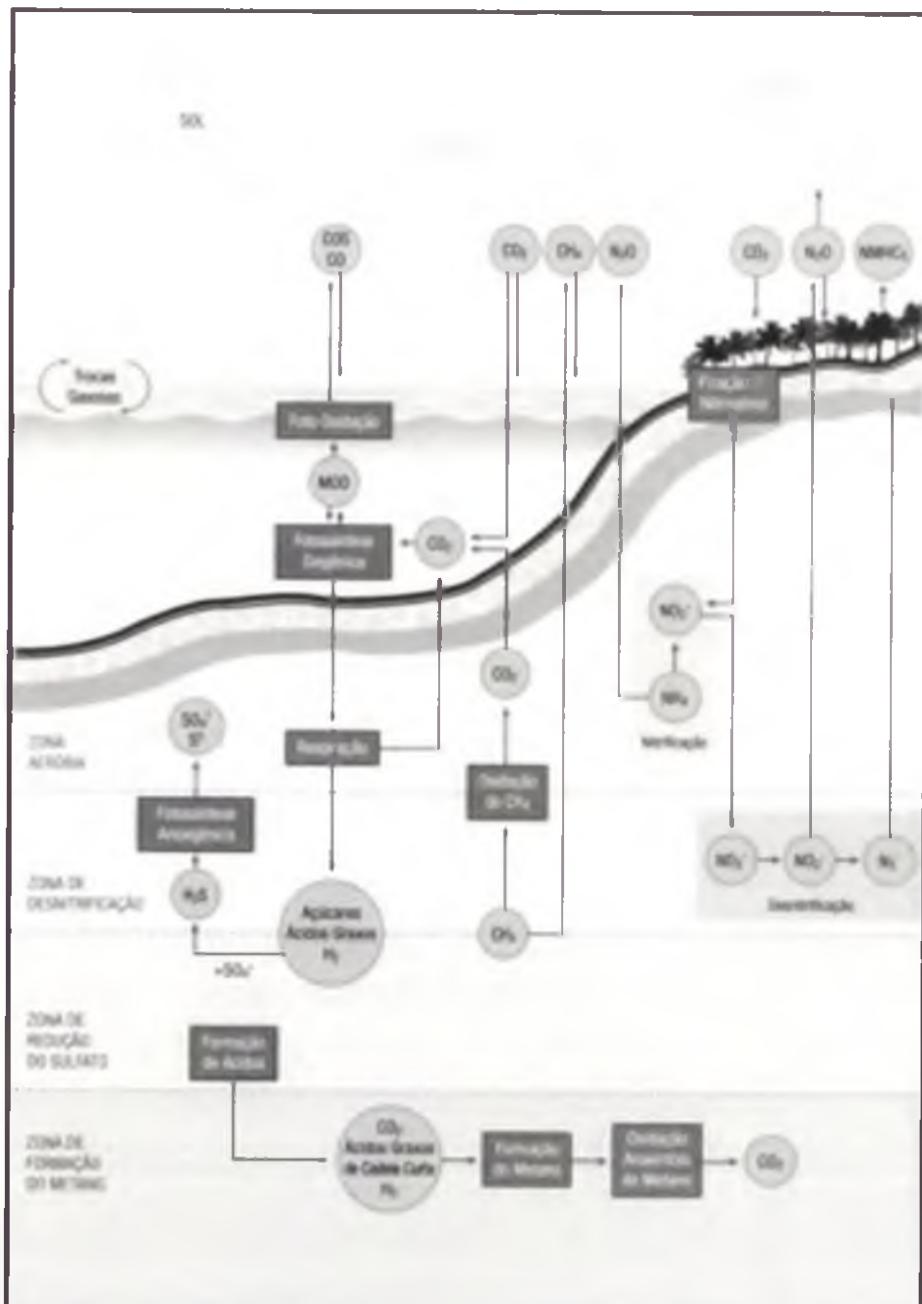


FIGURA 2. Transformações biogeoquímicas em um sistema aquático natural (perfil em corte). As distâncias entre as zonas propostas são meramente ilustrativas.

substratos desses organismos a partir da atividade microbiana de procariontes fermentativos formadores de ácidos de cadeia curta e hidrogênio. Além disso, nessa mesma zona, há organismos metilotróficos (metanotróficos) utilizadores de metano sob anaerobiose. Em geral, essa região possui potenciais de óxido-redução da ordem de -300 a -400mV. Na zona imediatamente superior encontra-se a atividade de redução do íon sulfato por procariontes redutores de sulfato (bactérias redutoras de sulfato - BRS) com formação do gás sulfídrico (H_2S). Nessa zona, o potencial de óxido-redução é, em geral, próximo a -200mV.

Na zona de desnitrificação, na qual ocorre um dos metabolismos mais importantes do ciclo do nitrogênio, a respiração anaeróbia do nitrato com liberação do nitrogênio, os potenciais de óxido-redução são iguais ou superiores a faixa de +50 a +250mV. Nessa região, pode haver emissão do óxido nitroso. Essa zona encontra-se muito próxima à zona aeróbia, cujos valores de potenciais de óxido-redução estão acima de +750mV, e na qual há atividade da maioria dos heterótrofos aeróbios e de bactérias quimioautótrofas nitrificantes, que oxidam a amônia para a formação do nitrito e do nitrato.

No esquema, realça-se um dos produtos característicos dos ambientes anóxicos ou anaeróbios, os gases derivados do metabolismo microbiano. Esses gases,

como o metano e o gás sulfídrico, como observado na Figura 2, servem como fontes energéticas para outros organismos, tanto aeróbios como anaeróbios. No caso do metano, a oxidação aeróbia desse gás é bastante comum e conduzida próxima a fonte de emissão por organismos procariontes metanotróficos. Por sua vez, o gás sulfídrico integra o metabolismo fotossintético das bactérias fotótrofas anoxigênicas do ciclo do enxofre, que resulta na formação do sulfato ou de enxofre elementar. A desnitrificação geradora do gás nitrogênio e outros gases pode ocorrer tanto por organismos heterótrofos facultativos capazes de realizar a respiração anaeróbia do nitrato em um meio orgânico, bem como por autótrofos obrigatórios capazes de usar a amônia para reduzir o nitrato a nitrogênio, e sintetizar compostos orgânicos a partir do dióxido de carbono. As reações da zona aeróbia são representadas pelo metabolismo energético comum ao sistema respiratório aeróbio e, certamente, dependentes do oxigênio molecular emanado pelos organismos fotossintéticos e/ou oriundo da atmosfera. A fixação do nitrogênio por plantas e a interferência de plantas superiores e mecanismos de foto-oxidação na geração de tipos gasosos são também apontados na Figura 2.

Na natureza, a metanogênese biológica possui um importante papel na etapa final do fluxo do carbono em vários habitats anaeróbios. O metano emanado nesses ambientes sofre a oxidação microbiana ou é diretamente liberado para atmosfera.

Nos últimos anos, a crescente emissão do metano no ambiente constitui enorme preocupação e é devida essencialmente à atividades antropogênicas, tais como as derivadas do setor agropecuário - criação de gado e plantação de arroz e do represamento de águas para fins de consumo e eletricidade. Em ambos os casos, a metanogênese é de origem microbiana.

Embora as aplicações práticas da metanogênese, como o tratamento anaeróbio de esgotos sanitários e industriais em biodigestores (biorreatores operados sob anaerobiose), e de resíduos sólidos (lixo) nos aterros sanitários, também constituam fontes do metano, seu impacto positivo na estabilização de poluentes e conservação de energia é evidente e incontestável. É certo porém, que tanto o metano, como o dióxido de carbono compõem o conjunto de gases prioritários do conhecido efeito estufa.

A ecologia da metanogênese é facilmente compreendida, em função da bem definida atuação das arquéias metanogênicas no ambiente. As metanogênicas realizam reações muito simples e específicas, fundamentais para a remoção do hidrogênio e do ácido acético do meio em que habitam. O grupo metanogênico é dependente de outros tipos microbianos que disponibilizam seus substratos preferenciais; assim, pode-se afirmar que a metanogênese ocorre como resultado final de distintas interações de culturas microbianas na degradação de compostos complexos. Portanto, a relação sintrófica, muitas vezes obrigatória, se estabelece e permite a bioconversão anaeróbia de polímeros por bactérias hidrolíticas fermentativas e/ou eucariontes como fungos celulolíticos, cujos produtos da hidrólise e fermentação compõem os substratos para outros organismos fermentadores (acetogênicos) eficientes na geração do hidrogênio e do acetato, que por sua vez podem ser utilizados na produção do metano. Essas reações seqüenciais formam uma cadeia alimentar extremamente bem coordenada, que invariavelmente conduz a produtos gasosos como o metano, o dióxido de carbono

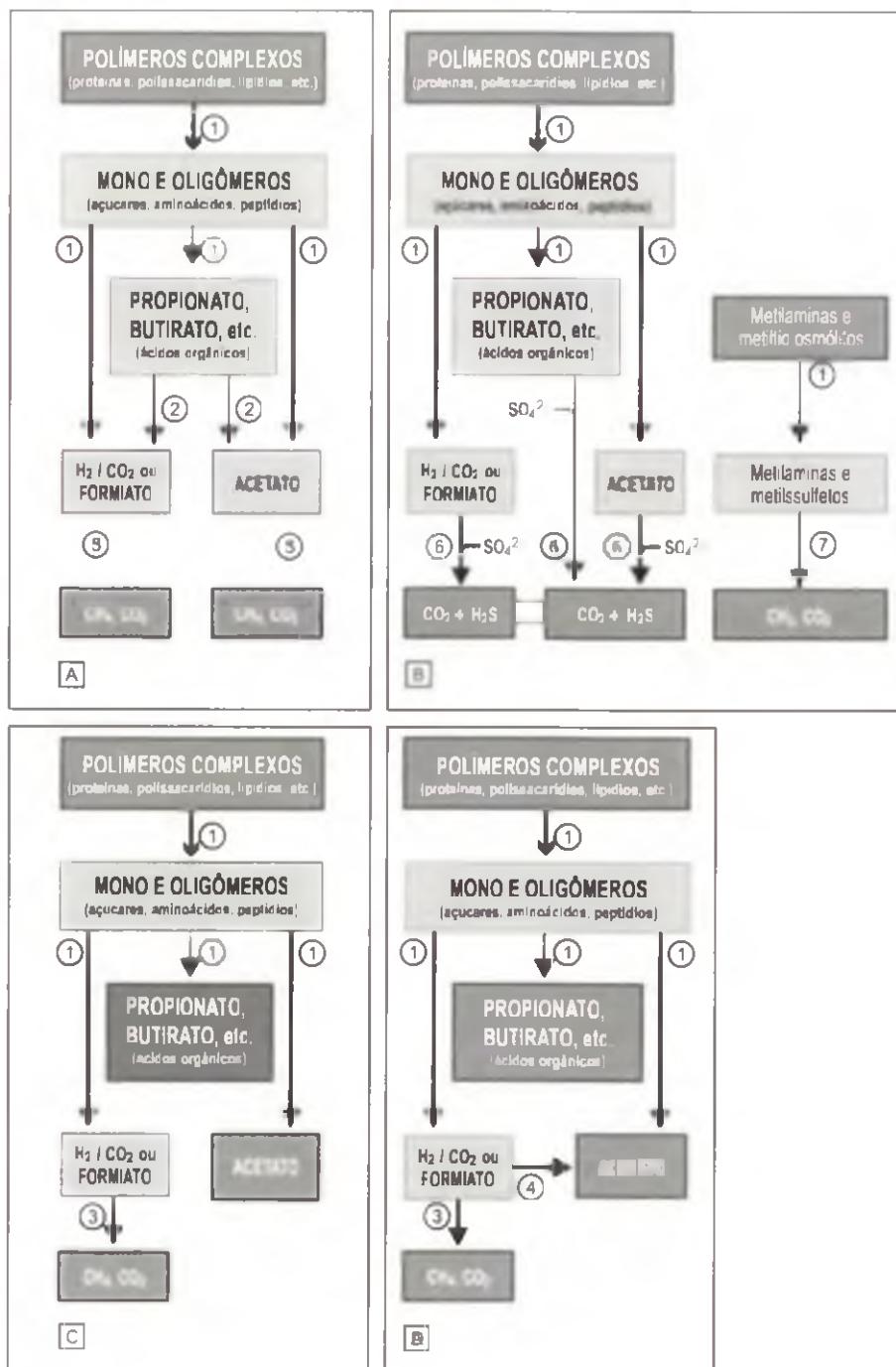


FIGURA 3. Esquemas que representam o fluxo de carbono durante a decomposição anaeróbia da matéria orgânica complexa a metano em ambientes diversos. (A) Sedimentos de corpos aquáticos; biodigestores; (B) Sedimentos marinhos contendo sulfato; (C) Trato digestivo de animais ruminantes; (D) Trato digestivo de cupins. (1) Anaeróbios hidrolíticos e fermentativos; (2) Bactérias acetogênicas produtoras de H₂; (3) Arquéias metanogênicas consumidoras de H₂; (4) Bactérias acetotróficas consumidoras de H₂; (5) Arquéias metanogênicas acetotróficas; (6) Bactérias redutoras do sulfato; (7) Arquéias metanogênicas metilotróficas. Os compostos intermediários estão apresentados nos quadros mais claros e os compostos iniciais e finais nos quadros mais escuros. As setas largas indicam o fluxo do carbono mais intenso, enquanto as setas estreitas estão associadas aos menores fluxos de carbono. Fonte: baseada em Zinder (1993).

e o sulfeto de hidrogênio. Os desvios na rota do metano são dependentes dos tipos de doadores e acetores de elétrons disponíveis no ambiente anaeróbio.

A Figura 3, adaptada de Zinder (1993), mostra o fluxo do carbono a metano em habitats anaeróbios, tais como sedimentos de corpos d'água doce e marinha, no trato digestivo de ruminantes e de cupins. A presença do sulfato é expressiva nos sedimentos marinhos, o que torna possível a produção do gás sulfídrico em detrimento do metano. A seqüência da Figura 3 (A) exemplifica também o que ocorre nos processos anaeróbios de tratamento de resíduos líquidos e sólidos em biodigestores e aterros sanitários. Os organismos responsáveis e a lógica das reações anaeróbias apontadas na figura estão detalhados no item 3, que descreve aspectos da biodegradação anaeróbia.

Uma das características notáveis da metanogênese relaciona-se com a imprescindível compreensão das relações microbianas nativas, o que reforça a ênfase a ser dada à condução experimental com culturas mistas nas investigações sobre ecofisiologia, a fim de manter íntegras as interações entre as diferentes populações. Por conseguinte, a elucidação do funcionamento da comunidade na transformação e/

ou estabilização de um composto torna-se mais próxima dos mecanismos concretos da biodegradação anaeróbia. Essa visão é essencial na adoção de biotecnologias anaeróbias para o saneamento ambiental.

3. Metabolismo anaeróbio: biodegradação e transformações - ênfase à metanogênese

Como descrito, os organismos anaeróbios compreendem espécies que podem crescer em ambientes extremos de temperatura, pH, salinidade ou contendo substâncias tóxicas. Os estudos sobre evolução e filogenia têm indicado que as primeiras espécies de procariotes foram anaeróbias adaptadas a altas temperaturas; e assim, os termoanaeróbios e suas enzimas estáveis têm servido como sistemas-modelo para investigações básicas e aplicadas sobre a degradação de polissacarídos como a celulose e o amido, de vias da metanogênese, etanolgenêse, acetogênese, sulfetogênese, fixação autotrófica do CO₂, bem como da produção de enzimas glicolíticas, hidrogenases e desidrogenases. Diferentemente dos aeróbios, os anaeróbios parecem envolver um número maior de mecanismos de conservação de energia e adaptação fisiológica ao *stress* ambiental, nesse último caso, um bom exemplo é a peculiar composição lipídica de membranas de algumas espécies anaeróbias.

A Figura 3 (item B) mostra que os compostos complexos podem ter diferentes origens, que incluem não somente polissacarídeos, como também proteínas e lipídeos. Particularmente, segundo Wolfe (1999), foram os estudos sobre o metabolismo anaeróbio dos aminoácidos, realizados por Stickland em 1934, que revelaram a dimensão metabólica dos microrganismos anaeróbios em degradar compostos complexos. Embora o valor desse comentário centre-se nos resultados de investigações sobre a degradação anaeróbia de aminoácidos, as descobertas das reações de Stickland foram consideráveis. Os experimentos com suspensões celulares da espécie *Clostridium sporogenes* demonstraram que certos aminoácidos quando adicionados em pares eram passíveis de serem oxidados sob anaerobiose, enquanto simples aminoácidos não podiam ser metabolizados. Esses resultados corroboraram com o grande avanço no conhecimento do metabolismo anaeróbio dos compostos nitrogenados, com o isolamento de diferentes espécies e linhagens de anaeróbios que puderam metabolizar aminoácidos, purinas e pirimidinas.

A considerável diversidade metabólica dos anaeróbios e seus ineficientes rendimentos energéticos fez desse grupo de microrganismos maravilhosas ferramentas para estudos sobre fisiologia microbiana (WOLFE, 1999), notadamente em relação às suas vias de degradação e/ou transformações de compostos. São diversas as reações metabólicas através de mecanismos energéticos celulares independentes do oxigênio molecular.

Como ilustrado na Tabela 1, alguns exemplos são essenciais para a biotecnologia ambiental (ZEHNDER & STUMM, 1988; GLAZER & NIKAIDO, 1995; MULDER *et al.*, 1995; JETTEN *et al.*, 1997; VANDECARSTEELE, 2005a e b).

TABELA 1. Exemplos de rotas metabólicas anaeróbias nas transformações e produção de compostos de carbono, nitrogênio, hidrogênio, ferro, manganês e enxofre.

Denominação	Esquemas de rotas de redução
Desnitrificação	$(CH_3O) + NO_3^- \rightleftharpoons NO_2^- \rightleftharpoons N_2O \rightleftharpoons N_2$
Desassimilação redutiva do nitrato a amônia	$(CH_3O) + NO_3^- \rightleftharpoons NO_2^- \rightleftharpoons NH_4^+$
Oxidação anaeróbia da amônia (ANAMMOX)	$NO_3^- (NO_2^-) + NH_4^+ \rightleftharpoons N_2$
Fotossíntese anoxigênica anaeróbia	$yCO_2 + xH_2S \rightleftharpoons (CH_3O)_n + yH_2O + xS^\circ$
Redução do Fe	$4FeOOH + (CH_3O) + 6H^+ \rightleftharpoons FeCO_3 + 3Fe^+ + 6H_2O$
Redução do Mn	$2MnO_4^- + (CH_3O) + 2H^+ \rightleftharpoons MnCO_3 + Mn^+ + 2H_2O$
Redução do Sulfato	$(CH_3O) + zSO_4^- + zH^+ \rightleftharpoons zHS^- + CO_2 + H_2O$
Produção de Hidrogênio	$H_2O \rightleftharpoons CO_2 + 2H_2$
Produção do Acetato	$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons CH_3COO^- + 4H_2O$
Produção do Metano a partir do Hidrogênio	$CO_2 + 4H_2 \rightleftharpoons CH_4 + H_2O$
Produção do Metano a partir do Acetato	$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_4 + CO_2$
Desalogenação redutiva	$C_2Cl_4 + H_2 \rightleftharpoons C_2HCl_3 + H^+ + Cl^-$

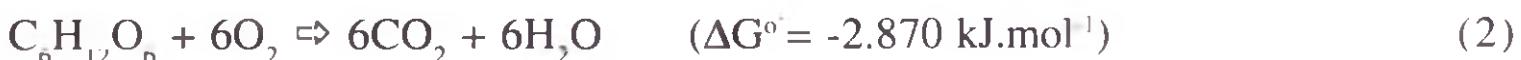
*Energia luminosa. Fontes: Zehnder & Stumm, 1988; Glazer & Nikaido, 1995; Mulder *et al.*, (1995); Jetten *et al.*, (1997); Vandecasteele, 2005a e b.

Algumas rotas anaeróbias observadas na Tabela 1 foram comentadas no capítulo 2. Há, contudo, outras vias fundamentais à bioquímica de compostos inorgânicos e orgânicos, como as que envolvem a redução do nitrato tanto a amônia como a nitrogênio, mas que não se relacionam com a via de desnitrificação comumente conhecida. O processo de desassimilação do nitrato a amônia (ABREU, 1994) ocorre nos ambientes anóxicos, embora não tão usual, mediada por organismos fermentativos; por sua vez, a oxidação anaeróbia da amônia (ANAMMOX) tem sido referida com uma das grandes descobertas metabólicas durante as investigações sobre o tratamento anaeróbio de resíduos contendo nitratos. Mulder *et al.* (1995); Jenten *et al.* (1997) e Güven *et al.* (2005) descreveram as características fundamentais do processo de oxidação anaeróbia da amônia em meio contendo nitrato e nitrito, mediado por um tipo microbiano quimiolitótrofo obrigatório de morfologia irregular pertencente a ordem *Planctomycetales*. Sem dúvida, o ANAMMOX é atualmente um dos processos mais avançados para a remoção da amônia de águas residuárias.

Por sua vez, a redução biológica do ferro e a do manganês são reações bastante usuais, ainda que menos discutidas no âmbito das tecnologias ambientais aplicadas à estabilização de resíduos. Ghiorse (1988), em sua reconhecida revisão, descreveu a participação de anaeróbios estritos capazes de reduzir óxidos de Fe e Mn, como a espécie *Clostridium butyricum* e de anaeróbios facultativos como o gênero *Bacillus* sp.

Os mecanismos anaeróbios para obtenção de energia e crescimento são, em muitos aspectos, bastante intrigantes. Até mesmo quando se avalia a gama de reações

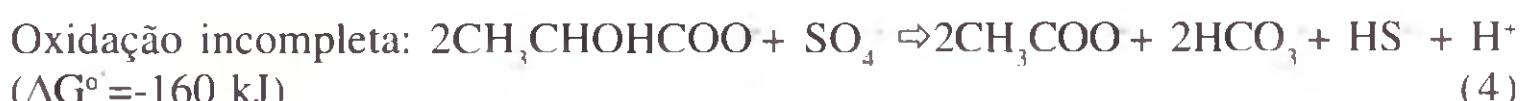
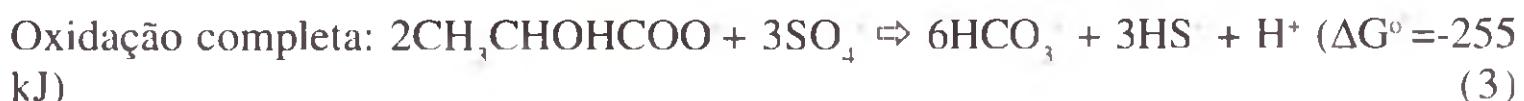
metabólicas anaeróbias e sua consequente diversidade microbiana. Considere um exemplo clássico. A conversão de uma hexose sob metanogênese (Equação 1), cujo rendimento energético é bem inferior à sua degradação aeróbia (Equação 2), revela a importância de vários grupos microbianos que atuam de forma mutualística nessa degradação (Figura 3), ao passo que é possível um único tipo aeróbio degradar totalmente o composto orgânico em dióxido de carbono e água, podendo extrair para si a enorme quantidade de energia gerada.



Em síntese, pode-se atribuir um elevado grau de especialização metabólica aos organismos que realizam a metanogênese de uma hexose, e a eficiência do processo como um todo depende, portanto, de interações positivas entre as diversas espécies microbianas, com diferentes capacidades degradativas. Assim, os intermediários metabólicos de um grupo de microrganismo podem servir como nutrientes ao crescimento de outras espécies.

Na natureza, como já mencionado (Figura 3A a D), um papel essencial dos microrganismos consiste na degradação da biomassa formada pela fotossíntese, ou seja, de polímeros como celulose, hemicelulose, pectinas e lignina. Os compostos poliméricos estão sujeitos à hidrólise e fermentação anaeróbia pela ação de fungos, como o classicamente referido *Neocallismatix* sp. e de bactérias representadas pelos gêneros *Clostridium* sp., *Ruminococcus* sp., *Eubacterium* sp., *Bacteroides* sp., *Butyrivibrio* sp., *Selenomonas* sp., *Megasphaera* sp., *Peptococcus anaerobicus*, *Lachnospira multiparus*. Esses organismos fermentadores primários podem definir a rota dos demais passos metabólicos subsequentes, nos quais produtos mais ou menos oxidados estarão disponíveis para um segundo grupo microbiano, em geral, formadores de ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido acético. Nessa etapa, organismos acetogênicos como *Syntrophomonas wolinii*, *S. wolfei*, *Syntrophus buswellii*, *Clostridium bryantii*, *Acetobacterium woddii*, e várias espécies de bactérias redutoras do íon sulfato, como por exemplo, os gêneros *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp. estão envolvidas na formação de substratos essenciais à metanogênese (VAZOLLER, 1995b).

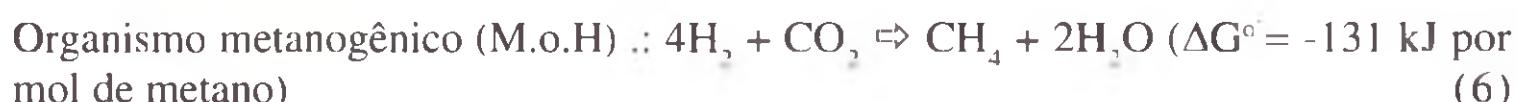
Um dos grupos sintróficos não obrigatórios que se sobressaem, dentre aqueles capazes de realizar a acetogênese, é o que reúne as bactérias redutoras de sulfato (BRS) capazes de realizar a oxidação completa ou incompleta de substratos com vistas a sulfetogênese. Um exemplo dessa capacidade é mostrado nas reações (3) e (4), respectivamente, para o metabolismo respiratório do sulfato na presença do lactato.



As BRS são anaeróbios estritos, sendo também capazes de realizar a fermentação de compostos na ausência do sulfato. Utilizam uma gama de substratos como ácidos láctico, acético e propiônico, e álcoois como o etanol. Podem usar o gás hidrogênio, o que as torna potentes competidoras com outros organismos, tais como as arquéias metanogênicas. Mais recentemente, como será abordado, tem-se constatado seu inegável potencial na degradação anaeróbia de compostos tóxicos como o benzoato, fenol e catecol (VANDECASTEELE, 2005a).

A pequena quantidade de energia disponível na conversão metanogênica força uma eficiente cooperação entre os microrganismos envolvidos. A dependência mutualística da parceria microbiana com respeito à limitação de energia, como já apontado, é essencial, uma vez que somente a operação conjunta dos microrganismos garante o processamento das reações.

Um clássico exemplo dessa cooperação refere-se à história de um organismo metanogênico obtido em etanol, denominado por *Methanobacillus omelianskii*. Na verdade, comprovou-se que “a espécie” se tratava de uma co-cultura, na qual um organismo (denominado S) degradava o etanol a acetato e hidrogênio (Equação 5), e o outro, metanogênico, utilizava o hidrogênio para a formação do metano (Equação 6). A reação mediada por ambos microrganismos está esquematizada na Equação 7 (SCHINK, 1997).



Os resultados mostraram que o organismo S não crescia no etanol na ausência da metanogênica hidrogenotrófica, responsável por manter a pressão parcial de hidrogênio suficientemente baixa para que as condições termodinâmicas fossem favoráveis à degradação do etanol no meio de cultivo. Assim, a cooperação entre as culturas revelou a importância da transferência de hidrogênio entre espécies (SCHINK, 1997; VANDECASTEELE, 2005a), um sistema notável “de parceria energética” comumente denominado - transferência de hidrogênio inter-espécies.

A Tabela 2 relaciona reações de oxidação anaeróbia de diferentes compostos orgânicos, realizadas por bactérias fermentativas e acetogênicas sintróficas produtoras de hidrogênio, bem como os valores das variações de energia livre de Gibbs a elas associados. A ocorrência das reações endergônicas é, portanto, dependente das interações sintróficas entre os organismos produtores e os consumidores de hidrogênio, como por exemplo, as arquéias metanogênicas.

Nos ecossistemas anaeróbios metanogênicos, tanto a metanogênese hidrogenotrófica (Equação 8) como a acetoclástica (Equação 9) garantem o equilíbrio

TABELA 2. Exemplos de reações de oxidação endergônicas que obrigam a associação sintrófica com transferência de hidrogênio interespécies.

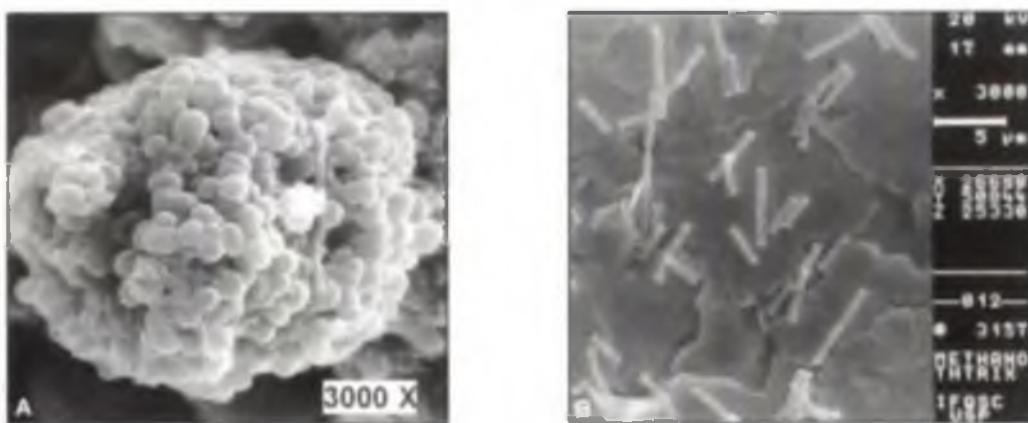
Substrato	Reação	ΔG° (kJ mol ⁻¹) ^a	Especie bacteriana
Etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9,7	<i>Pelobacter venetianus</i> <i>P. carbinolicus</i> ^b
Glicolato	$\text{CH}_3\text{OHCOO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	+28,9	<i>Syntrophobotulus glycolicus</i>
Acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	+104,6	<i>Clostridium ultunense</i> Linhagem AOR
Propionato	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	+76,1	<i>Syntrophobacter wolinii</i>
Butirato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48,1	<i>Syntrophomonas wolfei</i> <i>S. sapovorans</i> ^{d,e}
Ácido Graxo (C ₁₆)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)14\text{COO}^- + 14\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 8\text{CH}_3\text{COO}^- + 14\text{H}_2 + 7\text{H}^+$	+391,2	<i>S. sapovorans</i> ^{d,e}
n-alcanos (C ₁₆) ^f	$\text{C}_6\text{H}_{34} + 16\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 8\text{CH}_3\text{COO}^- + 17\text{H}_2 + 8\text{H}^+$	+468,6	<i>Syntrophus</i> sp.
Benzoato	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + 3\text{H}^+$	+94,1	<i>Syntrophus buswellii</i> S. gentianae ^g
Tolueno ^h	$\text{C}_6\text{H}_5 + 9\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 6\text{H}_2 + 4\text{H}^+$	+166	?

^aValores de ΔG° em kJ por mol de substrato, calculado de acordo com Thauer (1977) e Spormann e Widdel (2000) *apud* Vandecasteele (2005); ^bOxidadora também de 2,3 butanodiol; ^cOxidadora também de cisteína e formiato; ^dOxidadora de ácidos graxos [C₁-C₁₈]; ^eEspecies sintróficas que realizam a β -oxidação de ácidos graxos – Família *Syntrophomonadaceae*; ^fRelacionam-se às bactérias redutoras do sulfato; ^gOxidadoras de hidroquinonas; ^hAssociação sintrófica com metanogênicas na degradação de BTEX. Fonte: Schink (1997); Vandecasteele (2005a).

do sistema, através da manutenção de pressões parciais de hidrogênio da ordem de 10⁻⁴ atm. Vários são os gêneros metanogênicos que atuam nos diferentes sistemas anaeróbios. Salientam-se aqueles comuns aos processos anaeróbios de tratamento de resíduos: *Methanosarcina* sp. (Figura 4A), *Methanosaeta* sp. (Figura 4B), *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp. e *Methanospirillum* sp.



De maneira geral, a energética para a formação do ATP celular parece incerta via as transformações anaeróbias. Entretanto, os anaeróbios, operando individualmente com pequenas quantidades de energia, ou cooperando entre si, são “experts” na exploração de valores mínimos de energia para a geração de ATP, através de mecanismos comuns que acoplam o transporte de prótons através da membrana em ambientes altamente redutores.



clorometano com o maior número de substituições, o que possibilita um potencial de óxido-redução mais elevado e seja um acceptor de elétrons mais favorável. Como consequência, dentre seus congêneres, é o composto cuja reação de descloração é a mais exergônica, segundo os valores da energia livre de Gibbs (ΔG°) (NAKAYAMA, 2005).

A desalogenação redutiva é uma reação comum ao metabolismo de espécies anaeróbias na degradação de compostos halogenados alifáticos e aromáticos. Compostos como o percloroetileno (PCE), tricloroetileno (TCE) e o pentaclorofenol (PCP) têm sido intensamente estudados nos últimos anos, realçando o papel de novas espécies anaeróbias capazes de atuar através da desalogenação redutiva da molécula mediante mecanismos únicos, como a respiração anaeróbia (halorespiração) e/ou o co-metabolismo. Além disso, esses estudos têm demonstrado a capacidade de arquéias metanogênicas em atuar sobre compostos jamais considerados passíveis de integrar suas reações metabólicas.

Como preconizado por El Fantroussi *et al.* (1998), sob condições anaeróbias, as principais rotas de transformação de compostos halogenados são: o co-metabolismo, no qual enzimas ou cofatores de uma reação que ocorre naturalmente no organismo provocam uma modificação fortuita do composto halogenado; a utilização do composto halogenado como fonte de carbono e energia, notadamente de compostos C1 e C2 clorados; a halorespiração, na qual compostos halogenados são empregados como acceptores de elétrons, sendo a energia para o crescimento celular derivada de reações exergônicas de desalogenação.

A *Methanosarcina* sp. DCM é um exemplo de microrganismo que desaloga moléculas de percloroetileno (PCE) através de co-metabolismo. Esse microrganismo acopla a desalogenação do PCE à metanogênese, utilizando um agente de transferência de elétrons pouco conhecido para transportar elétrons da metanogênese para o PCE. Aparentemente, a linhagem não é capaz de desalogenar o PCE se não houver adição do composto orgânico metanol, que se constitui como o composto doador de elétrons (EL FANTROUSSI *et al.*, 1998; NAKAYAMA, 2005). Porém, outros importantes microrganismos que atuam em sua maioria em consórcios bastante coordenados são capazes de degradar os compostos PCE e TCE, através de rotas que envolvem tanto o co-metabolismo como a halorespiração. No item 5 desse capítulo serão abordados comentários sobre a biodegradação anaeróbia do PCE e do TCE.

Entre os microrganismos capazes de utilizar compostos halogenados como fonte de carbono e energia está uma cultura anaeróbia que atua sobre o diclorometano, o *Dehalobacterium formicoaceticum*, que converte o composto a formiato e acetato (NAKAYAMA, 2005).

Em contraste com os processos de desalogenação através do co-metabolismo e de síntese celular, as linhagens que realizam a halorespiração acoplam a desalogenação redutiva de compostos halogenados alifáticos ou aromáticos com a conservação de energia e, portanto, com o crescimento microbiano. Ao contrário do que acontece no co-metabolismo, a desalogenação nesses organismos é catalisada por enzimas específicas com grande afinidade pelo substrato e alta atividade específica. Em geral, todos os microrganismos isolados até o momento capazes de halorespirar

pertencem ao Domínio *Bacteria*, sendo alguns tipos bactérias redutoras de sulfato ou de enxofre (HOLLIGER *et al.*, 1999; MONETENEGRO *et al.*, 2001; NAKAYAMA, 2005).

Há algumas importantes revisões que relacionam os tipos de linhagens capazes de realizar a halorespiração e suas principais características, como realizadas por El Fantroussi *et al.* (1998), Holliger *et al.* (1999) e, mais recentemente por Nakayama (2005). Nesses trabalhos, sobressai a espécie *Desulfomonile tiedjei*, uma bactéria redutora de sulfato degradadora do 3-clorobenzoato (3-CB), capaz de acoplar quimiosmoticamente a desalogenação redutiva do 3-CB com a síntese de ATP (MOHN & TIEDJE, 1991; MOHN & TIEDJE, 1992), e o gênero *Desulfitobacterium* sp. que possui grande versatilidade metabólica e, na maioria dos casos, acopla a desalogenação redutiva à oxidação de hidrogênio e/ou formiato, conservando a energia através da fosforilação ligada a uma cadeia transportadora de elétrons.

As enzimas envolvidas na halorespiração são desalogenases redutivas, as quais foram parciais ou completamente purificadas e caracterizadas nos níveis bioquímico e genético. São enzimas comumente associadas à membrana, como esperado em sistemas respiratórios. A exceção, no entanto, é a desalogenase redutiva do PCE da espécie *Dehalospirillum multivorans*, isolada do citoplasma (SMIDT, 1999; NAKAYAMA, 2005).

As pesquisas nos campos da fisiologia, bioquímica e genética molecular sobre estrutura, função e regulação da cadeia transportadora de elétrons da halorespiração, tanto para compostos alifáticos como aromáticos clorados têm revelado que a disponibilidade dos elétrons em algumas cadeias respiratórias é derivada do hidrogênio e do formiato, com a conservação de energia via fosforilação ligada à cadeia transportadora de elétrons. A Figura 5 mostra modelos propostos para a descrição da estrutura e funcionamento das cadeias halorespiratórias das espécies *Dehalospirillum multivorans* (Figura 5A), *Dehalobacter restrictus* (Figura 5B) e *Desulfomonile tiedjei* (Figura 5C). Nesses modelos, as enzimas desalogenadoras estão voltadas para o citoplasma ou dispersas nessa matriz. A Figura 5D apresenta um modelo para a *Desulfitobacterium dehalogenans*, no qual se pressupõem que as desalogenases têm uma orientação extra-citoplasmática. As enzimas desalogenadoras (H₂ase, hidrogenase; Fdh, formiato desidrogenase; Rdase, desalogenase redutiva) e os componentes da cadeia transportadora de elétrons (citocromos, menaquinona e quinona) estão representados nos quatro esquemas extraídos dos trabalhos de Smidt (1999) e Nakayama (2005).

A regulação da atividade desalogenadora está na indução enzimática pela presença do substrato halogenado. Na maior parte dos casos, o composto indutor é também o substrato para o sistema desalogenador, embora tenham sido encontrados exemplos nos quais ocorrem a indução da atividade da enzima por outros compostos não halogenados. Contudo, a existência de atividade desalogenadora constitutiva foi detectada em algumas linhagens; porém, há ainda a espécie *Dehalospirillum multivorans*, na qual três variações metabólicas foram verificadas: atividade desalogenadora induzida pelo substrato; expressão constitutiva da halorespiração; não indução da desalogenação redutiva pela presença do substrato clorado (SMIDT, 1999; NAKAYAMA, 2005).

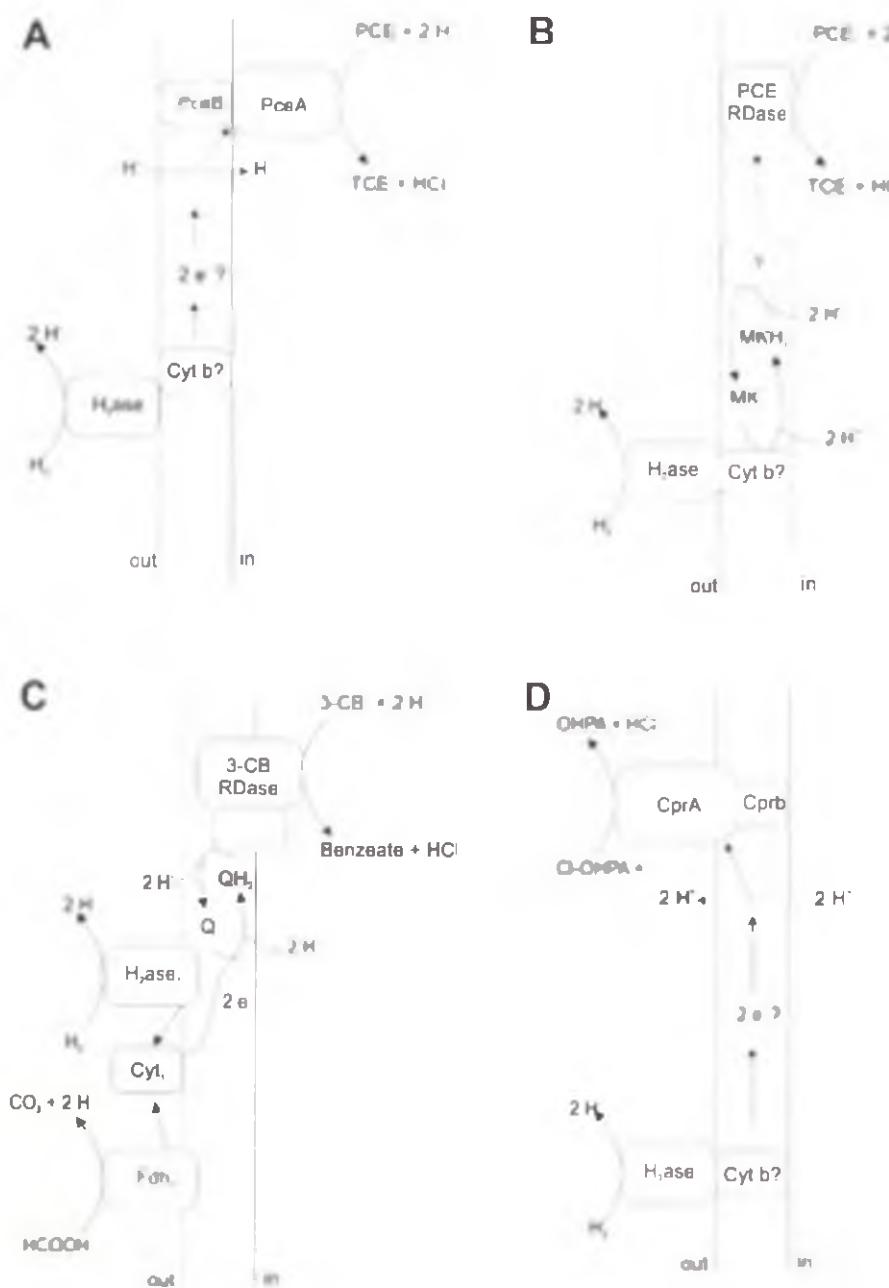


FIGURA 5. Modelos propostos de cadeias halorespiratórias em (A) *Dehalospirillum multivorans*, (B) *Dehalobacter restrictus*, (C) *Desulfomonile tiedjei* e (D) *Desulfitobacterium dehalogenans*. Abreviações: H_{ase}, hidrogenase; Fdh, formiato desidrogenase; Cyt, citocromo; Cyt B, citocromo tipo b; Rdase, desalogenase reduutiva; MK, menaquinona; Q, quinona; out/in, face externa/interna da membrana citoplasmática (Reprodução de Smidt, 1999; Nakayama, 2005).

Pode-se comentar que as informações reunidas até o momento mostram que o enfoque dos estudos iniciais sobre a desalogenação redutiva esteve centrado na caracterização das condições ambientais que favoreciam a reação, assim como na determinação da gama de compostos sujeita a tal transformação. Em poucos anos, contudo, o foco das pesquisas foi direcionado aos mecanismos bioquímicos envolvidos na desalogenação redutiva, notadamente nas enzimas desalogenadoras e sua regulação, e na seqüência dos genes que codificam as desalogenases (VILLEMUR *et al.*, 2002).

Muito embora os avanços no conhecimento sobre o aparato enzimático seja notável, aspectos fisiológicos da degradação, como por exemplo, os mecanismos de entrada dos compostos clorados na célula procariótica permanecem ainda não esclarecidos. El Fantroussi *et al.* (1998) apontaram que as características lipofílicas de compostos como os clorofenóis facilitam a sua forte adsorção às células microbianas e, assim, sua difusão através das membranas. Outros compostos, como os bifenilos policlorados (PCBs), por serem moléculas grandes, é possível que penetrem na célula muito lentamente, ou concentrem-se na membrana plasmática graças à sua hidrofobicidade.

A degradação anaeróbia de compostos aromáticos altamente clorados, como o pentaclorofenol (PCP) é de grande interesse à biotecnologia ambiental. Embora

sua utilização seja proibida no mundo, há sítios contaminados carentes de remediação, e a desalogenação redutiva anaeróbia parece ser uma solução efetiva e eficiente. O item 5 abordará alguns aspectos tecnológicos da degradação do PCP.

Finalmente, esse item revela que, em sua grande maioria, os anaeróbios parecem se privilegiar das interações sintróficas quase obrigatórias que ocorrem em suas comunidades naturais. Como observado, os produtos finais do metabolismo dos sintróficos são potentes inibidores termodinâmicos dos mecanismos de conservação de energia e assim, para o crescimento de uma determinada população é necessário o consumo coordenado de seus produtos por um segundo grupo de organismos. Esse ponto revela a importância da existência de consórcios microbianos anaeróbios na natureza e, sobretudo, nos processos tecnológicos de tratamento, notadamente os de resíduos líquidos. Dessa forma, a utilização dos processos anaeróbios não pode prescindir de biorreatores que possuam em suas configurações sistemas operacionais ou materiais suportes que procurem reter a massa celular anaeróbia no processo atuando de forma a manter o equilíbrio das reações. Assim, o item 4 procurará enfocar alguns aspectos sobre esses consórcios, lançando luz sobre o tema biofilmes anaeróbios e sua composição microbiana.

4. Biofilmes anaeróbios – ênfase à metanogênese

Os microrganismos crescem espacialmente organizados na maioria dos sistemas naturais e de engenharia, desde que estes possuam suprimento suficiente de nutrientes (COSTERTON *et al.*, 1995). Ao estudar estes sistemas, a ecologia microbiana se preocupa em determinar a estrutura e dinâmica da população, bem como a distribuição espacial e função das espécies dentro das comunidades, as quais são caracterizadas por várias interações célula-célula e por pronunciada heterogeneidade química e de arquitetura (CALDWELL *et al.*, 1992; COSTERTON *et al.*, 1994; MASSOL-DEYÁ *et al.*, 1995). Boa parte dos resultados desses estudos refere-se ao conjunto do recente conhecimento compilado no tema biofilmes microbianos.

Biofilmes são populações microbianas que se encontram presas numa matriz de polissacarídeos, e que podem se aderir umas às outras e/ou à superfícies e interfaces (COSTERTON *et al.*, 1995). Esta definição inclui os agregados (ou grânulos) e flocos microbianos, como também a adesão das células microbianas em superfícies de diferentes materiais.

A formação do biofilme é um processo complexo que envolve pelo menos quatro etapas, de acordo com van Loosdrecht *et al.* (1990): (1) transporte das células até a superfície do material suporte, que pode ocorrer por difusão molecular, pelo transporte convectivo das células, e/ou pelo seu movimento ativo; (2) aderência inicial, que é fundamentalmente um processo físico-químico no qual a célula se adere à superfície do suporte de forma reversível, (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1989), podendo ser removida por forças suaves ou através de sua própria mobilidade (movimento browniano); a adesão celular ocorre de forma irreversível posteriormente, quando cessa o movimento browniano; a remoção a partir desse

ponto somente se dá se houver forças de cisalhamento muito fortes; (3) aderência firme, em que estruturas especiais da superfície celular, como por exemplo, fibrilas ou exopolímeros formam ligações fortes entre a célula e a superfície; (4) colonização de superfície, na qual as células que estão aderidas firmemente começam a se duplicar, e as novas células formadas permanecem aderidas umas às outras, havendo, portanto, o desenvolvimento de microcolônias e, consequentemente, do biofilme. Sucessivas microcomunidades desenvolvem nichos específicos dentro de determinadas camadas quando o biofilme cresce. Eventualmente a espessura do biofilme atinge um estado de equilíbrio dinâmico, em que os processos de produção de filmes microbianos são contrabalanceados pelos processos que reduzem ou removem o biofilme (BRYERS, 1988).

Os biofilmes microbianos são constituídos por uma mistura complexa de espécies microbianas cuja freqüência relativa pode variar significativamente. A abordagem clássica para analisar tais comunidades é cultivar as bactérias no laboratório em diferentes meios de cultura como se fossem linhagens únicas e, posteriormente, fazer a identificação dos indivíduos. Esta é, freqüentemente, uma tarefa difícil devido à complexidade da comunidade e ao fato da maioria dos microrganismos não ser, muitas vezes, cultivável. É importante enfatizar que a análise da população sem o cultivo e a identificação de no mínimo os constituintes majoritários da comunidade é bastante problemática. Portanto, é crucial a existência de métodos para cultivo e caracterização de espécies nos biofilmes, ou amostras ambientais.

No caso dos agregados e dos biofilmes anaeróbios, especialmente aqueles encontrados em biodigestores anaeróbios utilizados para a degradação de compostos orgânicos, como esgoto doméstico, por exemplo, a composição microbiana dependerá fundamentalmente da(s) fonte(s) de carbono presente(s). Nos diferentes tipos de biorreatores anaeróbios (Figura 7), como será visto no item 5, podem se desenvolver vários tipos de biofilmes, tanto os agregados celulares, como flocos e grânulos, como os que aderem no material suporte inorgânico.

Um trabalho clássico que elucidou a estrutura microbiana dos grânulos anaeróbios desenvolvidos nos sistemas de reação com fluxo ascendente do líquido a ser estabilizado (Figura 7A) foi o de Guiot *et al.* (1991). Operando um biodigestor do tipo UASB com meio de cultivo contendo glicose, e empregando testes padronizados para a determinação da atividade metanogênica específica, os autores relacionaram a fisiologia dos microrganismos com estrutura espacial dos grânulos formados no interior do sistema de reação. O arranjo populacional proposto pelos autores para grânulos alimentados com glicose, baseou-se no modelo de difusão do substrato e produtos de Mc Carty & Smith (1986), desenvolvido para biofilmes alimentados com etanol e propionato. Assim, verificou-se que o grânulo possuía uma estrutura em três camadas: a primeira seria a camada na qual ocorria o consumo ativo da glicose pelas bactérias acidogênicas (hidrolíticas fermentativas); na segunda camada, o consumo ativo do propionato pelas bactérias acetogênicas hidrogenotróficas, cujo produto facilitava o desenvolvimento das metanogênicas hidrogenotróficas; e, finalmente, na camada interna, havia o consumo ativo do composto acetato pelas metanogênicas acetoclásticas como a espécie *Methanosaeta* sp. (para um melhor entendimento da seqüência, vide Figura 3A).

Assim, nesse estudo, o substrato (fonte de carbono) que entra no sistema de reação se move do meio líquido para a superfície do grânulo por transporte de massa, e então se difunde para o interior do grânulo, onde é transformado em propionato, acetato e hidrogênio. Em resposta aos gradientes, hidrogênio, propionato e acetato são transportados de volta para o meio líquido e se difundem em menor grau para o centro do grânulo. Tal partição em zonas tróficas especializadas ao longo do raio do grânulo foi consistente com o modelo de substrato e difusão dos produtos (MC CARTY & SMITH, 1986), bem como relaciona-se com a seqüência da Figura 3A, item 2, cujo esquema aplica-se ao caminho da degradação metanogênica em biodigestores. Dessa forma, é lícito supor que cada partícula granular funciona com populações microbianas altamente organizadas, formando um “microbiodigestor metanogênico”.

A caracterização da composição microbiana em amostras complexas, contendo diferentes populações interdependentes, não é simples. Atualmente, a técnica mais poderosa para a identificação de organismos em amostras ambientais é aquela que se baseia na identificação do RNA ribossomal (RNAr) (PACE *et al.*, 1986). Nesse sentido, a taxonomia bacteriana vem mudando rapidamente nos últimos anos devido a análise sistemática das seqüências do RNAr, que são indicadores quase ideais das relações evolutivas entre espécies (WOESE, 1987). A análise direta de seqüências do RNAr presentes em amostras é possível sem qualquer necessidade de cultivo de organismos, através da utilização do método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para criar bibliotecas genômicas (WARD *et al.*, 1992). A simplicidade e velocidade dos métodos baseados no PCR tornam possível realizar análises detalhadas da comunidade microbiana.

A informação obtida representa a complexidade da comunidade, mas também fornece dados específicos de identificação em diferentes níveis taxonômicos (AMMAN *et al.*, 1995). Não obstante, é importante salientar que a técnica de PCR pode apresentar alguns vieses (conhecidos como PCR bias) dificultando a verificação da real composição da comunidade microbiana (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; HANSEN *et al.*, 1998; POLZ & CAVANAUGH, 1998; ISHII & FUKUI, 2001).

O método de hibridização do RNAr é extremamente útil no contexto de identificação de células (AMMAN *et al.*, 1995). O emprego de sondas específicas complementares ao RNAr marcadas com fluorocromos são ferramentas precisas e altamente sensíveis para identificar tipos microbianos através do microscópio de fluorescência, como se observa quando do uso da técnica FISH (Fluorescent *in situ* hybridization). Além disso, os procedimentos da técnica FISH combinados com a prática com o citômetro de fluxo podem fornecer informações quantitativas, tais como a proporção relativa de determinados grupos de organismos (AMMAN *et al.*, 1990).

O método FISH individualmente utilizado também fornece informações quantitativas, mas na análise de biofilmes sob microscopia de fluorescência é obrigatória a separação das células e, consequentemente, destrói-se a estrutura do biofilme. Assim, nesse caso, o instrumento ótico ideal para análise da estrutura espacial microbiana é o microscópio de varredura confocal a laser (SCLM). Seu emprego permite que a coleção de informações, como pontos discretos e de locais que não estão no foco, possa ser associada a fim de fazer a varredura completa do espécime.

Em seqüência, todas as imagens captadas são passadas em um analisador de imagens que conduz à uma ilustração detalhada em três dimensões do objeto observado. O SCLM é um microscópio bastante compatível para o uso dos métodos moleculares que envolvem sondas fluorescentes (CALDWELL *et al.*, 1993). A Figura 6, extraída de Araújo (2001), mostra o emprego da técnica FISH em estudo sobre a capacidade de arquéias metanogênicas formarem biofilmes em diferentes materiais suporte inorgânicos. No caso, a espécie *Methanobacterium formicicum* (1535) foi monitorada através de FISH com a sonda para a Família *Methanobacteriaceae* (MB1174).

As técnicas moleculares modernas como o FISH oferecem abordagens para a compreensão das interações microbianas e sua ecologia *in situ*. Por exemplo, a presença de nutrientes essenciais no ambiente externo ou na vizinhança de biofilmes pode ser confirmada segundo o estado fisiológico das células empregando-se sondas moleculares. O conteúdo de ribossomos estimado pela hibridização do RNA *in situ* reflete o estado fisiológico de crescimento das células, uma vez que maior quantidade de ribossomos indica maior atividade celular. Na ausência de nutrientes, portanto, espera-se que a concentração dos ribossomos seja baixa. Da mesma forma, o tamanho da célula e o conteúdo de DNA refletirão seu estado fisiológico e, portanto, a situação nutricional dos organismos (MOLLER *et al.*, 1995).

Alguns trabalhos realizados aplicando-se o método FISH em biodigestores ou sistemas de reação anaeróbios merecem destaque. Ramsing *et al.* (1993) e Santegoeds *et al.* (1998) mostraram que o uso integrado da técnica de FISH com microsensores realmente avalia relações entre estrutura e função nos biofilmes. Os resultados de ambos revelaram a distribuição vertical de organismos como bactérias redutoras de sulfato (BRS) ao longo dos sistemas, com formação de gradientes de gases medidos com microsensores nos biofilmes. O uso do FISH confirmou que a região de predomínio do sulfeto de hidrogênio, zona anóxica do biofilme, consistia no nicho da maior parte das BRS.

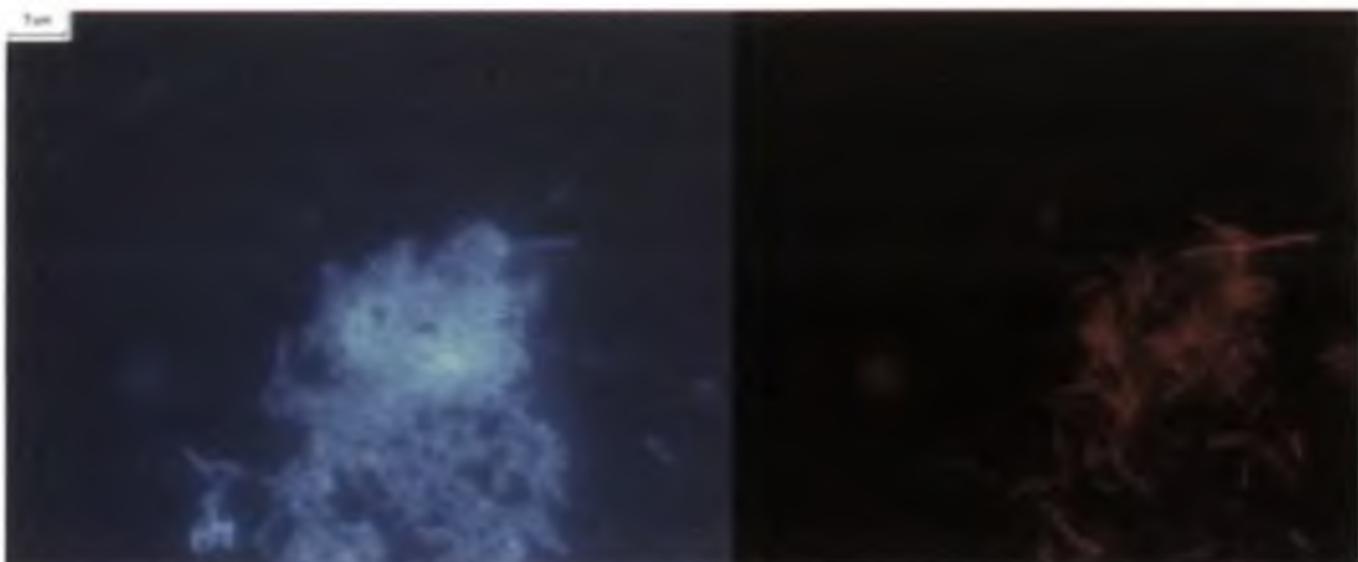


FIGURA 6. Micrografia de fluorescência de células de *Methanobacterium formicicum* (DSM 1535). Lado esquerdo: coloração com DAPI. Lado direito: FISH com a sonda MB1174, específica para membros da família *Methanobacteriaceae* (mesmo campo microscópico). A barra indica 5 μm . (Fonte: ARAÚJO, 2001).

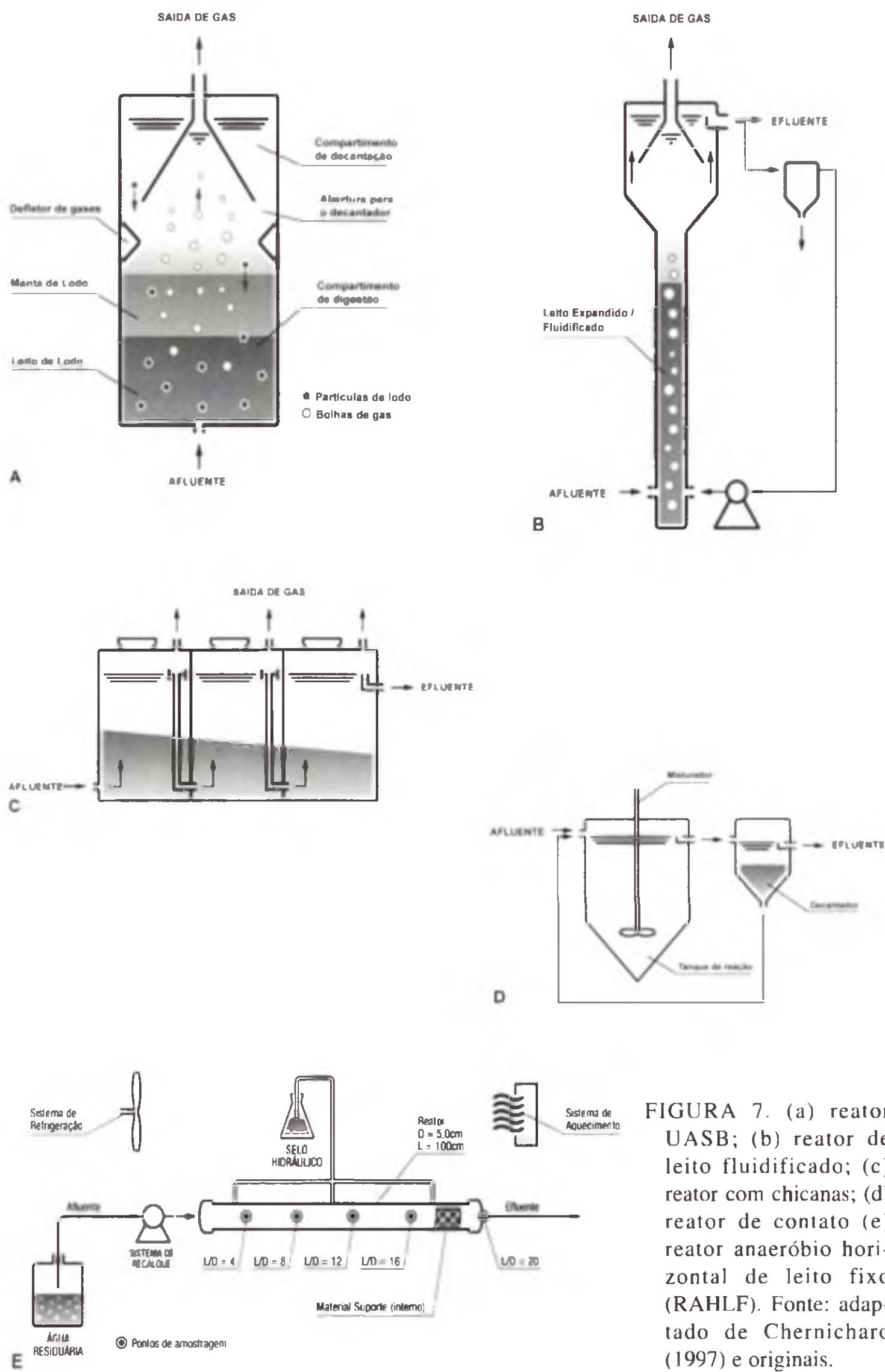


FIGURA 7. (a) reator UASB; (b) reator de leito fluidificado; (c) reator com chicanas; (d) reator de contato (e) reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Fonte: adaptado de Chernicharo (1997) e originais.

Uma outra verificação interessante foi a de Harmsen *et al.* (1996) que documentaram através do FISH a estrutura do lodo granular, além de afirmarem que essa organização celular está de fato relacionada à função dos microrganismos. Assim, avaliando-se um lodo granular proveniente de um reator UASB degradando sacarose, observou-se sua estrutura em três camadas, uma camada externa contendo principalmente bactérias, uma segunda camada formada por microcolônias de metanogênicas acetotróficas e microcolônias mistas contendo acetogênicas e metanogênicas utilizadoras de hidrogênio/formiato, e uma região central contendo cavidades, material inorgânico e microcolônias compostas de arquéias metanogênicas. Na primeira camada pode-se afirmar a presença de bactérias responsáveis pela conversão do açúcar em propionato, butirato e acetato, enquanto na segunda camada, outros organismos, acetogênicos e metanogênicos hidrogenotróficos encontravam-se sinteticamente justa-posicionados formando microcolônias, e constituíam a base para a conversão dos compostos propionato e butirato em acetato e metano. As metanogênicas acetotróficas presentes na vizinhança das microcolônias convertiam o acetato a metano e gás carbônico. Nessa direção, os resultados anteriormente descritos por Guiot *et al.* (1991) foram sem dúvida consolidados em relação a biodigestão anaeróbia de açúcares em reatores contendo biofilmes.

No Brasil, no início dos anos 2000, o monitoramento de biodigestores e sistemas contendo biofilmes através do FISH foi bastante intensificado. Araújo *et al.* (2000) e Araújo *et al.* (2004) acompanharam a formação de biofilmes desenvolvidos em diferentes tipos de superfícies, hidrofóbica e hidrofílica, verificando que culturas puras de arquéias metanogênicas comuns em sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuárias, como *Methanobacterium formicicum*, *Methanosaeta concilli* e *Methanosarcina barkeri*, colonizavam diferentes suportes em condições bastante semelhantes. Contudo, culturas mistas deram preferência a suporte hidrofóbicos, realçando a presença do tipo metanogênico *Methanobacterium* sp. Por sua vez, Montenegro *et al.* (2003) utilizaram o FISH para determinar a composição microbiana de grânulos anaeróbios formados em reator do tipo híbrido operado para degradar o organoclorado PCP. Os autores verificaram que as arquéias metanogênicas predominaram no lodo granular em concentrações de até 21 mg/L. As amostras revelaram baixo conteúdo de células pertencentes ao Domínio *Bacteria*, em sua maioria, relacionadas ao grupo BRS (sonda SRB385). Dentre as metanogênicas, foram encontradas somente membros da ordem *Methanosarcinales* (sonda MSMX860), sendo que *Methanosarcina* e *Methanosaeta* foram os gêneros dominantes, e esse último o que permaneceu no reator na maior concentração do composto.

5. Biotecnologia anaeróbia aplicada ao meio ambiente – a tecnologia da digestão anaeróbia

A tecnologia da digestão anaeróbia, ou comumente denominada no saneamento ambiental por biotecnologia anaeróbia, é amplamente difundida no Brasil e no mundo

para a estabilização de resíduos líquidos e sólidos. Sem dúvida, é uma das opções mais interessantes e atraentes para a despoluição ambiental, com subprodutos considerados nobres, como o gás metano e os ácidos orgânicos, esses últimos passíveis de extração do sistema de reação.

É realmente surpreendente a gama de reações anaeróbias na degradação de compostos poliméricos bastante conhecidos, como as proteínas, os polissacarídeos e os lipídeos, tão comuns nos resíduos lançados pelas atividades domésticas humanas, como os resíduos sólidos – lixo – que, em geral, são dispostos e estabilizados nos aterros sanitários. Embora esse sistema de disposição e tratamento de lixo não esteja relacionado no presente item, é importante comentar a importância dos microrganismos anaeróbios no processamento das reações de degradação que ocorrem em seu interior, em uma seqüência não muito distante da descrita na Figura 3A. Nesse caso, contudo, a etapa da hidrólise e fermentação constitui-se por uma fase essencial do processo, muitas vezes similar ao que sucede no interior de animais ruminantes (Figura 3C) e na qual a atividade de enzimas do complexo celulolítico, bem como de proteases e lítases, é fundamental à degradação do lixo sob metanogênese.

Nesse item, optou-se por enfatizar o tratamento anaeróbio de águas residuárias, sobretudo aquelas que contém compostos tóxicos ao ambiente. Essa preferência deveu-se às particularidades das reações de biodegradação apontadas no item 3, em sua maioria descritas para resíduos líquidos, e que podem ser ilustradas em diferentes tipos de reatores anaeróbios.

Os sistemas de tratamento de águas residuárias destinam-se à remoção de poluentes e contaminantes incorporados à água usada em residências e indústrias, no carregamento de resíduos entre outros. Os constituintes das águas residuárias, com características relacionadas à sua geração, podem acarretar danos ao ambiente quando atingem os corpos receptores. Essas características definem a complexidade dos sistemas de tratamento, constituídos por unidades dedicadas a operações e processos específicos para remoção dos poluentes.

Os processos biológicos de tratamento destinam-se à transformação da matéria orgânica biodegradável em biomassa, gases e subprodutos orgânicos e inorgânicos. Além da oxidação da matéria orgânica (de fácil ou difícil degradação, como dos compostos orgânicos tóxicos), a oxidação da amônia, a desnitrificação e a redução do sulfato são processos biológicos de interesse para estabilização de águas residuárias.

O avanço na utilização dos sistemas biológicos de tratamento deveu-se a desvinculação do tempo de detenção hidráulico (TDH), que representa o período de tempo médio de permanência do volume de água a ser tratada no reator, do tempo de retenção celular (TDC), que representa o tempo médio de residência dos microrganismos na unidade, reduzindo o volume das unidades. Os reatores com elevado potencial de retenção de biomassa ativa suportam cargas maiores, proporcionando maior rendimento do sistema, computado como massa removida por unidades de volume e tempo.

Os biorreatores que retêm elevada quantidade de biomassa, considerados de “alta taxa”, podem ser classificados com respeito:

1) à retenção de biomassa: reatores com biomassa suspensa; reatores com biomassa

imobilizada (auto-imobilizada ou como biofilmes em superfícies). Os reatores que utilizam biomassa suspensa requerem unidade de separação de sólidos e de retorno para manutenção da elevada concentração de sólidos requerida para estabelecimento do processo;

2) **Ao fluxo intermitente ou contínuo:** nos reatores com alimentação em batelada a conversão dos compostos e a separação do efluente tratado da biomassa são realizadas na mesma unidade; e assim, flexibilizam o reator, permitindo ampliar a fase de reação para atender o desempenho exigido, quando da variação de carga;

3) **Ao fluxo contínuo no tanque de reação:** podem operar sob regime de mistura completa, situação em que a água residuária e os microrganismos participantes do processo de degradação são mantidos homogeneizados, e sob fluxo pistonado, em que a arquitetura do reator impõe a variação da concentração da água residuária ao longo do reator - altura para reatores de fluxo vertical, e comprimento para os de fluxo horizontal.

Apesar da constatação, há mais de cem anos, da estabilização da matéria orgânica de sólidos retidos em reatores por longos períodos de tempo e sem a introdução de oxigênio, como nos tanques sépticos, foi somente na década de 80 que a tecnologia anaeróbia consolidou-se como alternativa para o tratamento de águas residuárias. Um dos principais responsáveis para essa evolução do sistema anaeróbio foi o desenvolvimento do “reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente – UASB” por Lettinga *et al.* (1980). A elevada retenção de biomassa (células auto-imobilizadas), a redução do volume de reatores comparado aos filtros biológicos (que utilizam material suporte) e o reduzido consumo de energia em relação aos reatores de leito fluidificado fomentaram a utilização da tecnologia, especialmente para águas residuárias concentradas.

O impulso da biotecnologia anaeróbia para o tratamento de águas residuárias estabeleceu-se, principalmente, pelo reduzido consumo energético, uma vez que dispensa a introdução de oxigênio, assim como pela reduzida geração de material sólido (lodo), em função da transformação de parcela expressiva do conteúdo orgânico em biogás. Outro aspecto relevante para a escolha do tratamento anaeróbio relaciona-se à possibilidade de interrupção do processo por longos intervalos de tempo, como na geração sazonal de efluentes em indústrias tais como as usinas de produção de açúcar e álcool. Mais recentemente, contudo, foi a observação da redução dos níveis de compostos tóxicos presentes em águas residuárias pelo tratamento biológico anaeróbio que ampliou enormemente sua aplicação.

A Biotecnologia Anaeróbia tem sido estimulada pela necessidade de sistemas de tratamento de resíduos sustentáveis, ou seja, que reduzem a poluição consumindo menos energia e gerando energias e/ou subprodutos alternativos. Na Figura 7 estão apresentados os esquemas dos principais reatores utilizados nos sistemas anaeróbios de tratamento de águas residuárias, o reator UASB, comentado, o reator de leito fluidificado, que retém a biomassa aderida a suportes como grãos de areia, o reator com chicanas, pelo qual o líquido a ser tratado atravessa o sistema de reação em chicanas, o reator de contato, que permite o retorno de lodo ao sistema de reação e,

finalmente, o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), atualmente bastante estudado para a estabilização de resíduos líquidos tóxicos. Em comum, esses sistemas possuem formas de imobilizar a biomassa e garantir a manutenção de sua elevada concentração no sistema. O material suporte ou a forma de imobilização da biomassa possibilita a formação dos biofilmes, e pode facilitar a seleção de microrganismos e protegê-los contra agentes tóxicos.

Ainda, entre os sistemas de tratamento de resíduos líquidos que integram a tecnologia anaeróbia estão as lagoas anaeróbias, consideradas unidades de baixa carga ($TDH = TDC$). As lagoas anaeróbias, em geral, compõem sistemas de tratamento por lagoas em série, sendo responsáveis principalmente pela retenção da parcela de sólidos em suspensão e sua estabilização. Essa opção tem sido adotada em locais com elevadas temperaturas, disponibilidade de área a custos compatíveis e afastadas de sítios habitados.

Os insucessos do processo anaeróbio estão relacionados a eficiências de remoção de matéria orgânica aquém do potencial de biodegradabilidade e à instabilidade operacional, quando submetido a cargas de choque de origem orgânica, de tóxicos, entre outras. O potencial de geração de odores desagradáveis, principalmente de águas residuárias com formas oxidadas de enxofre, contribuiu no passado para desmotivar a implantação da tecnologia.

Estudos fundamentais sobre os processos de conversão envolvidos e o projeto e aprimoramento de reatores biológicos visando proporcionar processos de partida mais expeditos e a estabilidade dos sistemas, têm sido continuamente desenvolvidos. Entre os desafios para a extensão da utilização da tecnologia anaeróbia, estão as aplicações no tratamento de águas residuárias diluídas, as contendo formas oxidadas de enxofre e compostos orgânicos considerados tóxicos.

A compreensão dos processos bioquímicos envolvidos no processo de degradação anaeróbia da matéria orgânica complexa, desejada para auxiliar no projeto de reatores segundo critérios racionais, é dificultada pela escassez de dados, principalmente pela indisponibilidade de ferramentas analíticas. Por exemplo, a caracterização da água residuária a ser tratada é realizada basicamente por análises do conteúdo de sólidos, da matéria orgânica em geral, analisada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), série de nitrogênio (total, amoniacal, nitrito, nitrato), sulfato, sulfeto, metais, considerados parâmetros importantes, especialmente em função do padrão de emissão. Essa caracterização simplificada impede, por exemplo, a interpretação da interrupção do processo de degradação.

5.1 Utilização da tecnologia anaeróbia para o tratamento de águas residuárias com conteúdo orgânico de “fácil degradação”

Um levantamento recente aponta que cerca de 1000 reatores UASB estão em operação no Mundo, principalmente para o tratamento de águas residuárias industriais (Biothane Systems-International, 1998). No Brasil, grandes esforços têm sido despendidos a fim de consagrar a o tratamento anaeróbio de resíduos líquidos, sobretudo as águas residuárias de origem doméstica.

Dados da Cetesb (1999) indicaram que 228 reatores UASB estão em operação no Brasil, sendo 67 unidades destinadas ao tratamento de esgotos sanitários. Os demais 161 reatores UASB estão em instalações industriais, entre elas 138 implantadas na indústria alimentícia. Na Tabela 3 estão apresentados exemplos da utilização da tecnologia citada.

Para avaliação do potencial do processo anaeróbio de tratamento de águas residuárias industriais, o procedimento deve ser cuidadoso, sob pena de torná-lo uma solução pouco atrativa ou inviável. Fatores ambientais, como temperatura, a composição da água residuária (presença de óleos de graxas, material facilmente hidrolisável, concentração, presença de compostos tóxicos, entre outros) e as cargas (orgânica e hidráulica) aplicadas são determinantes para a avaliação do potencial de degradação de um efluente de origem industrial.

Águas residuárias de indústrias similares podem apresentar características diferenciadas em função do processo de fabricação adotado, da política de consumo de água, de planos de reuso da água, da procedência da matéria-prima entre outros. A característica da água residuária pode requerer unidades prévias de tratamento para permitir a operação do reator anaeróbio, e possibilitar todo seu potencial em um menor volume de sistema. Além disso, as estratégias operacionais no período de partida e durante sua manutenção contribuem para a eficiência do processo. De maneira geral, as eficiências de remoção de matéria orgânica biodegradável utilizando a biotecnologia anaeróbia podem variar de 60 a 95%.

O uso do sistema UASB no Brasil requer, muitas vezes, um sistema complementar de tratamento, em função do atendimento à legislação ambiental de caráter sanitário. Para o tratamento de esgotos de origem doméstica, por exemplo, o emprego do UASB pode prescindir dos sistemas primários de tratamento, reduzindo a área requerida para implantação de decantadores, mas pode necessitar de reatores aeróbios para a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e patógenos. Além disso, a tecnologia UASB tem como limitação a velocidade ascensional e a incerteza da granulação e, portanto, os reatores anaeróbios estão em constante aprimoramento com vistas a ampliar os limites de sua aplicação.

TABELA 3. Exemplos da utilização da tecnologia UASB para tratamento de efluentes industriais no Brasil.

Efluente	Concentração* (mg/L de DQO)	CO** (kg DQO/m ³ /dia)	TDH (h)	Ef. remoção Média (%)	Fonte
Abatedouro de aves	3200-4300	1,5-2,5	16-12	70	(1)
Conservas vegetais	120-800	1,5	8,0	60-80	(2)
Reciclagem de papel	2000-6000	2,7-7,0	180	70-72	(3)
Refrigerantes	1500	1,8	20	95	(4)
Usina de açúcar e álcool	27000	22,0	48	72	(5)

*DQO: Demanda Química de Oxigênio, utilizada para determinação indireta do conteúdo de matéria orgânica; **CO, Carga orgânica aplicada ao reator, que representa o potencial do sistema para remoção de matéria orgânica. Temperatura mantida entre 20 e 35°C, exceto para (5), que foi de 55°C. Fontes: (1) Del Nery *et al.* 2001; (2) Camacho, 1986; (3) Del Nery, 1996; (4) Coiado, 1994. (5) Souza, 1991.

5.2 Utilização da tecnologia anaeróbia para a degradação de compostos orgânicos tóxicos

O aporte de substâncias tóxicas de origem natural ou sintética acarreta danos ao ambiente. A persistência de uma substância, intimamente relacionada à sua biodegradabilidade, é um conceito relativo: na natureza, um composto é considerado recalcitrante ou persistente quando permanece no ambiente por meses ou anos; em sistemas de tratamento de efluentes este período é de dias ou horas. Compostos orgânicos podem ser classificados em:

Compostos alicíclicos ou aromáticos: são compostos orgânicos que possuem pelo menos um núcleo benzênico;

Compostos alifáticos: são compostos de cadeia aberta, conhecidos como alcanos, alcenos e alcinos em função das ligações entre os átomos de carbono presentes na molécula.

Os danos ocasionados ao ambiente pela presença de resíduos tóxicos vêm motivando a engenharia sanitária e ambiental a avançar e/ou inovar no emprego de tecnologias de tratamento de resíduos. Regulamentações governamentais e pressões de mercado têm proporcionado a alteração de processos que utilizam ou geram compostos perigosos como ação de longo prazo. Entretanto, a existência de sítios contaminados e o desconhecimento de subprodutos gerados nas indústrias químicas reclamam a aplicação de medidas mitigadoras.

Processos físico-químicos, arraste com ar e adsorção em carvão ativado, escavações e isolamento hidrodinâmico ou imobilização com agentes químicos são técnicas freqüentemente aplicadas à recuperação de áreas contaminadas e no tratamento de resíduos de difícil degradação. Contudo, segundo vários autores, as técnicas de tratamento de resíduos que não transformam o composto não reduzem seus riscos potenciais.

A biodegradabilidade é um dos fatores limitantes do tratamento de compostos tóxicos e, portanto, deve ser considerada na elaboração de projetos de tratamento. As limitações para biodegradação de compostos aromáticos, por exemplo, estão associadas a fatores intrínsecos, como a ausência de grupos funcionais, relacionada à estrutura do composto, à biodisponibilidade, relativa à solubilização dos compostos de elevadas massas moleculares e demais condições ambientais, e às condições biológicas, como a presença de microrganismos aptos e adaptados à molécula-alvo. Assim, a biodegradação necessita que os compostos estejam biodisponíveis e que os microrganismos participantes possuam mecanismos de ataque às moléculas, ou seja, possuam sistemas enzimáticos apropriados.

A utilização da tecnologia anaeróbia no tratamento de compostos tóxicos é realmente atraente devido à capacidade dos microrganismos em destruir moléculas complexas, convertendo-as em produtos inócuos ou menos tóxicos. Soma-se a isso, a tolerância superior dos anaeróbios em relação aos aeróbios na estabilização dos tóxicos

(KING, 1988). Porém, é fato que o tratamento de resíduos líquidos tóxicos pode se dar na emissão da fonte poluente empregando-se um dos vários modelos de biorreatores, como os apresentados na Figura 7.

Os recentes estudos sobre a biodegradação de tóxicos no ambiente revelam que o comportamento lento dos microrganismos merece especial atenção nos procedimentos de aplicação dos processos de engenharia, notadamente em relação ao contato entre o poluente e os microrganismos aptos à degradação. As práticas mais avançadas nesse sentido têm sido organizadas em um conjunto de sistemas que compõem a biorremediação de áreas, tanto diretamente nos sítios contaminados (*in situ*) ou em biorreatores (*ex situ*), com o objetivo de reduzir a concentração dos poluentes para limites seguros e de acordo com a legislação.

Entre os compostos orgânicos de difícil degradação e de interesse abordados no presente item estão o percloroetileno (PCE), o tricloroetileno (TCE), o pentaclorofenol (PCP), o fenol, o grupo BTX (benzeno, tolueno e xilenos) e o formaldeído. A causa principal dessa preferência é o aporte significativo desses compostos no ambiente e, consequentemente, seu impacto na qualidade de vida.

5.2.1 Compostos orgânicos halogenados

Muitos compostos xenobióticos ambientalmente importantes em função de sua toxicidade inerente são halogenados, característica que freqüentemente determina sua persistência em ecossistemas. Dentre estes, bem conhecidos e estudados estão os compostos clorados. O interesse nesses compostos foi possivelmente devido à alta publicidade dada aos problemas causados por pesticidas, entre eles o DDT e por numerosos solventes industriais.

Compostos organo-halogenados consistem de moléculas de hidrocarbonetos que contém pelo menos um átomo de halogênio: F, Cl, Br ou I. Exibem uma grande variedade de propriedades físicas e químicas, tornando-os componentes de uma vasta gama de produtos químicos utilizados na indústria, agricultura e no uso doméstico e hospitalar.

Por conveniência, os hidrocarbonetos halogenados são agrupados em três classes: alifáticos, policíclicos e aromáticos. Os compostos alifáticos halogenados podem ser considerados solúveis em água, sendo potencialmente contaminantes do solo e das águas subterrâneas. São exemplos, alcanos clorados como triclorometano e o tricloroetileno. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são praticamente insolúveis em água, não polares, solúveis em gorduras e inertes, e são constituintes e produtos de combustíveis fósseis. DDT (de uso proibido devido à sua toxicidade a seres humanos e animais). Os compostos aromáticos clorados representam os principais poluentes ambientais em virtude de sua larga utilização como biocidas até recentemente, e das quantidades substanciais que ainda são introduzidas no ambiente. São exemplos os compostos fenólicos clorados utilizados na preservação de madeira, herbicidas, fungicidas, biocidas em geral e compostos benzênicos, utilizados com fumigantes, na produção de pesticidas e tinturas. A utilização de compostos organoclorados foi proibida em muitos países.

Geralmente, o passo inicial para a biodegradação de compostos halogenados é a reação de desalogenação redutiva de uma molécula que se dá através da:

Hidrogenólise: reação na qual a ligação carbono-halogênio é quebrada e um átomo de halogênio é substituído pelo hidrogênio após a inserção de um próton e dois elétrons;

Dialoeliminação: reação na qual dois halogênios são removidos de átomos de carbono adjacentes e, ao mesmo tempo, forma-se uma ligação dupla entre os átomos de carbono pela inserção de dois elétrons;

Reação de acoplamento: ligação entre dois radicais livres, eliminando-se um halogênio e inserindo-se dois elétrons. Todos mecanismos de transformação da molécula orgânica halogenada passíveis de mediação microbiana, como abordado no item 3.

5.2.2 Compostos aromáticos halogenados

Entre os compostos aromáticos halogenados de interesse ambiental está o pentaclorofenol (PCP), biocida de largo espectro e de persistência, amplamente utilizado no Brasil durante décadas na formulação de agroquímicos, que persiste em sítios contaminados em função de técnica de disposição inadequada e lançamentos acidentais. Em função dos efeitos deletérios causados ao ambiente, sua produção e uso foram proibidas em muitos países. No Brasil, a utilização de PCP em produtos agrotóxicos foi proibida de acordo com a Portaria número 329 do Ministério da Agricultura de 02/29/1985, e seu transporte, estocagem e uso foram declarados atividades potencialmente poluidoras segundo a Resolução número 5 do CONAMA de 20/11/1985.

Compostos organoclorados atingem o ambiente também como subprodutos de alguns processos utilizados mundialmente, tais como o branqueamento da celulose em indústrias de papel, e os processos de desinfecção de água e esgoto por cloro ou hipoclorito de sódio. Em função de sua concentração no ambiente, há necessidade de implementação de técnicas efetivas para recuperação das áreas degradadas e para o tratamento de efluentes.

A remoção de clorofenóis do meio ambiente pode ocorrer por processos físicos-químicos (“stripping”, adsorção em carvão ativado ou imobilização com agentes químicos), possibilitando a recuperação de áreas contaminadas e o tratamento de resíduos de difícil degradação. No entanto, essas tecnologias facilitam apenas a transferência do composto de um meio para o outro com significativo aumento em sua concentração. No entanto, a biodegradação desta classe de compostos resulta em compostos menos tóxicos (MOHN & TIEDJE, 1992) e pode ocorrer por processos aeróbio ou anaeróbio, sendo os compostos mais clorados degradados preferencialmente pelo metabolismo anaeróbio.

Nos ambientes anaeróbios como referido nos itens anteriores, a degradação de compostos orgânicos halogenados ocorre pela ação de consórcios de microrganismos, iniciando-se pela desalogenação redutiva do anel aromático, sua quebra e, finalmente, produzindo metano e dióxido de carbono (BOYD & SHELTON,

1984; MIKESELL & BOYD, 1986; DIETRICH & WINTER, 1990). Um dos aspectos fundamentais da ação microbiana centra-se nas vias que permitem a quebra do composto halogenado com fins de síntese celular, ou mesmo seu uso em mecanismos respiratórios; mas, é fundamental para a transformação do composto halogenado a presença de doadores de elétrons específicos, também apontados como co-substratos.

Particularmente, a desalogenação redutiva anaeróbia de compostos altamente clorados, como o PCP, foi observada originalmente em consórcios microbianos crescidos sob condições metanogênicas e sulfidogênicas (HAGGBLÖM, 1992; MONTENEGRO *et al.*, 2001). A desalogenação é progressiva e produz intermediários menos clorados, como os tetraclorofenóis (TeCPs), triclorofenóis (TCPs), diclorofenóis (DCPs) e monoclorofenóis (CPs), como mostrado na Figura 8. A Figura apresenta um esquema da reação de desalogenação redutiva anaeróbia do composto PCP como proposto por Madsen & Aamand (1991), no qual os passos de perda do íon cloro com substituição pelo hidrogênio ocorrem em seqüência mediadas por um ou mais tipos microbianos. Em geral, o di-clorofenol é gerado com um dos produtos finais, sendo sua quebra derivada de associações sintróficas entre culturas - co-culturas, em que uma é metanogênica (Figura 9).

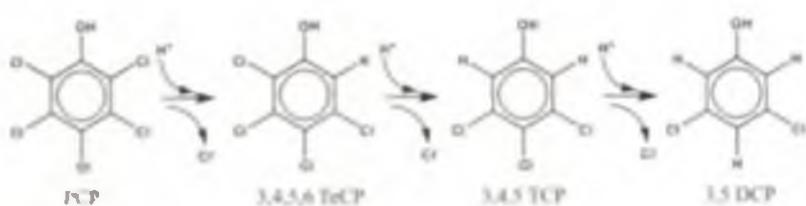


FIGURA 8. Modelo de desalogenação anaeróbia de PCP proposto por Madsen & Aamand (1991).



FIGURA 9. Esquema para a interação microbiana anaeróbia na degradação do 2,6 DCP a partir da atividade dos consórcios crescidos sob condições de anaerobiose estrita e halofílica - Rotas metabólicas para cada etapa do consórcio metanogênico. Fonte: Nakayama, 2005.

Há alguns anos, Madsen & Aamand (1991) apontam que os intermediários da degradação de clorofenóis sob metanogênese são o fenol, o benzoato e ácidos orgânicos. Particularmente, a maioria das publicações sobre a degradação do fenol descreve o benzoato como metabólito intermediário principal em direção à formação do metano. A quebra do benzoato resulta em ácidos orgânicos, numa seqüência muito semelhante ao que se observa na Figura 3A.

Na Tabela 4 apresentam-se os resultados reportados na literatura com relação à remoção de PCP presente em águas residuárias sintéticas em biorreatores anaeróbios operados em escala de laboratório. Os tipos de biorreatores são listados, bem como as concentrações do PCP e condições operacionais estudadas nos sistemas, com destaque para o UASB. São também referidos os co-substratos principais à desalogenação redutiva, nos quais realça-se a glicose.

TABELA 4. Resultados reportados na literatura relativos à degradação de clorofenóis em reatores anaeróbios.

Autores	Tipo de reator	R.PCP (mg/L.d)	[PCP] (mg/L)	TDH (d)	CO (gDQO/L.d)	Substratos (co-substratos)	Metabólitos
Shen <i>et al.</i> (2005)	UASB	140,7	180	1,0	3,56	Sacarose	Não estudado
Montenegro, <i>et al.</i> (2001)	Reator híbrido	16,8	21	1,3	6,88	Metanol, Hac, HPr, Hbu, Hac.	Não estudado
Tartakovisk <i>et al.</i> (1999)	UASB	70	80	1,2		Sacarose, Hbu, etanol	3-CP
Khodadoust, <i>et al.</i> (1997)	GAC	0,4	1333	9,3	6,3	Etanol	3-CP, 4-CP
Tsuno <i>et al.</i> (1996)	GAC	80,0	400	5	0,34	Acetato de sódio	Traços de TeCP, TCP, DCP e CP
Duff <i>et al.</i> (1995)	UASB	0,33	1	2-3	0,4	Fenol	DCP
Wu <i>et al.</i> , (1993)	UASB	97	60		16,2	Metanol, Hac, HPr, Hbu	Não detectado
Hendriksen <i>et al.</i> , (1992)	UASB	2,20	3	2-3	0,4	Glicose	DCP
Hendriksen <i>et al.</i> (1991)	Reator com biomassa imobilizada	0,7	2	2-3	0,4	Glicose	TCP
Damianovic <i>et al.</i> 2004)	HAIB	4,15	8	0,75	1,7	Glicose, HAc, HFo	DCP
Saia <i>et al.</i> (2005)	HAIB	10,40	20	0,75	0,5	Glicose, HFo	Não detectado

R.PCP: carga de PCP aplicada ao reator por dia; CO: carga orgânica aplicada ao reator por dia; TDH: tempo de detenção hidráulica; GAC: reator de leito fluidizado com carvão ativado como material suporte; HAIB: reator anaeróbio horizontal de leito fixo; HAc: ácido acético, HFo: ácido fórmico, Hbu: ácido butírico, HPr: ácido propionílico; CP: monoclorofenol, DCP: diclorofenol, TCP: triclorofenol, TeCP: tetraclorofenol; Eficiência de remoção de DQO ~100%, exceto: > 95% para Khodadoust *et al.*, 1997; > 92% para Montenegro *et al.*, 2001; > 90% for Tartakovisk *et al.*, 1999; Eficiência de remoção de PCP ~99%.

5.2.3 Compostos alifáticos halogenados

Entre os compostos alifáticos halogenados destacam-se no emprego da tecnologia anaeróbia para sua transformação e/ou mineralização, o percloroetileno (PCE) e o tricloroetileno (TCE), considerados os mais comuns contaminantes clorados de águas subterrâneas em função de sua ampla aplicação nos últimos 100 anos como solvente e desengraxante, particularmente na indústria metalúrgica, além de compor produtos de limpeza doméstica para a remoção de tintas e lavagens de tapetes e à seco. Alguns resultados sobre a adequada performance de biodigestores anaeróbios na estabilização do composto PCE podem servir de exemplo, como os de Prakash & Gupta (2000), os quais demonstraram a efetiva aplicação do reator UASB (esquema da Figura 7A) na remoção de 98% de resíduos contendo até 50 mg/L do composto.

Sob condições anaeróbias, o PCE e o TCE podem ser mineralizados conforme modelo proposto por Vogel & McCarty (1985) e apresentado na Figura 10. No esquema, se observam os passos para a completa degradação dos compostos à dióxido de carbono. Na Figura não se indica a produção do metano, embora a degradação desses alifáticos também possa levar à formação de ácidos orgânicos intermediários aos substratos preferenciais dos organismos metanogênicos.

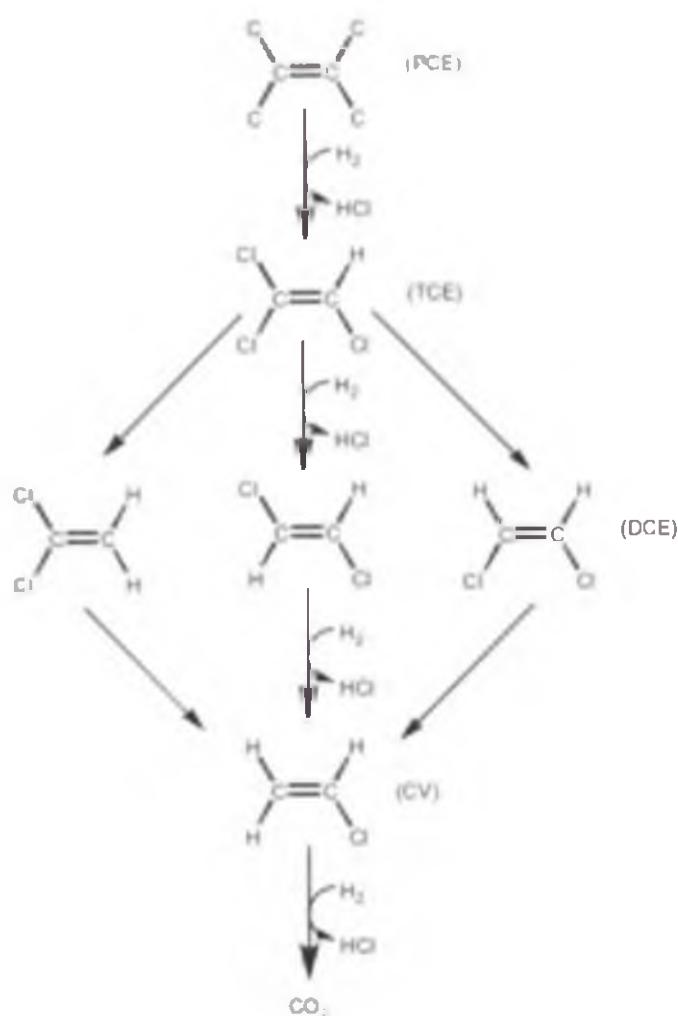


FIGURA 10. Esquema da biotransformação do PCE a CO₂, envolvendo a desalogenação redutiva, como proposto por Vogel & McCarty (1985).

TCE em etileno em reator anaeróbio contendo metanol e hidrogênio.

Um dos efeitos importantes da biodegradação de tóxicos para o meio ambiente é resultar na liberação de compostos que ainda mantém elevado nível de toxicidade. Esse é o caso do cloreto de vinila, utilizado como material para manufatura de produtos de plástico polivinilclorado e gerado como intermediário na rota de degradação anaeróbia do TCE. Esse composto apresenta toxicidade superior ao TCE e, portanto, requer estímulo à sua completa estabilização. A desalogenação reduutiva anaeróbia do cloreto de vinila ocorre sob anaerobiose resultando na produção do eteno, e seu mecanismo celular envolve enzimas ligadas à membrana de certas espécies anaeróbias. Os resultados de Holliger *et al.* (1999) com *Dehalobacter restrictus*, comentados no item 3, auxiliaram a revolução ocasionada sobre a bioquímica energética da desalogenação reduutiva, na qual os mecanismos respiratórios são fundamentais para certos organismos desalogenadores (Figura 5B).

Nos últimos anos, várias foram as espécies de arquéias metanogênicas (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium* sp., *Methanococcus deltae*, *M. thermolithotrophicus*, *Methanosarcina* sp. linhagem DCM e *M.mazei*) e de bactérias anaeróbias (*Desulfotomaculum* sp., *Desulfovibrio* linhagem DCB-1, *Acetobacterium woodii* e *Desulfitobacterium frappiere* TCE1) relacionadas à desalogenação reduutiva do PCE e do TCE (Fatibello,

A revisão das pesquisas sobre a degradação anaeróbia do PCE e do TCE revela que o processo anaeróbio sob metanogênese para o tratamento desses compostos, tanto em biorreatores como nas práticas de biorremediação de águas subterrâneas, é uma das alternativas mais promissoras (VOGEL & MCCARTY, 1985; BELAY & DANIEL, 1987; FREEDMAN & GOSSET, 1989). Os trabalhos de Egli *et al.* (1987), Fathepure *et al.* (1987) e Fathepure & Boyd (1988a, b) constataram que a biotransformação do PCE e TCE sob metanogênese ocorre na presença de espécies como *Methanosarcina mazaei*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* e *Methanosarcina* sp. linhagem DCM. A necessidade de doadores de elétrons como hidrogênio, formiato, acetato, glicose e metanol são relevantes para a ocorrência da desalogenação reduutiva dos compostos. Di Stefano *et al.*, (1992) consagraram o papel fundamental das metanogênicas no equilíbrio da biotransformação do PCE e

2000). Culturas como *Dehalococcoides ethenogenes* 195 e *Dehalospirillum multivorans* foram posteriormente relatadas por Maymó-Gatell *et al.* (1995) e Maymó-Gatell *et al.* (1999) como responsáveis pela bioconversão anaeróbia desses compostos em reatores de leito fluidificado contendo biofilmes (esquema da Figura 7B), bem como os autores verificaram que lodos granulados de sistemas UASB (esquema da Figura 7A) foram capazes de degradar o PCE a metano na presença das espécies de *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp.

5.2.4 Outros compostos orgânicos tóxicos

Compostos aromáticos estão presentes em muitos produtos derivados do petróleo e são amplamente utilizados nas sínteses orgânicas. Os fenóis são compostos que formam a estrutura básica de uma grande variedade de produtos orgânicos. São considerados compostos orgânicos poluentes devido às suas características ácida e tóxica aos organismos vivos. São encontrados em compostos de origem natural, como no petróleo, em corantes naturais, em óleo de sedimentos rochosos, entre outros, constituindo em resíduo da indústria petroquímica, da atividade mineradora, da indústria de conversão do carvão, entre outros. O aporte ao ambiente é proporcionado também pela sua presença em resíduos sintéticos, nos quais compõem a estrutura básica, como corantes, pesticidas, produtos farmacêuticos, entre outros. A vinhaça, gerada nos processos de produção de açúcar e álcool também contém compostos fenólicos.

A estrutura química dessa classe de compostos, como por exemplo, os grupos funcionais, a volatilidade, solubilidade, características de adsorção, entre outros, está associada ao destino desses compostos no ambiente. Os compostos aromáticos encontram-se em número expressivo de fontes potencialmente poluidoras das águas (Tabela 5), como apontado por Kruman & Paruchuri (1997). Os corpos d'água são, em geral, contaminados por compostos fenólicos carreados dos solos agrícolas ou de esgotos e efluentes industriais. Em concentrações entre 5 a 35 mg/L são considerados letais a organismos aquáticos superiores.

Dentre os compostos aromáticos de interesse ambiental estão também os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), componentes dos derivados de petróleo, presentes em águas subterrâneas e superficiais devido às contribuições acidentais, vazamentos de tanques de armazenamento de combustíveis e de tubulações, o que certamente compromete os recursos hídricos. Gusmão *et al.* (2005), estudando a biodegradação de BTEX em RAHLF (Figura 7E), revelaram a remoção de quase 95% na presença de etanol, destacando os consórcios anaeróbios formados por organismos desnitritificantes *Paracoccus* sp. e *Variovax* sp., além de espécies em geral não cultiváveis.

Por sua vez, o formaldeído é um composto orgânico alifático de interesse ambiental, que embora apresente toxicidade leve aos organismos aquáticos tem aporte expressivo ao ambiente em função de sua vasta utilização, requerendo providências previamente à sua descarga no ambiente. O formaldeído é um intermediário importante na síntese de compostos orgânicos e na indústria de plásticos e resinas utilizados na produção de laminados e aglomerados de madeira. É utilizado em uma grande variedade

de processos industriais, como na indústria de papel e ingrediente ativo em desinfetantes e conservantes. O tratamento anaeróbio desse composto tem resultado em uma alternativa segura e atraente. Na Tabela 6 estão apresentados estudos em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (HAIB) em escala de bancada para o tratamento de águas contendo os compostos orgânicos fenol, BTEX e formaldeído.

A utilização de reatores com alimentação contínua pode favorecer a degradação dos tóxicos, minimizando o acúmulo do composto original e seus derivados intermediários. A elevada retenção de biomassa nos sistemas apontados, associada à capacidade de adsorção do meio suporte pode aumentar o tempo de retenção da substância, por vezes requerida para degradação e manutenção da estabilidade do sistema.

TABELA 5. Águas resíduárias contendo compostos aromáticos.

Fontes	Compostos fenólicos de interesse
Refinaria de petróleo	Hidrocarbonetos (alcanos, cicloalcanos, hidrocarbonetos poliaromáticos, benzenos, toluenos, xilenos, n-octanos, n-decanos, naftalenos, bifenilas, fenol)
Petroquímicas	Naftaleno, heptanos, benzenos, butadieno, álcoois C4, fenol e resorcinol
Refinaria de carvão	Pirogalol, hidrocarbonetos poliaromáticos, piridinas, picolinas, lutidinas, xilenos, toluenos, ácido benzóico
Indústria química básica	m-aminofenol resorcinol, dinitrofenol, p-nitrofenol, trinitrofenol, ácidos benceno-sulfônicos, anilina, clorobenzenos, tolueno
Indústria farmacêutica	Truenos, alcohol benzílico, ácido fenil acético, pridutos clorados do benceno, clorofórmio, éter, álcool etílico
Indústria de polpa de papel	Ácido protecatólico, ácido benzóico, guaicóis, catecol, álcool coniferil, ácido fenil propiônico, fenóis e clorofenóis
Curtumes	Taninos, catequina, fenol, clorofenol, nitrofenol
Indústria de agroquímicos	Clorofenóis, fenóxi-ácidos, amino aromáticos, nitroaromáticos, PCBs
Fabricação de plásticos	estireno
Fabricação de corantes	azo aromáticos, nitroaromáticos, amino aromáticos
Detergente e surfactantes	sulfo aromáticos, alquilfenóis
Fluidos hidráulicos	hidrocarbonetos cloroaromáticos e PCBs

PCBs = bifenilos policlorados. Fonte: baseada em Kumaran & Paruchuri, 1997.

TABELA 6. Resultados apresentados na literatura relativos à remoção de compostos tóxicos aromáticos por processo anaeróbio.

Autor	Compostos orgânicos tóxicos	Concentração (mg/L)	Co-substrato	TDH (horas)	Remoção (%)
Bolânos <i>et al.</i> , (2001)	fenol	1200	-	12	99
de Nardi <i>et al.</i> , (2002)	BTEX	10	etanol	12	90
Ribeiro (2005)	BTX	40	etanol	16	95
Oliveira <i>et al.</i> , (2004)	formaldeído	1200	-	12	95

A remoção por biodegradação dos compostos orgânicos tóxicos citados nos estudos apresentados permite inferir sobre o potencial de aplicação da tecnologia anaeróbia para minimização dos efeitos deletérios desses compostos ao ambiente. Pode ser vislumbrada a possibilidade de inserção desses reatores como sistemas de tratamento quando da geração de efluentes com tóxicos orgânicos, ou mesmo para biorremediação de áreas contaminadas.

A adequação de fatores ambientais nos reatores, como: pH, potencial redox, manutenção da comunidade de microrganismos aptos, obtida através de adaptação aos compostos, tem sido exaustivamente buscada, embora a complexidade do processo exija ainda muitos estudos.

5.3 Tratamento de águas residuárias contendo formas oxidadas de enxofre

Os principais problemas ambientais que influenciam o caminho do enxofre na natureza relacionam-se às atividades antropogênicas, como a formação da chuva ácida ($\text{H}_2\text{SO}_4^{2-}$), odores emanados de ambientes anaeróbios (H_2S), corrosão de aço e concreto, liberação de metais pesados de sedimentos e minérios expostos ao ar. Uma outra fonte poluente encontra-se nas águas residuárias com elevadas concentrações de sulfato devido a processos industriais que utilizam compostos sulfurosos no processamento de seus produtos ou que estejam presentes em sua matéria-prima. Portanto, essas águas ricas em compostos sulfurosos contribuem significativamente para o desequilíbrio do ciclo do enxofre na natureza.

Entre os compostos sulfurosos utilizados industrialmente estão o ácido sulfúrico (indústria alimentícia para correção do pH, agente de digestão em processo “Kraft” de indústria de papel), o tiossulfato (indústria de fotos, no branqueamento em indústria de papel), o sulfeto de sódio (em curtumes), o dióxido de enxofre (branqueamento de açúcar ou como seqüestrador de oxigênio). Por sua vez, as formas de enxofre menos oxidadas podem ser transformadas em sulfato nos sistemas de tratamento aeróbios. Nas indústrias de processamento de alimentos marinhos e de petróleo, o sulfato é encontrado nas diferentes fontes de matéria prima (SPANJERS *et al.*, 2001; OMIL *et al.*, 1997).

Basicamente, existem dois grupos de águas residuárias com elevadas concentrações de sulfato que merecem tratamento especial: efluentes com altas concentrações de sulfato com baixíssimos teores de matéria orgânica, derivados, por exemplo, da produção de ácido sulfúrico, lavagem de gases ácidos e de lixiviados de mineração; efluentes contendo sulfato e matéria orgânica, derivados de usinas de fermentação alcoólica, curtumes, refinarias de óleo; indústria de papel e celulose, entre outros.

A poluição causada por compostos de enxofre em águas residuárias não é intensamente abordada tal como a derivada dos compostos orgânicos e dos nutrientes nitrogênio e fósforo, principais alvos, nas últimas décadas, da aplicação de diferentes processos para sua remoção. Entretanto, a atual tendência de reúso de águas residuárias industriais, que pode apresentar acúmulo de sais como o sulfato, impõe a adequação

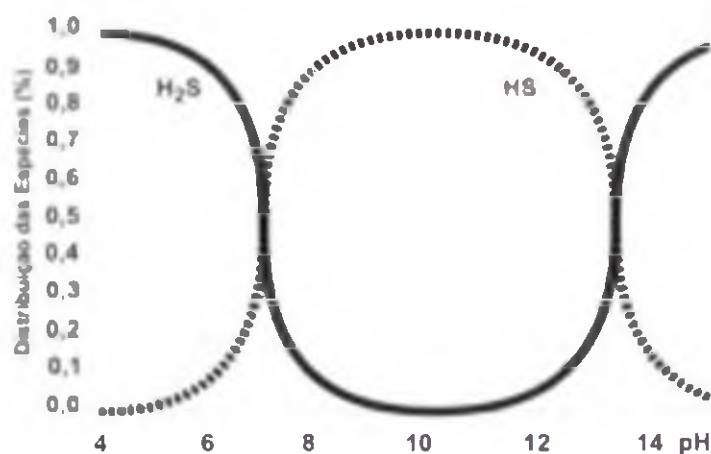


FIGURA 11. Diagrama de equilíbrio do sulfeto em função do pH.

metanogênicas e as bactérias redutoras, permitindo que o metabolismo de um ou outro grupo microbiano se sobressaia. O item 3 realça particularidades dessa importante interação microbiana.

Para o controle do sulfato em biorreatores, aplica-se uma relação entre os teores de matéria orgânica (determinado pelo método analítico DQO¹) e de sulfato (DQO/SO₄²⁻). Nesse sentido, o valor DQO/SO₄²⁻ de 0,67, obtido estequiométricamente, permite a conversão do sulfato a sulfeto concomitantemente à remoção de matéria orgânica. Teoricamente, para essa relação, há sulfato suficiente no meio para que toda matéria orgânica presente seja utilizada pelas BRS, podendo o reator operar exclusivamente em condições sulfetogênicas.

Apesar de existir a possibilidade de acoplamento das reações de degradação da matéria orgânica e redução de sulfato, deve-se utilizar a relação proposta com reservas, enfocando o potencial de toxicidade do sulfeto gerado às arquéias metanogênicas acetoclásticas e, inclusive, para as BRS. Além disso, a completa redução do sulfato a baixas relações DQO/SO₄²⁻ é dificilmente obtida, uma vez que os organismos metanogênicos utilizadores do acetato não são facilmente substituídos pelas BRS. A redução do sulfato em concentrações limitantes é pouco conhecida, uma vez que ocorre competição entre diferentes grupos de BRS que obtêm energia através de processos fermentativos ou acetogênicos.

Nas décadas de 70 e 80, foi dada ênfase à prevenção ou minimização da redução de sulfato durante o tratamento anaeróbio de águas residuárias contendo sulfato, em função dos efeitos deletérios ao processo metanogênico (diminuição da produção de metano, toxicidade) e aos produtos gerados com características indesejadas, como o H₂S. Atualmente, considera-se que o uso da tecnologia anaeróbia no tratamento de águas residuárias contendo elevadas concentrações de sulfato é possível com aplicação de medidas adequadas, que permitem a integração da metanogênese com a redução de sulfato, através de rotas complexas de biodegradação (LENS *et al.*, 2002). Resultados obtidos fortuitamente em biorreatores em relação à redução do sulfato, associados ao conhecimento dos grupos microbianos a partir da conjugação das técnicas clássica e de biologia molecular, têm motivado a busca de novas estratégias operacionais e de projeto, reforçando o interesse na utilização desta tecnologia.

dos sistemas de tratamento com enfoque na remoção de compostos sulfurosos.

O ciclo biogeocíquímico do enxofre ocorre segundo reações de óxido-redução, sendo o sulfato sua forma mais oxidada e o sulfeto a mais reduzida. Sob anaerobiose, ocorre a conversão das formas mais oxidadas de enxofre a sulfeto, que permanece na fase gasosa ou líquida em função das condições ambientais, sabidamente do pH (Figura 11). Nessas condições, as relações sintróficas entre as arquéias

¹Demanda Química de Oxigênio, método para determinação dos teores de matéria orgânica em amostras. É quantidade de O₂ necessária para a oxidação da matéria orgânica através de um agente químico.

A instabilidade do processo causada pela competição estabelecida entre os microrganismos metanogênicos e as BRS é apontada como um dos inconvenientes da utilização da biotecnologia anaeróbia para águas com concentrações altas de sulfato. Contudo, como o processo tem despertado grande interesse pelo seu potencial de aplicação na eliminação do sulfato e outras formas oxidadas de enxofre, concomitantemente à remoção de matéria orgânica (OMIL *et al.*, 1997), superar a barreira dessa competição parece um dos caminhos promissores para adoção de procedimentos sob anaerobiose, tanto para no biotratamento, como para a biorremediação de solos e águas contaminadas.

A Tabela 7 relaciona os tipos de sistemas anaeróbios que têm demonstrado potencial para a redução do sulfato concomitantemente a oxidação da matéria orgânica.

Em função dos efeitos deletérios causados pelo sulfeto produzido no processo anaeróbio de tratamento, como odor desagradável e potencial de corrosão e toxicidade, o sulfeto é um subproduto da sulfetogênese a ser removido das correntes líquida e gasosa. Processos físico-químicos baseados na dissolução do sulfeto em meio alcalino, seguido de precipitação na forma de CaSO_4 , adsorção do sulfeto em resinas ou carvão ativado têm sido utilizados. Em geral, os processos citados apresentam eficiências de remoção adequadas, contudo, a transferência de fase e a formação de grandes quantidades de resíduo sólido requerem sistemas de tratamento complementares. Para tanto, após a produção do sulfeto, pode-se tratar o resíduo por oxidação resultando em enxofre elementar, outras reações de oxidação podem ainda efetivar em sistemas

TABELA 7. Estudos reportados na literatura para redução de sulfato presente em águas residuárias.

Autor	Reator	DQO/ SO_4^{2-}	$[\text{SO}_4^{2-}]$ (mg/L)	Substratos	TDH (h)	Remoção de sulfato(%)
Vassoughi <i>et al.</i> , (2003)	Reator com chicanas de bancada	6	500	Melaço	24	88
Weijma <i>et al.</i> , (2003)	UASB de bancada	0,67	2000	Metanol	10	10
Oude Elferink (1998)	UASB escala real	9,5	180	Efluente de indústria de papel*	4,6	95
Sipma <i>et al.</i> , (1999)	UASB de bancada	6,67	1080	Mistura de ácidos orgânicos	3,7	60
Omil <i>et al.</i> , (1998)	UASB de bancada	2	1600	acetato	6	70
Mizuno <i>et al.</i> , (1994, 1998)	Reator de mistura completa com alimentação contínua	8,3	1200	butirato e sacarose	8	90
Grebén <i>et al.</i> , (2000)	Reator de mistura completa de bancada	0,48 0,78	1600 1300	sacarose etanol	3,6	97 77
Silva <i>et al.</i> , (2002)	ASBBR de bancada	1,31 0,6	2400 2750	Efluente de produção de peróxido (diluída)+ etanol (1,3% v/v)	20* 8*	96 90
Damianovic <i>et al.</i> , (2005)	HAIB de bancada	5,0 1,7	920 990	Etanol, mistura de ácidos orgânicos	12 12	97 85

ASBBR: reator anaeróbio seqüencial com biomassa imobilizada. ** período de residência em dias para ASBBR; HAIB: reator anaeróbio horizontal de leito fixo; *água residuária de origem industrial.

industriais a fabricação de ácido sulfúrico ou o incremento de fertilizantes. A manutenção das condições ambientais necessárias para o processo é dificultada, principalmente pela escassez de equipamentos de controle da aeração, que caso seja excessiva conduz à oxidação dos compostos de enxofre a sulfato, conhecido como “ciclo fútil”.

Em função do exposto, a utilização da biotecnologia anaeróbia abre a perspectiva para o tratamento de águas residuárias contendo sulfato ou outras formas oxidadas de enxofre e para recuperação do enxofre elementar, de alto valor agregado e indisponível em quantidades desejadas no Brasil. O conhecimento sobre as interações entre os microrganismos e as possíveis rotas metabólicas envolvidas possibilitará a melhor compreensão sobre os processos envolvidos e, consequentemente, fornecerá subsídios para o projeto de reatores mais eficientes e estáveis.

Referências

- AMANN, R.I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal Bacteriology*, v.172, p.762-770, 1990.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, p.143-169, 1995.
- ARAÚJO, J.C.; BRUCHA, G.; CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology*, v.41, p.69-77, 2000.
- ARAÚJO, J.C.; MORTARA, R.; CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Environmental Technology*, v.25, p.809-917, 2004.
- ARAÚJO, J.C.; TÉRAN, F.C.; OLIVEIRA, R.; NOUR, E.A.A.; MONTENEGRO, M.A.P.; CAMPOS, J. R.; VAZOLLER, R.F. Comparison of Hexamethyldisilazane (HMDS) and Critical-Point Drying (CPD) Treatments for Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *Journal of Electron Microscopy*, v.52 (4), p.429-433, 2003.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, J.L.; WOESE, C.R.; WOLFE, R.S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*, v.43, p.260-296, 1979.
- Belay, N.; Daniels, L. Production of ethane, ethylene and acetylene from halogenated hydrocarbons by methanogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v.53, p.1604-1610, 1987.
- Biothane System-International. Delft, the Netherlands. In: *8th Licensee Meeting*, 1998.
- BOLANOS, M.L.R.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Phenol degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor under mesophilic conditions. *Water Science and Technology*, v.44, p.167-174, 2001.
- BOYD, S.A.; SHELTON, D.R. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.47, p.272-277, 1984.
- BRYERS, J.D. Modeling Biofilm Accumulation. In: *Physiological Models in Microbiology. II*. CRC Press, cap. 11, 2003, p.109-144.
- CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, J.R. Analysis of biofilm formation using 2D vs 3D digital imaging. *Journal of Applied Bacteriology Supl.*, v.74, p.52S-66S, 1993.
- CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, J.R. Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *J. Microbiol. Methods*, v.15, p.249-261, 1992.
- CAMACHO, R.D.P. Desempenho de um reator piloto protótipo no tratamento de efluentes líquidos de uma indústria de conservas vegetais. 1986. São Carlos Dissertação de mestrado, Escola de engenharia de São Carlos – USP.
- CETESB. In: *Inventário Brasileiro de Gás Metano gerado por Resíduos*. SP. Brasil, 1999.
- CHERNICHARO, C.A. Reatores Anaeróbios. Departamento de Engenharia Ambiental – UFMG, 1997, 246p.
- COIADO, M.F.L. Sistema de Otimização EIOS aplicado a uma estação de tratamento anaeróbio de duas fases. 1994, MsC São Carlos, EESC – USP.

- COOKSON, J.T.Jr. **Bioremediation Engineering-Design and Applications.** McGraw Hill, N.Y., 1995. 524p.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; DE BEER, D.; CALDWELL, D.E.; KORBER D.R.; JAMES G.A. Biofilms: the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.2173-2142, 1994.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic biodegradation of PCP via reductive dechlorination in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactors. **Proceedings of the First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering.** September, Mexico City, 2004.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SAKAMOTO, I.K.; FORESTI, E. Biofilm adaptation to sulphate reducyion in anaerobic immobilized biomass reactors submitted to different COD/Sulphate ratios. **Proceedings of VIII Taller Y Simposio Latinoamericano sobre Digestion Anaerobia.** October, Punta del Este- Uruguay, 2005.
- DARMON, P. **Pasteur.** Ed. Fayard. 1995. 431p.
- DEL NERY, V.; DAMIANOVIC, M.H.Z.; BARROS, F.G. "The use of upflow anaerobic sludge blanket reactors in the treatment of poultry slaughterhouse wastewater", **Water Science and Technology**, v.44, p.83-88, 2001.
- DEL NERY, V. **Relatório Técnico de Desempenho de Sistema de tratamento de efluentes líquidos da São Carlos S/A - Industria de Papel e Embalagens,** 1996.
- DIETRICH, G.; WINTER, J. Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.34, p.253-258, 1990.
- DISTEFANO, T.D.; GOSSET, J.M.; ZINDER, S.H. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, n. 11, p.3622-3629, 1992.
- DUBOS, R. **Pasteur and Modern Science.** ASM Press. 1998, 168p.
- DUFF, S.J.B.; KENNEDY, K.J.; BRADY, A.J. Treatment of dilute phenol/PCP wastewaters using the Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor. **Water Research**, v.29, n. 2, p.645-651, 1995.
- EDWARDS, T.; MCBRIDE, B.C. New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. **Applied Microbiology**, v.29, p.540-545, 1975.
- EGLI, C.S.; SCHOLTZ, R.; COOK, A.; LEISINGER, T. Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *desulfobacterium* sp. and *methanobacterium* sp. **FEMS Microbiol Lett**, v.43, p.257-261, 1987.
- EL FANTROUSSI, S.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S.N. Anaerobic dechlorinating bacteria. **Biotechnology Progress**, v.14 (2), p.167-188, 1998.
- FATHEPURE, B.Z.; BOYD, S.A. Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp strain DCM. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2976-2980, 1988b.
- FATHEPURE, B.Z.; BOYD, S.A. Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. **FEMS Microbiological Letters**, v.49, p.149-156, 1988a.
- FATHEPURE, B.Z.; NENGU, J.P.; BOYD, S.A. Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.2976-2980, 1987.
- Fatibello, S.H.S.A. **Avaliação da atividade microbiana anaeróbia de sedimentos lacustre e de lodos de um biodigestor anaeróbico termofílico na degradação de tricloroetileno (TCE).** 2000. MsC Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.
- FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO, M.; SCHRAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.67, p.47-77, 1995.
- FORESTI, E.; ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; DEL NERY, V. Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewater treatment. **Brazilian J. Chem. Eng.**, v.12, p.235-239, 1995.
- FREEDMAN, D.L.; GOSSET, J.M. Biological reductive dechloriation of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.2144-2151, 1989.
- GHIORSE, W.C. Microbial Reduction of Manganese and iron. In: **Biology of Anaerobic Microorganisms.** p.305-332, 1988.
- GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. Environmental applications. In: **Microbial Biotechnology.** p.561-620, 1995.
- GREEBEN, H.A.; MARAE, J.P.; MNQANQENI, S. Comparison between sucrose, ethanol and methanol as carbon and energy sources for biological sulphate reduction. **Water Science and Technology**, v.41, p.247-253, 2000.

- GUIOT, S.R.; PAUSS A.; COSTERTON, J.W. A structured model of the anaerobic granule consortium. In: **Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion**. São Paulo, 12-16 May, 1991, p.1-8.
- GUSMÃO, V.R.; MARTINS, T.H.; CHINALIA, F.A.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A. Remoção de etanol, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno por cultura desnitrificante em reator anaeróbio horizontal de leito fixo. In **Anais do IV Seminário do Projeto Temático FAPESP "Desenvolvimento, análise, aprimoramento e otimização de reatores anaeróbios para tratamento de águas residuárias"**. 2005, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, p.67-76.
- GÜVEN, D.; DAPENA, A.; KARTAL, B.; SCHMID, M.C.; MAAS, B.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; SOZEN, S.; MENDEZ, R.; DEN CAMP, H.J. M. O.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.; SCHMIDT, I. Propionate Oxidation by and Methanol Inhibition of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1066-1071, 2005.
- HÄGGBLOM, M.M. Microbial breakdown of halogenated pesticides and related aromatic compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v.103 (1), p.29-72, 1992.
- HANSEN, M.C.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; MOLLIN, S. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.141-149, 1998.
- HARADA, H.; UEMURA, S.; MOMONOI, K. Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. **Water Research**, v.28, p.355-367, 1994.
- HARMSEN, H.J.M.; AKKERMANS, A.D.L.; STAMS, A.J.M.; DE VOS, W.M. Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.2163-2168, 1996.
- HENDRIKSEN, H.V.; LARSEN, S.; AHRING, B.K. Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed film reactors: the influence of an additional substrate. **Water Science Technology**, v.57, p.431-436, 1991.
- HENDRIKSEN, H.V.; LARSEN, S.; AHRING, B.K. Influence of supplementation carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58(1), p.365-370, 1992.
- HOLLIGER, C.; HAHN, D.; HARMSEN, H.; LUDWIG, W.; SSCHUMACHER, W.; TINDALL, B.; VAZQUEZ, E.; WEISS, N.; ZEHNDER, A.J.B. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. **Archives of Microbiology**, v.169, p.313-321, 1998.
- HOWLAND, J.L. **The Surprising Archaea**. Ed. Oxford University Press, 2000, 204p.
- HULSHOFF POL, L.W.; LENS, P.N.L.; WEIJMA, J.; STAMS, A.J.M. New developments in reactor and process technology for sulfate reduction. **Water Science and Technology**, v.44, p.67-76, 2001.
- HUNGATE, R. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: **Methods in Microbiology**. Ed. New York Academic Press, v.38, 1969, p.117-132.
- ISHII, K.; FUKUI, M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3753-3755, 2001.
- JETTEN, M.S.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; ROBERTSON, L.S.; DE VRIES, S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. **Antoine van Leeuwenhoek**, v.71, p.75-93, 1997.
- KHODADOUST, A.P.; WAGNER, J.A.; SUIDAN, M.T.; BRENNER, R.C. Anaerobic treatment of PCP in fluidized-bed GAC bioreactors. **Water Research**, v.31, p.1776-1786, 1997.
- KING, G.M. Dehalogenation in marine sediments containing natural sources of halophenols. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.3079-3085, 1988.
- KRUMAN, P.; PARUCHI, Y.L. Kinetics of phenol biotransformation. **Water Research**, v.31, p.11-22, 1997.
- LENS, P.; VALLERO, M.; ESPOSITO, G.; ZANDVOOT, M. Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. **Environmental Science & Bio/Technology**, v.1, p.311-325, 2002.
- LETTINGA, G.; VAN VELSEN, A.F.; HOBMA, S.W.; DE ZEEW, W.; Klapwijk, A. Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.585-602, 1980.
- LIU, S.; SUFLITA, J.M. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. **Tibtech**, v.11, p.344-352, 1993.
- LJUNGDAHL, L.; WIEGEL, J. Working with anaerobic bacteria. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Ed. ASM Press, p.84-96, 1986.

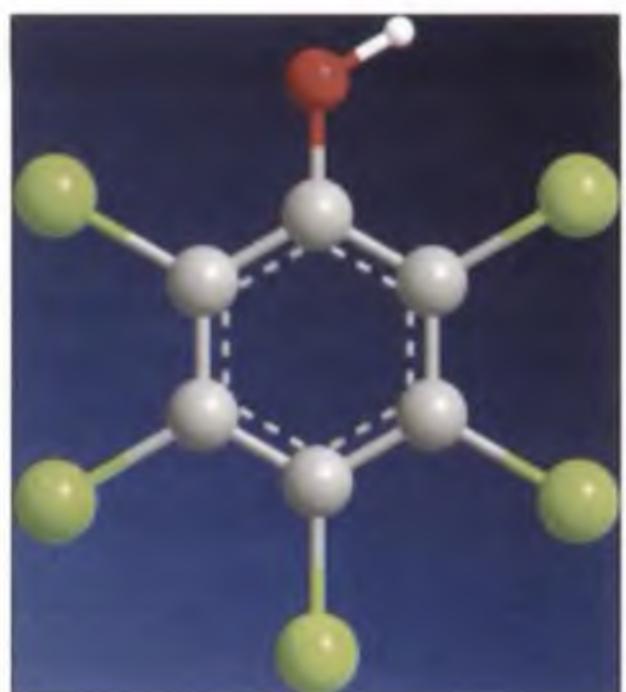
- MADSEN, T.; AAMAND, J. Effects of sulfoxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2453-2458, 1990.
- MASSOL-DEYÁ, A.A.; WHALLON, J.; HICKEY, R.F.; TIEDJE J.M. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.769-777, 1995.
- MAYMÓ-GATTEL, X.; ANGUISH, T.; ZINDER, S.H. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "Dehalococcoides ethenogenes" 195. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3108-3113, 1999.
- MAYMÓ-GATTEL, X.; TANDOI, V.; GOSSET, J.M.; ZINDER, S.H. Characterization of an H_2 -utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61 (11), p.3928-3933, 1995.
- MC CARTY, P.L.; SMITH, D.P. Anaerobic Wastewater Treatment. **Environmental Science and Technology**, v.20, p.1200-1206, 1986.
- MIKESELL, M.D.; BOYD, S.A. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.861-865, 1990.
- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating oligate anaerobes. **Applied Microbiology**, v.27, p.985-987, 1974.
- MIZUNO, O.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. Effects of sulfate concentration and sludge retention time on the interaction between methane production and sulfate reduction for butyrate. **Water Science and Technology**, v.30, p.45-54, 1994.
- MIZUNO, O.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v.32, p.1626-1634, 1998.
- MOHN, W.W.; TIEDJE, J.M. Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. **Archives of Microbiology**, v.157, p.1-6, 1991.
- MOHN, W.W.; TIEDJE, J.M. Microbial reductive dehalogenation. **Microbial Reviews**, v.56, p.482-507, 1992.
- MOLLER, S.; KRISTENSEN, C.S.; POULSEN, L.K.; CARSTENSEN, J.M.; MOLIN, S. Bacterial Growth on Surfaces: Automated image analysis for quantification of growth rate-related parameters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.741-748, 1995.
- MONTENEGRO, M.A.P.; MORAES, E.M.; SOARES, H.M.; VAZOLLER, R.F. Hybrid reactor performance in pentachlorophenol (PCP) removal by anaerobic granules. **Water Science and Technology**, v.44, p.137-144, 2002.
- MONTENEGRO, M.A.P.; ARAÚJO, J.C.; VAZOLLER, R.F. Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence in situ hybridization. **Water Science and Technology**, v.48, p.65-73, 2003.
- MONTENEGRO, M.A.P.; MORAES, E.M.; SOARES, H.M.; VAZOLLER, R.F. Hybrid reactor performance in pentachlorophenol (PCP) removal by anaerobic granules. **Water Sci. and Technology**, v.44, p.137-44, 2001.
- MONTGOMERY, L.; ASSAF-ANID, N.; NIES, L.; ANID, P.J.; VOGEL, T.M. Anaerobic biodegradation of chlorinated organic compounds. In **Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals**, 1994, p.256-276.
- MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia. **Anais**, 2000, UFPE, Recife, v.2, p.235-238.
- MULDER, A.; VAN DE GRAAFF, A.A.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiol. Ecology**, v.16, p.177-184, 1995.
- NAKAYAMA, C.R. Degradação anaeróbia de aentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do sistema estuarino Santos e São Vicente. 2005. PhD Thesis do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 187p.
- NARDI, I.R.; VARESCHE, M.B.A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. **Water Science and Technology**, v.45, p.175-180, 2002.
- OLIVEIRA, S.V.W.B.; MORAES, E.M.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B.A.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Formaldehyde Degradation in an Anaerobic Packed-bed Bioreactor. **Water Research**, v.38, p.1685-1694, 2004.
- OLSEN, G.J.; PACE, N.R.; NUELE, M.; KAINE, B.P.; GUPTA, R.; WOESE, C.R. Sequence of the 16S rRNA gene from the thermoacidophilic archaeabacterium *Sulfolobus solfataricus* and its evolutionary implications. **Journal of Molecular Evolution**, v.22, p.301-307, 1985.

- OMIL, F.; LENS, P.; VISSER, A.; HULSHOFF POL. L.W.; LETTINGA, G. Long-term competition between sulfate reducing and Methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, v.57, p.676-685, 1998.
- OMIL, F.; VISSER, A.; HULSHOFF POL. L.W.; LETTINGA, G. Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido en sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. *Afinidad*, v.54, p.353-471, 1997.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H. *Sulfate-reducing bacteria in anaerobic bioreactors*. 1998, PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.L.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, v.9, p.1-55, 1986.
- PENDER, S.; TOOMEY, M.; CARTON, M.; EARDLY, D.; PATCHING, J.W.; COLLERAN, E.; O'FLAHERTY, V. Long-term effects of operating temperature and sulphate addiction on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Research*, v.38, p.619-630, 2004.
- POLZ M.F.; CAVANAUGH, C.M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.3724- 3730, 1998.
- PRAKASH, S.M.; GUPTA, S.K. Biodegradation of tetrachloroethylene in up flow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology*, v.72, p.47-54, 2000.
- RAMSING, N.B.; KÜHL, M.; JORGENSEN, B.B. Distribution of sulfate- reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.3840-3849, 1993.
- RIBEIRO, R. *Recuperação da Qualidade de Águas Contaminadas por gasolina usando reator anaeróbio de leito fixo*. 2005, PhD Thesis EESC – USP.
- ROGERS, J.E.; WHITMAN, W.B. Introduction. In: *Microbial production and consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides and Halomethanes*. Ed. ASM Press, 1991, p.1-6.
- SAIA, F.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; CATTONY, E.B.M.; VAZOLLER, R.F. Horizontal fixed bed anaerobic reactor performance for pentachlorophenol (PCP) removal by natural sediments from a polluted estuarine area of Brazil. In: *Proceedings of VIII Taller Y Simposio Latinoamericano sobre Digestion Anaerobia*, 2005, Punta del Este-Uruguay, October.
- SANTEGOEDS, C.M.; FERDELMAN, T.G.; MUYZER, G.; BEER, D. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, p.3731-3739, 1998.
- SCHÄFER, G.; ENGELHARD, M.; MÜLLER, V. Bioenergetics of Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63 (3), p.570-620, 1999.
- SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61 (2), p.262-280, 1997.
- SHEN, X.W.L.; FENG, H.J. Effect of easily degradable substrate on anaerobic degradation of pentachlorophenol in an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB). *Journal of Hazardous Materials*, v.119, p.239-243, 2005.
- SILVA, A.J.; VARESCHE, M.B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochemistry*, v.37, p.927-935, 2002.
- SIPMA J.; LENS, P.N.L.; VIEIRA, A.; MIRON, Y.; VAN LIER, J.B.; HULSHOFF POL, L.; LETTINGA, G. Thermophilic sulfate reduction in UASB reactors under acidifying conditions. *Process Biochem.*, v.35, p.509-522, 2000.
- SMIDT, H. *Molecular characterization of anaerobic dehalogenation by *Desulfobacterium dehalogenans**. 1999, PhD Thesis Wageningen University, Wageningen, Holanda. 187 p.
- SOUZA, M.E.; FUZARO, G.; POLEGATO, A.R. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. In: *Proceedings of Sixth International Symposium on Anaerobic Digestion*, 1991, São Paulo, Brasil, p.191-200.
- SPANJERS, H.; WEIJMA, J.; ABUSAM, A. Modelling the competition between sulphate reducers and methanogens in a thermophilic methanol-fed bioreactor. In: *Anaerobic Digestion*, 9th, Antwerpen. Proceedings 1, 2001, p.209-214.
- SUZUKI, M.; GIOVANNONI, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.625-630, 1996.
- TARTAKOVISKY, B.; LEVESQUE, M.J.; DUMORTIER, R.; BEAUDET, R.; GUIOT, S.R. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65(10), p.4357- 4362, 1999.

- The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Published by Merck Research Laboratories, 1996.
- TSUNO, H.; KAWAMURA, M.; SOMIYA, I. Anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) in a biological expanded-bed reactor. **Water Science and Technology**, v.34 (5-6), p.335-344, 1996.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B. Bacterial Adhesion: A Physicochemical Approach. **Microbial Ecology**, v.17, p.1-15, 1989.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; ZEHNDER, A.J.B. Influence of Interfaces on Microbial Activity. **Microbiological Reviews**, v.54, p.75-87, 1990.
- VANDECARTE, J.P. **Microbiologie Pétrolière. - Concepts, Implications environnementales, applications industrielles.** Volume 1. Ed. Technip., 2005a, 412p.
- VANDECARTE, J.P. **Microbiologie Pétrolière. - Concepts, Implications environnementales, applications industrielles.** Volume 2. Ed. Technip., 2005b, 795p.
- VASSOUGHI, M.; SHAKERI, M.; ALEMZADEH, I. Performance of anaerobic baffled reactor treating synthetic wastewater influenced by decreasing COD/SO₄ ratios. **Chemical Engineering and Processing**, v.42, p.811-816, 2003.
- VAZOLLER, R.F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas.** 1995a, PhD Thesis, EESC-USP, 259p.
- VAZOLLER, R.F. Sub-capítulo: Microbiologia e Saneamento Ambiental, do Capítulo Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável - Livro PADCT - **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas.** (disponível em: <http://www.bdt.org.br/bdt/paper/padctbio/>). 1995b.
- VILLEMUR, R.; SAUCIER, M.; GAUTHIER, A.; BEAUMET, R. Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense/frappieri* and *Dehalococcoides ethenogentes*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48 (8), p.697-706, 2002.
- VOGEL, T.M.; MCCARTY, P.L. Biotransformation of Tetrachloroethylene to Trichloroethylene, Dichloroethylene, Vinyl Chloride and Carbon dioxide under methanogenic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.1080-1083, 1995.
- WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A.L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. In: **Advances in microbial ecology**. New York: Plenum Press, 1992, 219-228.
- WEIJMA, J.; CHI, T-M; HULSHOF POL, L.W.; STAMS, A.J.M.; LETTINGA, G. The effect of sulphate on methanol conversion in mesophilic upflow anaerobic sludge bed reactors. **Process Biochemistry**, v.38, p.1259-1266, 2003.
- WOESE, C.R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.
- WOLFE, R. Anaerobic Life- a Centennial View. **Journal of Bacteriology**, v.181 (11), p.3317-3320, 1999.
- WU, W.M.; BHATNAGAR, I.; ZEIKUS, J.G. Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.389-397, 1993.
- YODA, M.; KITAGAWA, M.; MIYAJI, Y. Long term competition between sulfate-reducing bacteria and methane producing bacteria in anaerobic biofilm. **Water Research**, v.21, p.1547-1556, 1987.
- ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. Spatial and temporal variations of monitoring performance parameters in Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate. **Water Research**, v.21, p.1760-1766, 1997.
- ZEHNDER, A.J.B.; STUMM, W. Geochemistry and Biogeochemistry of Anaerobic Habitats. In: **Biology of Anaerobic Microorganisms**. p.1-38, 1988.
- ZINDER, S.H. Physiological Ecology of Methanogens. In: **Methanogenesis – Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics**. Chapman & Hall, 1993. p.128-306.

Biodegradação de Compostos Aromáticos

Aneli de Melo Barbosa, Ellen Cristine Giese e Luiz Gustavo Covizzi



I. Introdução

Vários compostos aromáticos são encontrados naturalmente no ambiente. Entretanto, nas últimas décadas, o aumento da população e o desenvolvimento de novas tecnologias têm proporcionado um aumento significativo destas substâncias, causando transtornos ecológicos.

O crescente acúmulo de compostos aromáticos recalcitrantes na biosfera é decorrente da contaminação com resíduos e substâncias depositados, acumulados, enterrados e infiltrados de forma natural ou por ação antropogênica. O aumento da demanda do consumo de água e a baixa qualidade dos tratamentos de efluentes, tanto domésticos quanto industriais, também têm contribuído para a redução do fluxo de água disponível e também para a diluição dos resíduos depositados no meio ambiente (PEREIRA NETTO *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A contaminação das águas de rios, lagos e lagoas brasileiras com resíduos contendo compostos aromáticos aumentaram cinco vezes na última década, principalmente em consequência das atividades agropecuárias e industriais, resultando em mais de 20 mil áreas contaminadas na extensão territorial do país (Agência Nacional de Águas - ANA). No Brasil, ainda não existe uma legislação específica para as questões que envolvem áreas contaminadas, visto que o primeiro órgão de controle ambiental da América Latina a possuir um sistema organizado de gerenciamento de áreas contaminadas foi a Agência Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), a qual vem monitorando e executando ações emergenciais para áreas afetadas.

O aumento de contaminantes constituídos principalmente por compostos aromáticos tem despertado interesse no estudo da degradação destas substâncias. Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos orgânicos que contêm um ou mais anéis benzênicos, arranjados de forma linear, angular ou em grupos. A energia proveniente do efeito de ressonância das duplas ligações destes anéis estabiliza as ligações entre os átomos de carbono na estrutura do benzeno, tornando-o altamente resistente à degradação, promovendo sua persistência na natureza (SOLOMONS & FRYHLE, 2004).

Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam menor coeficiente de partição do que os hidrocarbonetos alifáticos (C_{15} a C_{30}), sendo portanto, mais tóxicos ao ambiente por apresentarem maior mobilidade em água, podendo atingir diversos ambientes naturais assim como as centrais de abastecimento das grandes cidades (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Muitos compostos aromáticos apresentam grupos funcionais ou estruturas parciais não naturais, ou seja, foram adicionados por via sintética, sendo denominados compostos xenobióticos, já que são estranhos ao meio ambiente. A grande maioria dos compostos xenobióticos é recalcitrante, entretanto, existem enzimas microbianas envolvidas na degradação destes compostos como as hidrolases, oxigenases e outras também envolvidas nas reações de desalogenação (GOLOVLEVA *et al.*, 1990).

O tempo de meia-vida destes compostos no ambiente depende quase que exclusivamente da estrutura química peculiar de cada um. A clivagem do anel benzênico pode ser considerada o passo mais difícil durante o processo de biodegradação de um composto aromático devido sua alta estabilidade (COLOMBO *et al.*, 1996). As reações envolvidas nesta etapa de degradação podem ser de oxidação, quando moléculas de oxigênio estão presentes, ou de redução, na qual várias enzimas microbianas estão geralmente envolvidas. Os grupos substituintes encontrados nestes compostos, como carboxilas, metilas e hidroxilas, diminuem a energia de ressonância removendo elétrons e desestabilizando o anel benzênico, podendo facilitar o processo de clivagem. A relação entre a estrutura química e o tempo de meia-vida de alguns compostos aromáticos presentes no ambiente está apresentada na Tabela 1.

TABELA 1. Estrutura química e tempo de meia-vida de alguns compostos orgânicos aromáticos presentes no ambiente.

Composto orgânico	Estrutura química	Tempo de meia-vida (dias)*
4,4'-metilenodianilina		4
Ftalato de etila		23
Pentaclorofenol		100
Cresóis		570
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (antraceno)		570
Bifenilas policloradas(2,3,4,6-tetraclorobifenila)		940
Hexaclorobenzeno		1529
Di-benzofurano		3609

Estes compostos podem contaminar plantas e animais e reagirem com moléculas biológicas, tornando-se potenciais agentes carcinogênicos e eficientes mutagênicos. O caráter tóxico do benzeno e de alguns de seus derivados como o tolueno, etilbenzeno e xileno, comumente denominados compostos BTEX, está relacionado aos seus respectivos potenciais de carcinogenicidade e mutagenicidade, que levam ao aparecimento de tumores, alterações genéticas e leucemias, por se ligarem ao tecido adiposo e às proteínas e serem de difícil eliminação (PEREIRA NETTO *et al.*, 2004; TIBURTIUS *et al.*, 2004).

2. Compostos aromáticos naturais e derivados, contaminantes do ambiente

Conforme salientado, existem compostos aromáticos que estão presentes naturalmente no ambiente, como por exemplo, os ácidos húmicos que estão no solo e constituem a sua reserva orgânica. Estes ácidos são constituídos por polímeros de hidroxifenóis, ácidos hidroxibenzóicos e outras substâncias aromáticas, as quais estão ligadas a outros constituintes orgânicos como carboidratos e proteínas (RAUEN *et al.*, 2002). Os ácidos húmicos são formados a partir da degradação oxidativa e consequente polimerização da matéria orgânica depositada no solo. Em condições limitadas de oxigênio, estes ácidos podem ser precursores de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos através da ação microbiana (THIELE BRÜMER, 2002).

A flexibilidade e a coesão das fibras vegetais nas plantas são resultantes da presença da lignina, uma molécula aromática complexa, a qual é constituída por seqüências de unidades repetitivas de fenil-propanos ligados a grupos metoxílicos e hidroxílicos (Figura 1). A lignina está localizada principalmente na lamela média da estrutura da parede celular vegetal e em menor quantidade nas paredes secundárias da célula vegetal. Este biopolímero também atua limitando a ação de microrganismos patogênicos, os quais podem produzir enzimas extracelulares capazes de superar a resistência natural da madeira, promovendo a formação de substratos solúveis. A principal fonte de contaminação ambiental por derivados aromáticos originados da lignina são as atividades industriais vinculadas ao processamento da madeira

nas indústrias de polpa e papel. O objetivo principal deste processamento é a remoção de parte da lignina para promover o branqueamento e obter a polpa como matéria-prima (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

O petróleo é outra fonte natural de compostos aromáticos, apesar de ser constituído principalmente de hidrocarbonetos alifáticos e olefinas. A exploração e utilização do

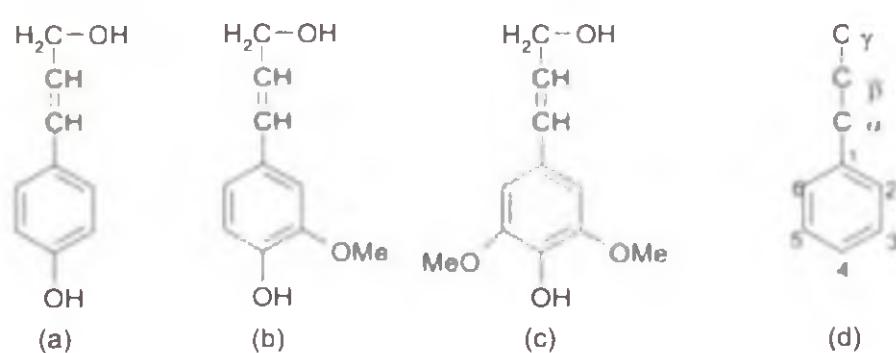


FIGURA 1. Precursors da lignina: (a) álcool cumarílico; (b) álcool coniferílico; (c) álcool sinapílico; (d) modelo de esqueleto carbônico formador da estrutura da lignina.

petróleo são de grande risco para o meio ambiente, desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases que poluem a atmosfera. O derramamento de petróleo nas águas oceânicas é extremamente agressivo às vidas aquáticas, constitui um problema ambiental recente, que surgiu da globalização das tecnologias desenvolvidas a partir da II Revolução Industrial (ABED & KÖSTER, 2005). Acidentes envolvendo a difusão destes compostos para o ambiente têm sido comuns, contaminando desde águas subterrâneas no caso de vazamentos em postos e distribuidores de gasolina, até grandes catástrofes como os acidentes em oleodutos que prejudicaram a flora e a fauna do litoral dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, nos últimos anos (*CETESB*).

As atividades antrópicas afetam diretamente o ecossistema e depositam compostos aromáticos constantemente na biosfera. A deposição de percolados tóxicos em aterros sanitários, o lançamento de efluentes industriais e a disposição de resíduos agrícolas são as principais fontes de poluição em águas subterrâneas, rios e solos, respectivamente (TEKERE *et al.*, 2005).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), constituem uma classe importante de compostos contaminantes tóxicos, visto que estão presentes no petróleo e também são formados durante a combustão incompleta de materiais orgânicos. Dentre os HAPs encontrados no ambiente, destaca-se o antraceno, o qual é considerado um composto modelo por estar presente nas estruturas químicas do benzopireno (Figura 2a) e também o benzoantraceno que são ambos potencialmente carcinogênicos e recalcitrantes (KRIVOBOK *et al.*, 1998).

Os resíduos de defensivos agrícolas depositados no solo ligam-se à matéria orgânica e participam da formação de substâncias húmicas. Posteriormente, são liberados ou absorvidos por microrganismos, mesofauna ou por plantas, e, se não metabolizados por eles também constituirão um sério problema de poluição ambiental. Quando no solo, os pesticidas (Figura 2b) podem ainda ser convertidos em compostos halogenados e anilinas alquil-substituídas tornando-se mais estáveis e persistentes, causando mais danos ao meio ambiente (GOLOVLEVA *et al.*, 1990).

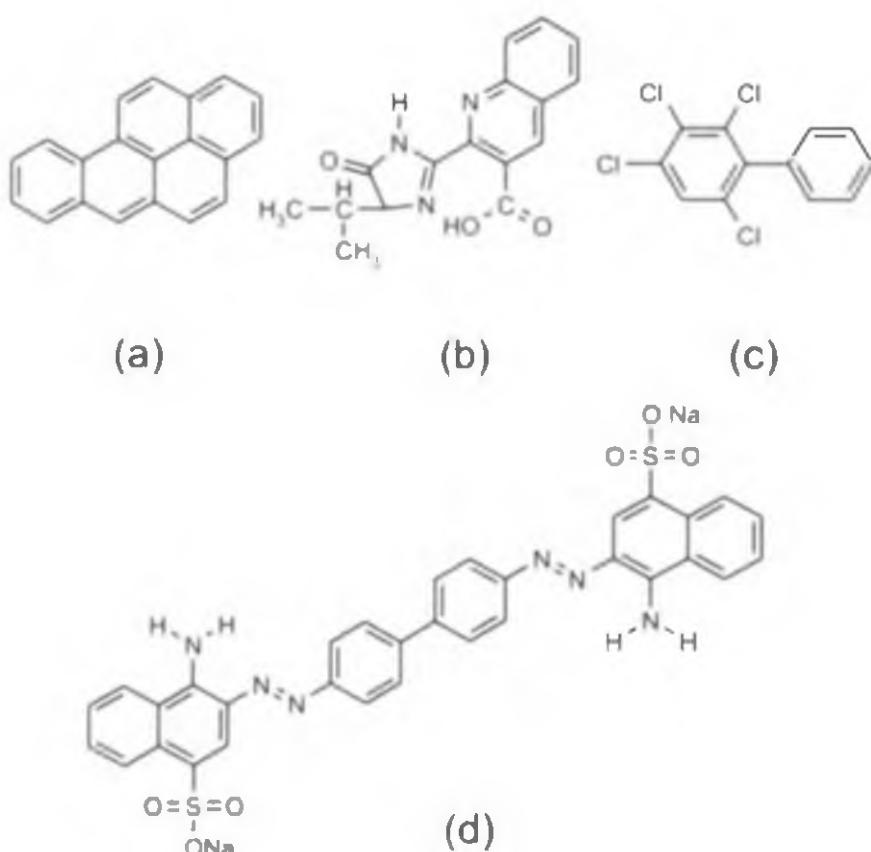


FIGURA 2. Estruturas químicas de alguns compostos aromáticos persistentes no ambiente: (a) benzopireno (HAP); (b) Imazaquin (herbicida); (c) 2,3,4,6-clorobifenila; (d) vermelho congo (corante azóico).

As propriedades físicas e químicas peculiares apresentadas pelas bifenilas policloradas tais como

estabilidade térmica, inércia e alta resistência elétrica, tornaram comum o uso destas substâncias. Consequentemente, foram utilizadas extensivamente em diversos setores industriais durante décadas, principalmente na manufatura de fluídos hidráulicos e dielétricos. Porém, as bifenilas policloradas (Figura 2c) apresentam alta resistência à degradação, permanecendo nos solos e águas durante muitos anos, sendo bioacumuladas em plantas e animais de acordo com a cadeia alimentar. A alta persistência destes compostos no meio ambiente fez com que a partir da década de 70, muitos países proibissem a importação e fabricação destes compostos (BORJA *et al.*, 2005).

As indústrias têxteis e de tintas despejam toneladas de resíduos no meio ambiente a cada ano, causam uma poluição visual e persistente, uma vez que estes efluentes requerem um tratamento complexo e grande parte destes resíduos é depositada no ambiente de forma inadequada. Dentre os principais corantes químicos utilizados nas indústrias têxteis destacam-se os corantes azóicos, os quais são compostos coloridos constituídos por grupos cromóforos azo (Figura 2d). O sistema conjugado apresentado por estas estruturas aromáticas é responsável pela coloração intensa, alta solubilidade em água e alta resistência à degradação. Quando presentes em altas concentrações na biosfera, como a maioria dos compostos aromáticos, são causadores de citotoxicidade e carcinogênese nos organismos vivos, atingindo principalmente a flora e fauna aquáticas (KUNZ *et al.*, 2002; KHEHRA *et al.*, 2006). A ligação azo presente nestes corantes é sintetizada quimicamente, não existindo na natureza enzimas capazes de agir sobre estes compostos, o que os tornam persistentes no ambiente.

3. Biodegradação de compostos aromáticos

Os processos ideais de degradação levam à mineralização completa dos compostos orgânicos, ou seja, à CO₂ e H₂O. Também existem as degradações parciais ou ainda simplesmente a biotransformação de um composto aromático em alguns respectivos derivados, que podem ao invés de diminuir, aumentar a toxicidade do meio ambiente (KALBITZ *et al.*, 2003).

Existem exemplos de degradação abiótica como os processos físico-químicos, os quais têm sido utilizados para a degradação de compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Estes são processos oxidativos avançados, como a fotocatálise heterogênea, ozônio, irradiação ultravioleta e a fotólise. Dentre estes processos, as oxidações promovidas pelo uso de radiação solar são as mais promissoras visto que geram radicais hidroxilos (HO[•]), que possuem caráter fortemente oxidante (TIBURTIUS *et al.*, 2004; 2005).

Muitos processos oxidativos têm sido combinados com diferentes tipos de tratamentos biológicos, aumentando de forma eficiente os processos de tratamento de efluentes de indústrias papeleiras, farmacêuticas, queijeiros, entre outras (ALMEIDA *et al.*, 2004). O uso dos processos fotoeletroquímicos em associação com microrganismos também tem sido utilizado para acelerar a degradação de corantes procedentes de efluentes têxteis. A remoção da cor destes efluentes não é indicativo

da degradação dos compostos tóxicos, porém, a intensidade da coloração dos rios e lagoas interfere significativamente nos processos fotossintéticos naturais e prejudica a flora e fauna da região afetada (BERTAZOLLI & PELEGREINI, 2002).

Os processos biológicos utilizados nos tratamentos de efluentes e recuperação de solos compreendem principalmente a biodegradação e biorremediação dos compostos orgânicos aromáticos contaminantes e recalcitrantes, responsáveis pela mineralização da matéria orgânica a dióxido de carbono e água, através de óxido-redução envolvendo microrganismos (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Geralmente, as reações de bioconversão envolvidas nos processos de biodegradação são destoxicificantes, porém pode ocorrer a formação de metabólitos intermediários mais tóxicos que os compostos de origem. A hidrólise de herbicidas contendo fenilamidas, por exemplo, resultam na formação de cloroanilinas, substâncias estas que, sob a ação de enzimas microbianas são facilmente condensadas a tetracloroidroazobenzenos. Assim sendo, compostos policlorados são depositados na biosfera indiretamente, os quais apresentam maior persistência e alto potencial carcinogênico (GOLOVLEVA *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2004).

O potencial de biodegradação de compostos aromáticos depende principalmente do microrganismo utilizado e da sua capacidade de metabolizar as estruturas químicas dos compostos presentes nos resíduos disponibilizados para o tratamento. Devem ser consideradas ainda, as condições ambientais oferecidas para o desenvolvimento adequado do microrganismo, como a aeração, a temperatura, o pH, a umidade e a disponibilidade de nutrientes que permitam o bom desenvolvimento da população microbiana local (NWEKE *et al.*, 2003).

A falta de condições ambientais para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos é um problema que vêm sendo observado nos processos de biodegradação de compostos aromáticos. Muitas substâncias depositadas no ambiente são adsorvidas pelo solo na forma de colóides e ácidos húmicos, e ficam consequentemente, pouco disponíveis para os microrganismos (THIELE & BRÜMER,

2002). Estudos recentes realizados em Hyogo, no Japão, demonstraram que se faz necessária uma quantidade excessiva de macronutrientes para que o processo de biodegradação de petróleo, após derramamento, seja mais rápido e eficiente (MAKI *et al.*, 2003).

As reações envolvidas na biodegradação dos compostos aromáticos podem ser oxidativas, quando realizadas em aerobiose, ou redutivas, quando em anaerobiose. As reações de oxidação dos compostos aromáticos pelos microrganismos são baseadas principalmente em processos de hidroxilação,

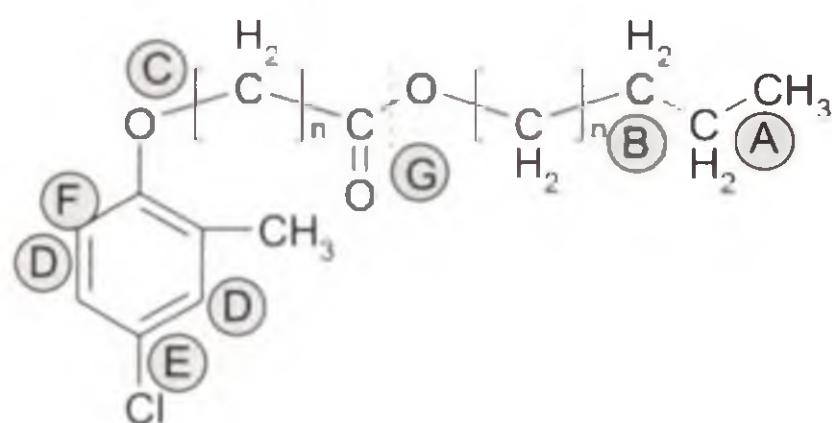


FIGURA 3. Degradações oxidativas de compostos orgânicos por via microbiana, segundo Golovleva *et al.*, 1990: (A) hidroxilação; (B) oxidação; (C) clivagem oxidativa da ligação éter; (D) hidroxilação do anel benzênico; (E) desalogenação oxidativa; (F) clivagem do anel benzênico; (G) clivagem da ligação éster.

seguidos pela clivagem dos anéis aromáticos e epoxidação, ou seja, reações que envolvem a transferência de oxigênio (GOLOVLEVA *et al.*, 1990). A Figura 3 mostra um esquema das possíveis reações de degradação por via microbiana que podem ocorrer na presença de oxigênio.

Quando o oxigênio não está presente no ambiente, os microrganismos anaeróbios utilizam diferentes aceptores de elétrons para o metabolismo destes compostos aromáticos, os quais envolvem o uso de vias metabólicas específicas para a degradação completa. Os principais aceptores finais de elétrons das vias catabólicas anaeróbicas destes compostos são os sulfatos, que são predominantes em ambientes aquáticos, e também o dióxido de carbono, encontrado nos sistemas ricos em matéria orgânica. Muitas vezes as substâncias húmicas presentes no solo também atuam como aceptores finais de elétrons, nas vias de degradação de compostos orgânicos em anaerobiose (TOR & LOVLEY, 2001; THIELE & BRÜMER, 2002).

3.1 Degradação de compostos aromáticos por algas e bactérias

O processo de biodegradação dos compostos aromáticos no ambiente aquático é realizado geralmente por um consórcio de microrganismos envolvendo bactérias, cianobactérias e algas. Algumas algas heterotróficas como a *Prototheca zopfii* são capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, principalmente através de vias metabólicas que envolvem a meta clivagem destes compostos. Substâncias como corantes azóicos, anilinas, fenóis e cresóis são degradados obrigatoriamente em aerobiose (SEMPLE, 1999).

Geralmente, as algas e cianobactérias apresentam um papel indireto na degradação, sendo as bactérias aeróbicas e heterotróficas responsáveis pela metabolização dos compostos aromáticos, enquanto que as algas fornecem oxigênio, nitrogênio e matéria orgânica. Este tipo de relação simbiótica é muito encontrado em áreas de derramamento de óleo e petróleo (ABED & KÖSTER, 2005).

Atualmente, a prática de processos biológicos que envolvem a presença de microrganismos tanto anaeróbicos como os aeróbicos tem proporcionado resultados eficientes na mineralização de compostos aromáticos. O conhecimento da regulação das enzimas responsáveis pela degradação destes compostos em diferentes condições ambientais é muito importante para o entendimento e aplicação dos microrganismos nos processos de biodegradação (KHEHRA *et al.*, 2006). Na ausência de oxigênio, a clivagem dos anéis aromáticos presentes nestes compostos pode ser realizada principalmente através de reações de hidratação, descarboxilação ou carboxilação ou hidrogenação, conforme mostra a Figura 4.

A biodegradação de compostos aromáticos é realizada por vias metabólicas específicas para o catabolismo destas substâncias e também através de reações de óxido-redução catalisadas por enzimas extracelulares. A *Arthrobacter* sp. possui vias metabólicas diferentes para a degradação de compostos aromáticos similares, como a 2-metil, a 2-etil e a 2-hidroxipiridina. A degradação de 2-metilpiridina, por exemplo, é acompanhada por um aumento significativo da produção de riboflavinas, enquanto durante o metabolismo de 2-hidroxipiridina observa-se a secreção de

pigmentos para o meio de cultivo (O'LOUGHLIN *et al.*, 1999). Estas diferenças ocorrem porque o metabolismo destes compostos aromáticos pode ser realizado através de diferentes intermediários, como o catecol, a hidroxi-idroquinona e o protocatecoato, os quais posteriormente podem ser metabolizados através de vias de degradação de compostos aromáticos existentes nos microrganismos, como a via do β -cetoacidato (DÍAZ *et al.* 2001).

A bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* é produtora da enzima catequina oxigenase, responsável por transformar a catequina em ácido protocatecóico e ácido fluoroglucinol carboxílico. O ácido protocatecóico é posteriormente metabolizado pela via do β -cetoacidato. A clivagem em *ortho*- e em *meta*- são as vias convergentes da degradação dos compostos aromáticos mais utilizadas por bactérias e também por fungos encontrados no solo (ARUNACHALAM *et al.*, 2003). A Figura 5 mostra o primeiro passo da degradação do catecol e do protocatecoato à acetil-CoA através da clivagem nas posições *meta* e *ortho*, esta última conhecida como via do β -cetoacidato.

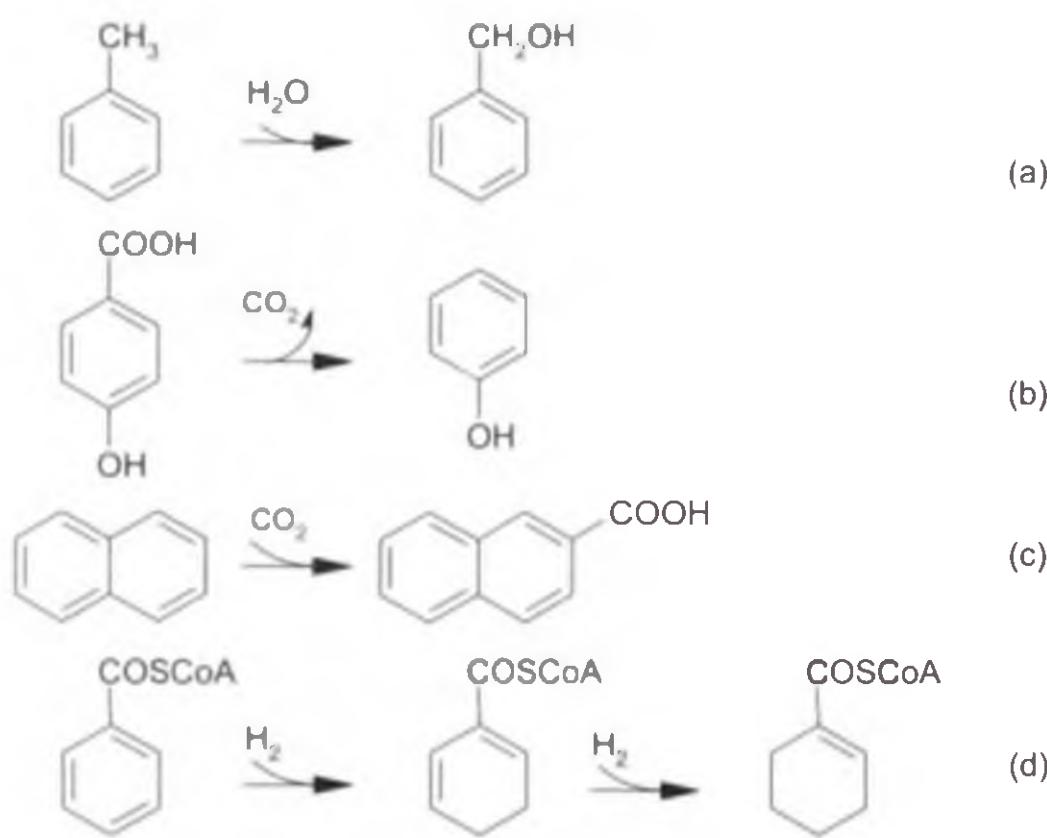


FIGURA 4. Reações de degradação de compostos aromáticos na ausência de oxigênio: (a) hidratação; (b) descarboxilação; (c) carboxilação e (d) hidrogenação.

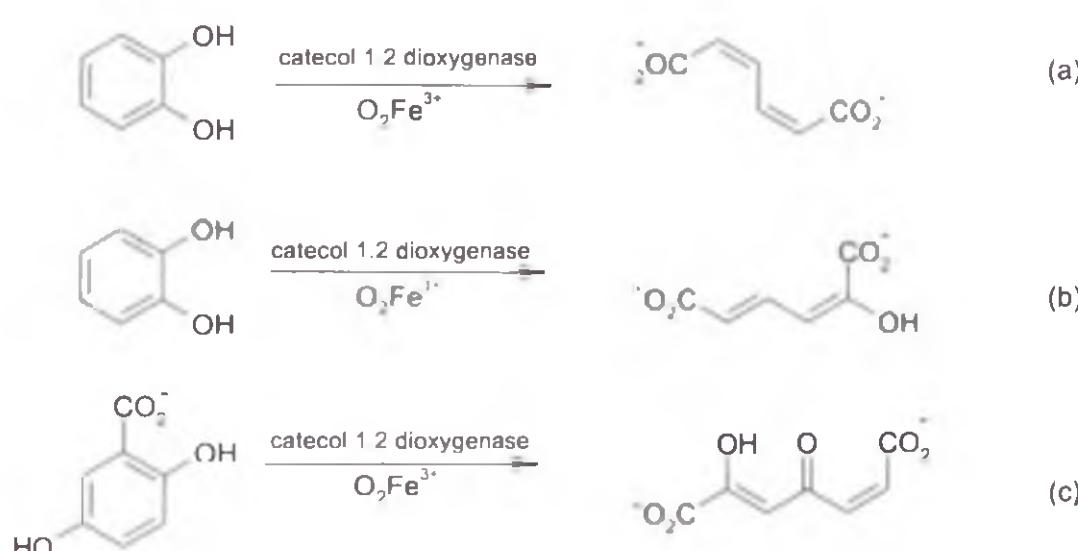


FIGURA 5. Vias metabólicas de degradação do catecol (a) *ortho*-clivagem; (b) *meta*-clivagem; (c) protocatecoato.

Através da ação de isomerases, hidrolases, tautomerases e descarboxilases, estas moléculas são reduzidas à acetil-CoA e são totalmente metabolizadas no ciclo de Krebs.

As condições físicas, como a presença de luz ou oxigênio, também são responsáveis pela regulação das vias metabólicas que envolvem a degradação de compostos aromáticos pelos microrganismos. A bactéria *Rhodopseudomonas palustris*, por exemplo, é capaz de crescer e degradar uma grande variedade destes compostos em condições anaeróbicas como catecol, ácido fenilacético, piridina e álcool benzílico, se na presença de luz (DÖNMEZ & ÖZTÜRK, 1999). Quando na presença de oxigênio, as enzimas microbianas responsáveis pela degradação anaeróbica dos compostos aromáticos são estáveis por até oito horas. Já em anaerobiose, a estabilidade destas enzimas é bem menor, aproximadamente duas horas (ÇINAR & GRADY Jr., 2001).

A bactéria anaeróbia *Ferroglobus placidus* é capaz de degradar os compostos aromáticos: ácido benzóico, fenol, 4-hidroxibenzoato, benzaldeído e ácido cinâmico, convertendo-os a dióxido de carbono através da oxidação de hidrogênio e redução de Fe³⁺ (TOR & LOVLEY, 2001). Algumas bactérias utilizam a via da metanogênese e convertem os compostos aromáticos a dióxido de carbono e metano, quando na ausência de outros aceitores, como Fe³⁺, sulfatos ou nitratos (WEINER; LOVLEY, 1998).

Conforme citado alguns compostos aromáticos apresentam grupos funcionais ou estruturas parciais, os quais não são encontrados naturalmente tendo sido adicionados por via sintética, caracterizando-os como xenobióticos. Vários processos enzimáticos estão envolvidos nos processos de biodegradação destes compostos, como as reações de hidrólise. As ligações amídica e éster presentes nas anilinas, feniluréias e carbamatos podem ser hidrolisadas por aril- e acil-amidases, as quais hidrolisam a ligação amídica presente na fenilamida. A degradação de corantes azóicos por *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* e *Stenotrophomonas acidaminiphila*, por exemplo, pode ocorrer sob condições anaeróbicas, através da clivagem redutiva da ligação azo, gerando aminas que são acumuladas no ambiente apresentando altos níveis de toxicidade (KHEHRA *et al.*, 2006).

As bactérias têm sido exaustivamente utilizadas nos processos de biodegradação de óleos e derivados do petróleo. Porém, os processos de fabricação de óleo de oliva também têm contribuído para o aumento de compostos fenólicos despejados no meio ambiente, tais como os ácidos 4-hidroximetoxibenzóico (ácido vanílico), 3,4-dimetoxibenzóicos (ácido verátrico), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico, degradados pela bactéria *Pseudomonas putida* e 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxifenilacético (ácido mandélico), 3,4-di-hidroxicinâmico (ácido isoferúlico) e ácido cinâmico, degradados pela bactéria *Ralstonia* sp. (GIOIA *et al.*, 2001).

As espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* têm sido aplicadas biotecnologicamente, especialmente na degradação de compostos xenobióticos devido à diversidade de suas vias catabólicas e capacidade de desenvolvimento em ambientes inóspitos (ABDEL-EL-HALEEM, 2003). As bactérias do gênero *Bacillus* têm sido utilizadas nos processos de

biodegradação de compostos tóxicos como as bifenilas policloradas. Estas espécies microbianas estão presentes nos solos, sendo muito eficazes nos processos de degradação de pesticidas organoclorados, como o hexa-clorocicloexano (KIM *et al.*, 2004).

Algumas bactérias também podem produzir alguns metabólitos secundários que auxiliam na degradação de compostos aromáticos, como os biosurfactantes. Estes compostos possuem grupos polares e apolares com propriedades tensoativas que possuem função fisiológica de emulsificação, solubilização e transporte de compostos aromáticos insolúveis em água, como os pesticidas (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Portanto, os biosurfactantes constituem uma alternativa interessante para auxiliar na degradação de compostos aromáticos.

3.2 Degradação de compostos aromáticos por fungos e leveduras

Os fungos ligninolíticos possuem vias alternativas para a degradação de compostos fenólicos e não-fenólicos, através da produção de enzimas extracelulares (RABINOVICH *et al.*, 2004). A produção destas enzimas é fundamental para a aplicação destes fungos em processos de biorremediação e biodegradação de compostos aromáticos.

A maioria dos fungos ligninolíticos é produtor constitutivo de enzimas envolvidas na degradação de lignina cuja inespecificidade e versatilidade de seus sistemas enzimáticos múltiplos, proporcionam uma grande vantagem para o uso destes microrganismos na biodegradação de xenobióticos. As principais enzimas extracelulares envolvidas nos processos de degradação da lignina e de compostos aromáticos de estruturas similares são a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP), a lacase e a glucose-1-oxidase (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

Dentre os fungos ligninolíticos, os basidiomicetos têm sido muito estudados por apresentarem grande potencial para uso em processos de biorremediação. Os fungos que causam a podridão branca em madeira, como o *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Heterobasidium annosum*, foram selecionados como os mais eficientes para a degradação de compostos aromáticos, como por exemplo, o ácido triclorobenzóico, visto que eles apresentaram maior tolerância à elevadas concentrações destes compostos, quando comparados com os fungos biotróficos *Paxillus involutus* e *Suillus bovinus* (DITTMAN *et al.*, 2002).

Alguns fungos requerem um período de pré-adaptação na presença de baixas concentrações dos compostos tóxicos para um melhor desempenho no processo de biodegradação. O *Phanerochaete chrysosporium*, por exemplo, demonstrou maior potencial de degradação de corantes têxteis quando cultivado previamente em meio sólido contendo os corantes carboxílicos ou sulfônicos que deveriam ser degradados (MARTINS *et al.*, 2002). Neste caso, não foi observado biossorção dos corantes pela biomassa fúngica, e através da análise dos produtos formados ao longo do cultivo, foi proposta uma via metabólica para a degradação destes corantes, esquematizada na Figura 6. O derivado catecólico sofre uma *ortho*-clivagem, é transformado em

ácido *cis,cis*-mucônico, em seguida é metabolizado até o ácido β -cetoadípico, e então mineralizado através da via do β -cetoacidato e ciclo de Krebs à dióxido de carbono,

água e amônia, contribuindo ainda para a produção de biomassa fúngica (MARTINS *et al.*, 2002).

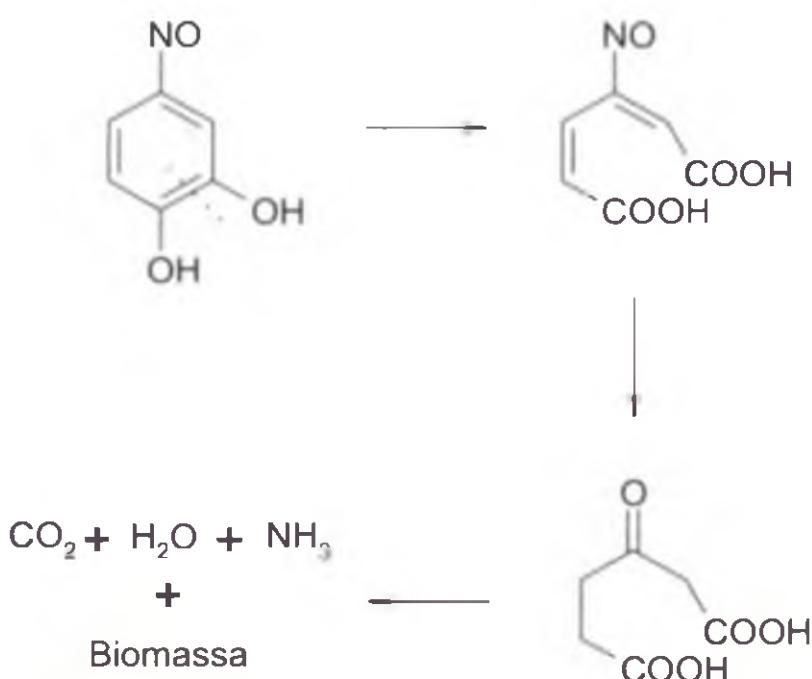


FIGURA 6. Via metabólica proposta para a degradação do catecol pelo fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, adaptado a partir de Martins *et al.* (2002).

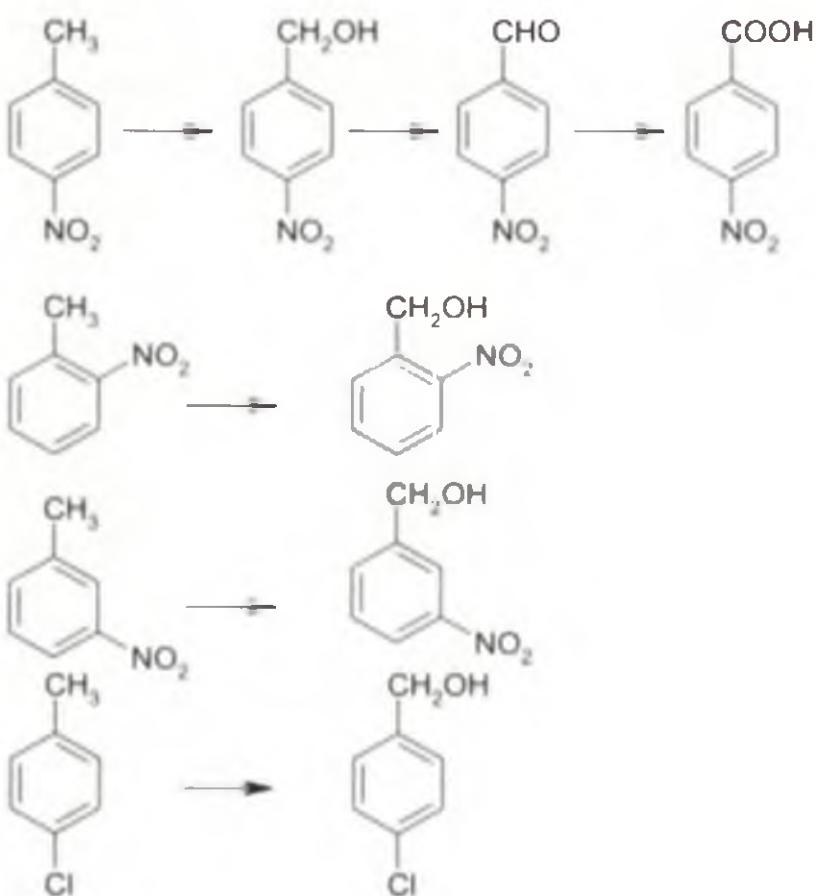


FIGURA 7. Reações de hidroxilação de estruturas derivadas do tolueno promovidas pela citocromo P450 monooxigenase, adaptado a partir de Teramoto *et al.* (2004).

A transformação dos compostos aromáticos pelos fungos ligninolíticos não é um papel exclusivo das polifenol oxidases (MARTIRANI *et al.*, 1996). A ação sinérgica da citocromo P450 monooxigenase com as enzimas ligninolíticas, como a LiP, MnP e a lacase é fundamental para a biodegradação de HAPs como o benzopireno e outros compostos aromáticos (WUNCH *et al.*, 1997).

Recentemente, foi verificado o envolvimento da citocromo P450 monooxigenase nos processos de degradação de compostos aromáticos pelo fungo *P. chrysosporium*, principalmente no metabolismo do 4-nitrofenol (TERAMOTO *et al.*, 2004). Alguns aromáticos não são oxidados pelas enzimas produzidas pelos fungos ligninolíticos visto que possuem elevado potencial de oxidação. A citocromo P450 monooxigenase é responsável pela hidroxilação destes compostos, resultando em derivados com menor potencial de oxidação e que apresentam estruturas mais suscetíveis à ação de oxidases. Alguns exemplos de reações de hidroxilação mediadas pela citocromo P450 monooxigenase no fungo *Phanerochaete chrysosporium* estão apresentadas na Figura 7.

A substituição de grupos químicos nas moléculas das substâncias aromáticas tornando-as mais lipofílicas também contribui consideravelmente para a diminuição de sua biotoxicidade e para a tolerância a maiores concentrações

destes compostos por algumas espécies microbianas. Por exemplo, a introdução do grupo carboxílico da molécula de catecol (1,2-dihidroxibenzeno) resultando no ácido protocatecóico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico) diminui a capacidade de degradação deste composto quando presente em baixas concentrações, por ser menos tóxico para os microrganismos (DITTMAN *et al.*, 2002).

A lipofilicidade apresentada pelos compostos aromáticos parece influenciar no grau de toxicidade que estas substâncias exercem quando presentes no meio ambiente. Assim sendo, a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por microrganismos pode ser facilitada pela presença de surfactantes, os quais atuam solubilizando estes compostos e deixando-os disponíveis no solo. O *Phanerochaete chrysosporium*, por exemplo, foi utilizado de forma eficiente em biorreatores para a remoção dos compostos aromáticos fenantreno e benzopireno solubilizados com Tween-80 (ZHENG & OBBARD, 2002).

A adição de compostos mediadores também pode colaborar nos processos de biodegradação, acelerando o metabolismo de compostos aromáticos pelos microrganismos. Os fungos *Trametes versicolor*, *Trametes cingulata*, *Trametes poças* e *Phanerochaete chrysosporium* cresceram e degradaram uma mistura de HAPs contendo fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno e benzoantraceno. A capacidade de degradação destas substâncias por estes fungos foi aumentada pela adição de compostos mediadores como Mn²⁺, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) e H₂O₂ (TEKERE *et al.*, 2005). As próprias enzimas secretadas pelos fungos ligninolíticos podem atuar como mediadoras nos processos de degradação de compostos aromáticos, através da geração de radicais livres, os quais são intermediários de reações catalisadas por elas, como a peroxidação de lipídios. Estes radicais livres podem atuar na degradação da lignina e de outros compostos aromáticos recalcitrantes (SREBOTNIK & BOISSON, 2005).

A dinâmica de biodegradação de compostos aromáticos também pode ser diferente de acordo com o microrganismo utilizado. O fungo *Fusarium solani* metabolizou totalmente os compostos aromáticos fenantreno e metil-fenantreno durante um período de 30 dias, enquanto que outras espécies como *Aspergillus terreus*, *Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* e *Penicillium chrysogenum* apresentaram resultados semelhantes somente após 90 dias de cultivo (COLOMBO *et al.*, 1996). A tolerância a diferentes concentrações destes compostos no ambiente também depende do gênero e ou da espécie do fungo. Fungos como *Dichotomyces cepii*, *Cryptococcus albidos*, *Rhizopus arrhizus*, *Bjerkandera adusta* e *Penicillium chrysogenum* na presença de antraceno na concentração de 1 g/L não foi tóxica, porém, o crescimento de *Doratamyces stemonitis* e *Cylindrocarpon destructans* foi inibido na presença de concentrações menores que 0,01 g/L deste mesmo composto (KRIVOBOK *et al.*, 1998).

A capacidade de degradação de compostos aromáticos por leveduras não tem sido muito descrita na literatura. Recentemente, leveduras psicrófilas capazes de degradar compostos fenólicos foram isoladas na região dos Alpes Andinos. A toxicidade dos compostos avaliados foi relacionada à sua estrutura química. Os compostos fenólicos que continham grupos substituintes metila foram mais tóxicos do que os que apresentavam substituintes hidróxicatecol ou metóxiguaiaçol (BERGAUER *et al.*, 2005).

Embora os fungos basidiomicetos, que causam podridão branca em madeira, tenham sido mais estudados nos processos de biodegradação de uma infinidade de compostos aromáticos, os ascomicetos ligninolíticos também constituem um grupo que apresenta potencial para aplicação em processos de biorremediação de compostos xenobióticos recalcitrantes, incluindo-se as bifenilas policloradas e dioxinas (FIELD *et al.*, 1993).

O corante polimérico Poly R-478 tem sido empregado para selecionar fungos ligninolíticos, objetivando selecionar microrganismos úteis para processos de biorremediação. Vários fungos de diferentes gêneros descoloriram o referido corante poliaromático: *Coniochaeta*, *Pleurotus*, *Camarosporium*, *Humicola*, *Philophora*, *Botryosphaeria*, *Sordaria*, *Chaetomium*, *Philophora*, *Fusarium*, *Endothiella*, *Cytospora*, *Seimatosporium* e *Pestalotiopsis* (BARBOSA *et al.*, 1996). Houve descoloração em diferentes níveis, dependendo do microrganismo, detectada através da modificação do espectro de absorção do corante, quando comparado com o controle (BARBOSA *et al.*, 1995).

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foi selecionado como ligninolítico através da descoloração do Poly R-478. Posteriormente, verificou-se que é produtor constitutivo de lacase e esta polifenol oxidase foi fortemente induzida quando o fungo foi cultivado na presença de concentrações elevadas do álcool aromático 3,4-dimetoxi-benzílico (BARBOSA *et al.*, 1996; VASCONCELOS *et al.*, 2000; DEKKER & BARBOSA, 2001; CUNHA *et al.*, 2003).

O álcool veratrílico é um metabólito secundário que parece ter importantes funções na degradação de lignina, como por exemplo, pode atuar como um radical catiônico para remediar reações redox entre lignina peroxidase (LiP) e lignina, ou como um estabilizador de LiP (BOURBONNAIS & PAICE, 1989; FIECHER, 1993; KHINDARIA *et al.*, 1995). Este álcool aromático parece ter papel regulador na síntese de enzimas envolvidas na degradação de biopolímeros constituintes da parede celular de vegetais, incluindo-se as enzimas ligninolíticas (DEKKER *et al.*, 2001).

O crescimento do ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foi avaliado na presença de diferentes concentrações de vários compostos fenólicos como o guaiacol, catecol, 2,6-dimetóxifenol, tetraclorofenol, e também não fenólicos como o álcool veratrílico, álcool vanílico, veratraldeído, ácido benzóico, ácido 2,6-dimetóxifenólico, ácido verátrico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido abiético e o herbicida Imazaquin (DEKKER, BARBOSA & SARGENT, 2002). O desenvolvimento deste ascomiceto ligninolítico na presença de todos os compostos avaliados demonstrou que este fungo apresenta potencial de aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados com os referidos compostos aromáticos.

Um estudo comparativo do crescimento do *Botryosphaeria rhodina* e do *Pleurotus ostreatus*, concomitantemente com a produção de lacases por ambos os fungos, na presença do herbicida Scepter, que tem como princípio ativo o Imazaquin, foi desenvolvido tanto em fermentação sólida quanto submersa. Os resultados demonstraram que o *Pleurotus ostreatus* pode tolerar concentrações de Scepter de até 6% (v/v), enquanto que o *Botryosphaeria rhodina* cresceu em até 50% (v/v)

herbicida (REZENDE *et al.*, 2005). Estes mesmos pesquisadores observaram que o comportamento do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* em relação ao do ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, foi completamente diferente. Enquanto o *B. rhodina* removeu cerca de 80% do imazaquin presente no meio de cultivo, em 144 horas de cultivo, o *P. ostreatus* removeu aproximadamente 15% do herbicida. Entretanto, relataram que ambos os fungos possuem potencial de aplicação para a biorremediação do herbicida do ambiente.

A capacidade de degradação de compostos como: catecol, guaiacol, ácido verátrico, veratraldeído, ácido abiético e 2,5-xilidina, pelo fungo *B. rhodina* em fermentação submersa também foi avaliada recentemente (COVIZZI, 2005). O catecol é um composto aromático amplamente distribuído em ambientes aquáticos na forma de catecolatos, os quais são agentes quelantes naturais que apresentam uma alta afinidade por íons metálicos essenciais à vida microbiana (BENITE & MACHADO, 2002). O catecol é depositado na natureza através do despejo de resíduos das indústrias químicas, refinarias de petróleo, e também da manufatura do couro (ALARCÓN *et al.*, 2003).

Os corantes azóicos utilizados nas indústrias têxteis apresentam em sua estrutura química grupos fenólicos como o guaiacol e o 2,6-dimetóxifenol (ADOSINDA *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2002). Estes compostos podem ser degradados por fungos ligninolíticos, porém, os sistemas naturais de microrganismos em rios e lagos não possuem mecanismos adequados para sua biodegradação, o que faz com que haja acúmulo destas substâncias que são extremamente nocivas ao meio ambiente (GUARATINI & ZANONI, 2000).

O ácido verátrico e o veratraldeído são encontrados nas águas residuais das indústrias papeleiras, resultante dos processos de polpação e branqueamento da madeira. O ácido abiético é componente de resinas ácidas de coníferas (madeira macia) e também faz parte de alguns efluentes de indústria papeleira (De HEREDIA *et al.*, 2001). A concentração elevada destas substâncias torna o ambiente tóxico e indesejável, indicando a importância do desenvolvimento de pesquisas que avaliem o grau de toxicidade e a biodegradabilidade destes compostos toxigênicos.

O *Botryosphaeria rhodina* degradou o catecol, apresentando um índice de degradação relativa de 100% quando o microrganismo foi cultivado em 2,5 mM deste composto fenólico. Porém, com o aumento da concentração do mesmo no meio de cultivo, a porcentagem desta degradação diminuiu para níveis inferiores a 75%, tendo sido acompanhada pela inibição do crescimento microbiano. Quando cultivado em guaiacol, o *B. rhodina* apresentou uma taxa de degradação relativa também de 100% nas concentrações de 1,25 até 2,5 mM, enquanto que nas concentrações de 5,0 e 7,5 mM a taxa de degradação caiu para 2%, tendo sido acompanhado também pela diminuição da produção de biomassa fúngica. A substituição de um grupo fenólico existente no catecol (1,2-benzenodiol), por um grupo metóxi presente no guaiacol (2-metóxifenol) aumentou a toxicidade do meio de cultivo para o *B. rhodina*, o que foi observado através da resistência à degradação deste último composto. Estes dados de Covizzi (2005) confirmam que a toxicidade está diretamente relacionada com a respectiva estrutura química, conforme comentado por Dittman e colaboradores em 2002.

O *B. rhodina* degradou completamente ácido verátrico nos cultivos que continham 4,0mM. Porém, esta concentração foi tóxica para o desenvolvimento do referido fungo, diminuindo a produção de biomassa fúngica, demonstrando que a degradação do composto aromático não está diretamente relacionada com o crescimento microbiano. Esta observação foi confirmada quando o mesmo ascomiceto foi cultivado em diferentes concentrações de veratraldeído (2,0; 4,0 e 8,0 mM), visto que taxas de degradação relativa foram de 100% e a produção de biomassa fúngica também diminuiu, na presença das maiores concentrações do composto aromático. A substituição do grupo carboxílico presente no ácido verátrico (ácido 3,4-dimetoxibenzólico) pelo grupamento aldeídico proporcionou um aumento da tolerância do microrganismo na presença de maiores concentrações de veratraldeído. No caso do ácido abiético (4,0 e 6,0 mM), observou-se que uma taxa de degradação relativa, também de 100%, foi acompanhada pela diminuição do crescimento microbiano (COVIZZI, 2005).

O 2,5-xilidina tem sido relatado como indutor em potencial para a produção de lacases por fungos (LEONOWICZ *et al.*, 2001). Sabe-se que a adição de 2,5-xilidina ao meio de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* induziu a expressão gênica de isoenzimas e aumentou consequentemente a produção de lacases pelo fungo (SODEN & DOBSON, 2001). O 2,5-xilidina é um composto xenobiótico, ou seja, é uma substância sintetizada quimicamente e não ocorre naturalmente. Possui uma estrutura química análoga à anilina e é também um composto intermediário da produção de corantes azóicos. Porém, estudos sobre seus possíveis efeitos em mamíferos têm demonstrado que, quando presente em pequenas concentrações, pode aumentar a incidência de tumores subcutâneos em ratos. Entretanto, para o *B. rhodina* a adição de 2,5-xilidina (1,0, 2,0, 4,0 e 6,0mM) não aumentou a produção de lacases em relação aos cultivos controle. A concentração de 6,0 mM deste composto foi tóxica para o microrganismo, inibindo a produção de biomassa fúngica. As taxas de degradação relativa de 2,5-xilidina pelo *B. rhodina* foram menores que 25% em todas as concentrações avaliadas, demonstrando que o microrganismo não se adaptou metabolicamente a presença deste composto nas concentrações avaliadas (COVIZZI, 2005).

Pesquisas sobre a eficiência catabólica dos basidiomicetos e ascomicetos na biodegradação de compostos aromáticos aliadas à engenharia genética precisam ser continuadas para selecionar os microrganismos mais adequados para a completa mineralização de cada poluente de interesse.

4. Considerações finais

Embora os compostos aromáticos ocorram naturalmente, o desenvolvimento industrial tem proporcionado um aumento significativo deles, tornando o ambiente tóxico e perigoso para a saúde humana e ambiental. Os microrganismos, independentemente se algas, bactérias ou fungos são as ferramentas imprescindíveis que devem ser estudados para uso em processos de biorremediação. O consórcio de microrganismos pode ser a solução, assim como a interação com processos físico-

químicos, que já ocorrem naturalmente. Entretanto, quanto maior o domínio do conhecimento nas áreas de genética, bioquímica e fisiologia de cada grupo microbiano frente ao composto aromático ou grupo de compostos de interesse, maior a possibilidade de sucesso na sua mineralização. Um banco de microrganismos poderá ser criado cadastrando-se mais adequados para cada grupo de compostos aromáticos a serem mineralizados, com as especificações das condições ótimas de crescimento e o tempo necessário para a biodegradação completa do composto aromático desejado. Isto certamente irá favorecer os processos de biorremediação tanto em casos acidentais como para remediar solos, águas e ambientes que estão sendo contaminados gradualmente. A natureza certamente ficará agradecida; pois, se tecnologias promoveram a sua contaminação, tecnologias poderão remediá-la e limpá-la com o auxílio do metabolismo peculiar dos microrganismos. O que é necessário é a persistência do homem na pesquisa, para descobrir quais são os microrganismos apropriados para acelerarem a mineralização de cada poluente, na proporção adequada, para preservar a natureza de hoje e de amanhã.

Referências

- ABDEL-EL-HALEEM, D. *Acinetobacter*: Environmental and Biotechnological Applications. *African Journal of Biotechnology*, v.2, p.71-74, 2003.
- ABED, R.M.M.; KÖSTER, J. The Direct Role of Aerobic Heterotrophic Bacteria Associated With Cyanobacteria in the Degradation of Oil Compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.55, p.29-37, 2005.
- ADOSINDA, M.; MARTINS, M.; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I.M.; QUEIROZ, M. J.; LIMA, N. Biodegradation of Bioaccessible Textile Azo Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, v.89, p.91-98, 2001.
- ALARCÓN, N.A.; QUEIROZ, E.F.; VERGARA, A. O.; AROCA, G. E. Tratamiento Biológico de Aire Contaminado con Hidrocarburos Volátiles en un Biorreactor de Lecho Circulante Airlift. In: *XV Congreso De Ingeniería Sanitaria Y Ambiental*, 2003, Aidis, Chile, p.42.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A.; DURAN, N. Tratamento de Efluentes Industriais por Processos Oxidativos na Presença de Ozônio. *Química Nova*, v.27, p.818-824, 2004.
- ANA - Agência Nacional de Águas. Disponível em: <<http://wwwана.gov.br>>. Acesso em 20 maio de 2005.
- ARUNACHALAM M.; MOHAN, N. SUGADEV, R.; CHELLAPPAN, P. MAHADEVAN, A. Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. *Biochimica and Biophysics Acta*, v.1621, p.261-265, 2003.
- BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl Alcohol as Inducer of Laccase by the Ascomycete *Botryosphaeria* sp., when Screened on Polymeric Dye Poly R-478. *Letters in Applied Microbiology*, v.23, p.93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBOKE, I.; HARDY, G. *In vivo* decolorization of Poly R-478 as a method for screening lignolytic microorganisms for use in bioremediation. In: *Proceedings of the 4th Pacific Rim Biotechnology Conference*, 1995, Melbourne, Australia, p.88-90.
- BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P. Sideróforos: Uma Resposta dos Microrganismos. *Química Nova*, v.25, p.1155-1164, 2002.
- BERGAUER, P.; FONTEYN, P.A.; NOLARD, N.; SCHINNER, F.; MARGESIM, R. Biodegradation of Phenol and Phenol-Related Compounds by Psychrophilic and Cold-Tolerant Alpine Yeasts. *Chemosphere*, v.59, p.909-918, 2005.
- BERTAZOLLI, R.; PELEGRINI, R. Descoloração e Degradação de Poluentes Orgânicos em Soluções Aquosas Através do Processo Fotoeletroquímico. *Química Nova*, v.25, p.477-482, 2002.
- BORJA, J.; TALEON, D.M.; AURESENIA J.; GALLARDO, S. Polychlorinated Biphenyls and Their Biodegradation. *Process Biochemistry*, v.40, p.1999-2013, 2005.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Oxidative Enzymes from the Lignin Degrading Fungus *Pleurotus ostreatus* sajor-caju. In: LEWIS, N.G.; PAICE, M.G. (Ed.). *Plant Cell Wall Polymers Biogenesis and Biodegradation*. Washington, DC: American Chemical Society, 1989. p.471-481.

- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 20 maio 2005
- Chemical Specific soil half-life - Appendix G.** In: **Office of Environmental Health Hazard Assessment.** Disponível em: <http://www.oehha.ca.gov/air/hot_spots/pdf/apeng.pdf>. Acesso em 20 maio 2005.
- ÇINAR, Ö.; GRADY JR., C.P.L.** Aerobic and Anaerobic Biodegradation of Benzoate Stability of Biodegradative Capability Under Endogenous Conditions. **Water Research.** v.35, p.1015-1021, 2001.
- COLOMBO, J.C.; CABELLO, M.; ARAMBRI, A. M.** Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by Natural Soil Microflora and Pure Cultures of Imperfect and Lignolitic Fungi. **Environmental Pollution.** v.94, p.355-362, 1996.
- COVIZZI, L.G.** Avaliação da Degradção de Compostos Tóxicos pelo *Botryosphaeria rhodina*. 2005. 79p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual de Londrina-UEL, Londrina, PR.
- CUNHA, M.A.A.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E. C.; DEKKER, R.F.H.** The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology.** v.43, p.385-392, 2003.
- DE HEREDIA, J.B.; TORREGROSA, J.; DOMINGUEZ, J.R.; PERES, J.A.** Kinetic Model for Phenolic Compound Oxidation by Fenton's Reagent. **Chemosphere.** v.45, p.85-90, 2001.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA A.M.; SARGENT, K.** The Effect of Lignin-Related Compounds on the Growth and Production of Laccases by the Ascomycete, *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology.** v.30, p.374-80, 2002.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.** The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology.** v.28, p.81-88, 2001.
- DEKKER, R.F.H.; VASCONCELOS, A.F.D.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; PACCOLA-MEIRELLES, L.** A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the lignolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.: influence of carbon source. **Biotechnology Letters.** v.23, p. 1987-1993, 2001.
- DÍAZ, E.; FERNÁNDEZ, A.; PRIETO, M.A.; GARCÍA, J.L.** Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.65, p.523-569, 2001.
- DITTMANN, J.; HEYSER, W.; BÜCKING, H.** Biodegradation of Aromatic Compounds by White-Rot and Ectomycorrhizal Fungal Species and the Accumulation of Chlorinated Benzoic Acid in Ectomycorrhizal Pine Seedlings. **Chemosphere.** v.49, p.297-306, 2002.
- DÖNMEZ, G.Ç.; ÖZTÜRK, A.** Biodegradation of Homocyclic and Heterocyclic Aromatic Compounds by *Rhodopseudomonas palustris* Strains. **Turkish Journal of Biology.** v.23, p.507-511, 1999.
- FIECHER, A.** Function and Synthesis of Enzymes Involved in Lignin Degradation. **Journal of Biotechnology.** v.30, p.49-55, 1993.
- FIELD, J.A.; JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; BONT, J. A. M.** Screening for Ligninolytic Fungi Applicable to the Biodegradation of Xenobiotics. **Trends in Biotechnology.** v.11, p.44-49, 1993.
- GIOIA, D.; BERTIN, L.; FAVA, F.; MARCHETTI, L.** Biodegradation of Hydroxylated and Methoxylated Benzoic, Phenylacetic and Phenylpropenoic Acids Present in Olive Mill Wastewaters by Two Bacterial Strains. **Research in Microbiology.** v.152, p.83-93, 2001.
- GOLOVLEVA, L.A.; AHARONSON, N.; GREENHALGH, R.; SETHUNATHAN, N.; VONK, J.W.** The Role and Limitations of Microorganisms in the Conversion of Xenobiotics. **Pure and Applied Chemistry.** v.62, p.351-364, 1990.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.** Corantes Têxteis. **Química Nova.** v.23, p.71-78, 2000.
- KALBITZ, K.; SCHWESING, D.; SCHMERWITZ, J.; KAISER, K.; HAUMAIER, L.; GLASER, B.; ELLERBROCK, R.; LEINWEBER, P.** Changes in Properties of Soil-Derived Dissolved Organic Matter Induced by Biodegradation. **Soil Biology and Biochemistry.** v.35, p.1129-1142, 2003.
- KHEHRA, M.S.; SAINI, H.S.; SHARMA, D.K.; CHADHA, B.S.; CHIMNI, S.S.** Biodegradation of Azo Dye C.I. Acid Red 88 by an Anoxic-Aerobic Sequential Bioreactor. **Dyes and Pigments.** v.70, p.1-7, 2006. In press.
- KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D.** Evidence for Formation of the Veratryl Alcohol Cation Radical by Lignin Peroxidase. **Biochemistry.** v.34, p.6020-6025, 1995.
- KIM, A.A.; PESTSOV, G.V.; YADGAROV, K.H. T.; DZHUMANIYAZOVA, G. I.; ZINOV'EV, P.V.; DZHURAEVA, G.T.; ABDUKARIMOV, A.A.; GINS, V.K.** Microorganisms Degrading Polychlorinated Biphenyls. **Applied Biochemistry and Microbiology.** v.40, p.60-62, 2004.
- KRIVOBOJK, S.; MIRIOUCHKINE, E.; SEILGER-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J-L.** Biodegradation of Anthracene by Soil Oil Fungi. **Chemosphere.** v.37, p.523-530, 1998.

- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORRA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Química Nova*, v.25, p.78-82, 2002.
- LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal Laccase: Properties and Activity on Lignin. *Journal of Basic Microbiology*, v.41, p.185-227, 2001.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N-S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genomics and Biology*, v.27, p.173-183, 1999.
- MAKI, H.; HIRAYAMA, N.; HIWATARI, T.; KOHATA, K.; UCHIYAMA, H.; WATANABE, M.; YAMASAKI, F.; FURUKI, M. Crude Oil Bioremediation Field Experiment in the Sea of Japan. *Marine Pollution Bulletin*, v.47, p.74-77, 2003.
- MARTINS, M.A.M.; QUEIROZ, M.J.; SILVESTRE, A.J.D.; LIMA, N. Relationship of Chemical Structures of Textile Dyes on the Pre-Adaptation Medium and potentialities of their Biodegradation. *Research in Microbiology*, v.153, p.361-368, 2002.
- MARTIRANI, L.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; SANNIA, G. Reduction of Phenol Content and Toxicity in Olive Oil Mill Waste Waters with the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, v.30, p.1914-1918, 1996.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, v.25, p.772-776, 2002.
- O LOUGHLIN, E.J.; SIMS, G.K.; TRAINA, S.J. Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. Isolated from Subsurface Sediment. *Biodegradation*, v.10, p.93-104, 1999.
- PEREIRA NETTO, A.D.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A. E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus Derivados Nitrados (NHPAS): uma Revisão Metodológica. *Química Nova*, v.23, p.765-773, 2000.
- RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASIL'CHENKO, L.G. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. *Applied and Biochemical Microbiology*, v.40, p.1-17, 2004.
- RAUEN, T.G.; DEBACHER, N.A.; SIERRA, M. M. S.; SIERRA, E. J. S. Tensoatividade de Ácidos Húmicos de Procedências Distintas. *Química Nova*, v.25, p.909-913, 2002.
- REZENDE, M.I.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOS, A.F.D.; HADDAD, R.; DEKKER, R.F.H. Growth and Production of Laccases by the Ligninolytic Fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, Cultured on Basal Medium Containing the Herbicide, Scepter® (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*, v.45, p.465-474, 2005.
- SEMPLE, K.T.; CAIN, R.B.; SCHMIDT, S. Biodegradation of Aromatic Compounds by Microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, p.291-300, 1999.
- SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. Differential Regulation of Laccase Gene Expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, v.147, p.1755-1763, 2001.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. *Organic Chemistry*, 8 ed.. New Jersey : Wiley, 2004.
- SREBOTNIK, E.; BOISSON, J-N. Peroxidation of Linoleic Acid During the Oxidation of Phenols by Fungal Laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.36, p.785-789, 2005.
- TEKERE, N.; READ, J.S.; MATTIASSEN, B. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation in Extracellular Fluids and Static Batch Cultures of Selected Sub-Tropical White Rot Fungi. *Journal of Biotechnology*, v.115, p.367-377, 2005.
- TERAMOTO, H.; TANAKA, H.; WARIISHI, H. Fungal Cytochrome P450s Catalyzing Hydroxylation Substituted Toluenes to form their Hydroxymethyl Derivatives. *FEMS Microbiology Letters*, v.234, p.255-260, 2004.
- THIELE, S.; BRÜMER, G.W. Bioformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Under Oxygen Deficient Conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v.34, p.733-735, 2002.
- TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E.S. Degradação de BTXS Via Processos Oxidativos Avançados. *Química Nova*, v.28, p.61-64, 2005.
- TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E.S. Contaminação de Águas por BTXS e Processos Utilizados na Remediação de Sítios Contaminados. *Química Nova*, v.27, p.441-446, 2004.
- TOR, J.M.; LOVLEY, D.R. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds Coupled to Fe (III) Reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environmental Microbiology*, v.3, p.281-287, 2001.
- VASCONCELOS, A.F.D.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; SCARMINIO, I.S.; REZENDE, M.I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochemistry*, v.35, p. 1131-38, 2000.

WEINER, J.M.; LOVLEY, D.R. Rapid Benzene Degradation in Methanogenic Sediments from a Petroleum-Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology.**, v.64, p.1937-1939, 1998.

WUNCH, K.G.; FEIBELMAN, T.; BENNET, J.W. Screening for Fungi Capable of Removing Benzo[a]pyrene in Culture. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, v.47, p.620-624, 1997.

ZHENG, Z.; OBBARD, J.P. Removal of Surfactant Solubilized Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a Rotating Biological Reactor. **Journal of Biotechnology.**, v.96, n.3, p.241-249, 2002.

Biodegradação de Organoclorados no Solo por Basidiomicetos Lignocelulolíticos

Vera Lúcia Ramos Bononi¹, Kátia Maria Gomes Machado²,
Dácio Roberto Matheus³ e Vera Maria Vitali³



Foto: I.S. Melo

I. Os basidiomicetos lignocelulolíticos na natureza

Na natureza, os basidiomicetos lignocelulolíticos crescem principalmente sobre madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal. Geralmente sapróbios, ocasionalmente podem ser fitopatógenos, ocorrendo praticamente em todos os ecossistemas naturais e modificados, sendo mais abundantes em áreas com maior concentração de árvores mortas ou disponibilidade de resíduos agrícolas. Algumas espécies apresentam certo grau de especificidade e dependem da ocorrência de um substrato definido. Outras, menos exigentes, ocorrem sobre diversos substratos e possuem ampla distribuição geográfica.

Nos países europeus, Ásia e México, os fungos em geral são mais conhecidos e algumas espécies recebem nomes populares. No Brasil, a falta de conhecimento é uma realidade e muitas espécies diferentes são chamadas “orelhas de pau” ou “casinhas de sapo”. Os índios e seus descendentes chamavam os cogumelos, em geral, de urupês.

Hoje, acredita-se que existam mais de 200.000 espécies de basidiomicetos lignocelulolíticos, a maioria dos quais estariam nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, até o momento, não existe um registro completo, embora numerosos trabalhos citando espécies da Amazônia ao Rio Grande do Sul tenham sido publicados no século XX (THEISSEN, 1911; TORREND, 1938; TEIXEIRA, 1945; VIEGAS, 1959; RICK, 1963; FIDALGO, 1963; FIDALGO, 1968; FIDALGO & FIDALGO, 1957, 1962; FIDALGO *et al.*, 1965; FURTADO, 1967, 1969; BONONI, 1976, 1979 a, b, c, 1984; BONONI *et al.*, 1981; GUERRERO & HONRICH, 1983; HJORSTSTAM & BONONI, 1986; CAVALCANTI, 1976; SOUZA, 1977, 1980; SILVA, 1987; SUSIN, 1987; CAPELARI & MAZIERO, 1988; CAPELARI, 1989; LEITE, 1990; SILVEIRA, 1990; FONSECA, 1994; GUGLIOTA, 1994). Algumas espécies são muitos comuns como o *Schizophyllum comune*, o *Gloeophyllum striatum*, muitas espécies de *Phellinus*, *Ganoderma*, *Coriolus*, *Trametes* e *Picnoporus sanguineus*.

Os basidiomicetos lignocelulolíticos estão classificados em duas grandes ordens dos Basidiomicetos: Agaricales e Aphyllophorales e em suas muitas famílias (ALEXAPOULOS *et al.*, 1996). Possuem tamanhos, formas, cores e consistências diversificadas. Podem ser microscópicos ou ter até 2,0 m de diâmetro, presos ao substrato através de estipe, sésseis ou na forma de manchas regulares ou irregulares na superfície da madeira. Ocorrem também na forma de típicos guarda-chuvas ou efuso-reflexas como pequenas orelhas de madeira, sendo comuns nas florestas brasileiras. São versáteis e, num mesmo tronco de árvore, uma espécie pode apresentar mais de uma forma ou cor.

A coloração desses cogumelos pode variar durante as diferentes fases do desenvolvimento, sendo bastante comuns as espécies com uma ou muitas tonalidades de castanho, amarelo, branco, violeta entre outros. O *P. sanguineus* é uma espécie cosmopolita e comum no Brasil, geralmente aparecendo em clareiras. Quando jovem,

é vermelho alaranjado-vivo e, à medida que o espécime envelhece, desbota, ficando praticamente branco e difícil de identificar sem a observação de suas microestruturas.

Muitos basidiomicetos não possuem odor e nem sabor, mas algumas espécies possuem cheiro muito característico e o sabor pode ser agradável ou amargo. Não são conhecidas espécies venenosas de basidiomicetos que crescem em madeira, embora exceções possam ocorrer. Muitas espécies são comestíveis, mas para serem comercialmente interessantes precisam ter textura e paladar adequados, como no caso de muitas espécies de *Pleurotus*. Na natureza, esses fungos são utilizados por insetos e outros animais como alimento e local para criação. A reprodução dos basidiomicetos lignocelulolíticos, em geral, é sexuada com a formação dos basidiosporos. Estágios assexuados são raros e denominados anamorfos. Ocionalmente esporos assexuais, como conídios e clamidosporos, podem ocorrer concomitantemente com basidiosporos em um mesmo basidioma. Geralmente as espécies são heterotálicas com compatibilidade bi ou tetrapolar dos esporos.

Os basidiomicetos lignocelulolíticos crescem inicialmente dentro da madeira, colonizando-a, e suas hifas formam uma rede, nem sempre visível a olho nu, mais ou menos extensa, preenchendo o lúmen das células, passando de uma célula a outra através de poros da parede celular e em alguns casos destruindo a lamela média. Após certo período de tempo, que pode durar uns poucos dias até muitos anos, variável de espécie para espécie condições ambientais, os basidiomas (corpos de frutificação) emergem. Os basidiomicetos lignocelulolíticos são extremamente importantes como decompõsores e os principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam os componentes da madeira: celulose, hemicelulose e lignina, de onde obtêm energia para seu crescimento e reprodução. Causam a podridão branca da madeira.

Os fungos apodrecedores da madeira são os contribuintes primários para a degradação da madeira na natureza, secretando enzimas extracelulares. A degradação da lignina, é um processo oxidativo, extracelular e não específico. Para que a degradação da lignina ocorra é necessária outra fonte alternativa de carbono, que em condições naturais é suprida pela celulose, hemicelulose, carboidratos simples e glicerol (BOOMINATHAN & REDDY, 1992).

A lignina é uma molécula extremamente complexa, um biopolímero de alto peso molecular de estrutura irregular, amorfo, tridimensional e heterogêneo. Os polímeros são fortemente interligados entre si por radicais livres e sem pontes rapidamente hidrolizáveis. É sintetizado a partir de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcoois sinapil, conifenil e cumaril unidos por ligações covalentes éter ou éster com os polissacarídeos da parede celular (HARTLEY & FORD, 1985). A Figura 1 mostra a estrutura da molécula de lignina , baseada em Adler (1977).

A degradação da madeira ocorre simultaneamente com a decomposição dos polissacarídeos celulose e hemicelulose e da lignina, pela ação integrada e sucessiva de bactérias, actinomicetos e fungos. Os açúcares são facilmente metabolizados pelos fungos, que também os utilizam para a produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metabólito que participa das reações enzimáticas de degradação da lignina. Sabe-se, hoje, que a degradação da lignina é catalisada por enzimas oxidorredutases (peroxidases e lacases), que oxidam unidades fenólicas e não fenólicas da lignina. Outras enzimas, como a glioxal oxidase, a veratril álcool oxidase e a quinona oxidoreduktase, também participam do processo.

As reações de degradação da lignina são explicadas por um mecanismo que começa com a subtração catalisada de um elétron do núcleo aromático da lignina para formar radicais cationícicos instáveis. Subsequentemente, vários produtos são formados por reações não enzimáticas desses radicais cationícicos com a água e nucleófidos (Figura 2).

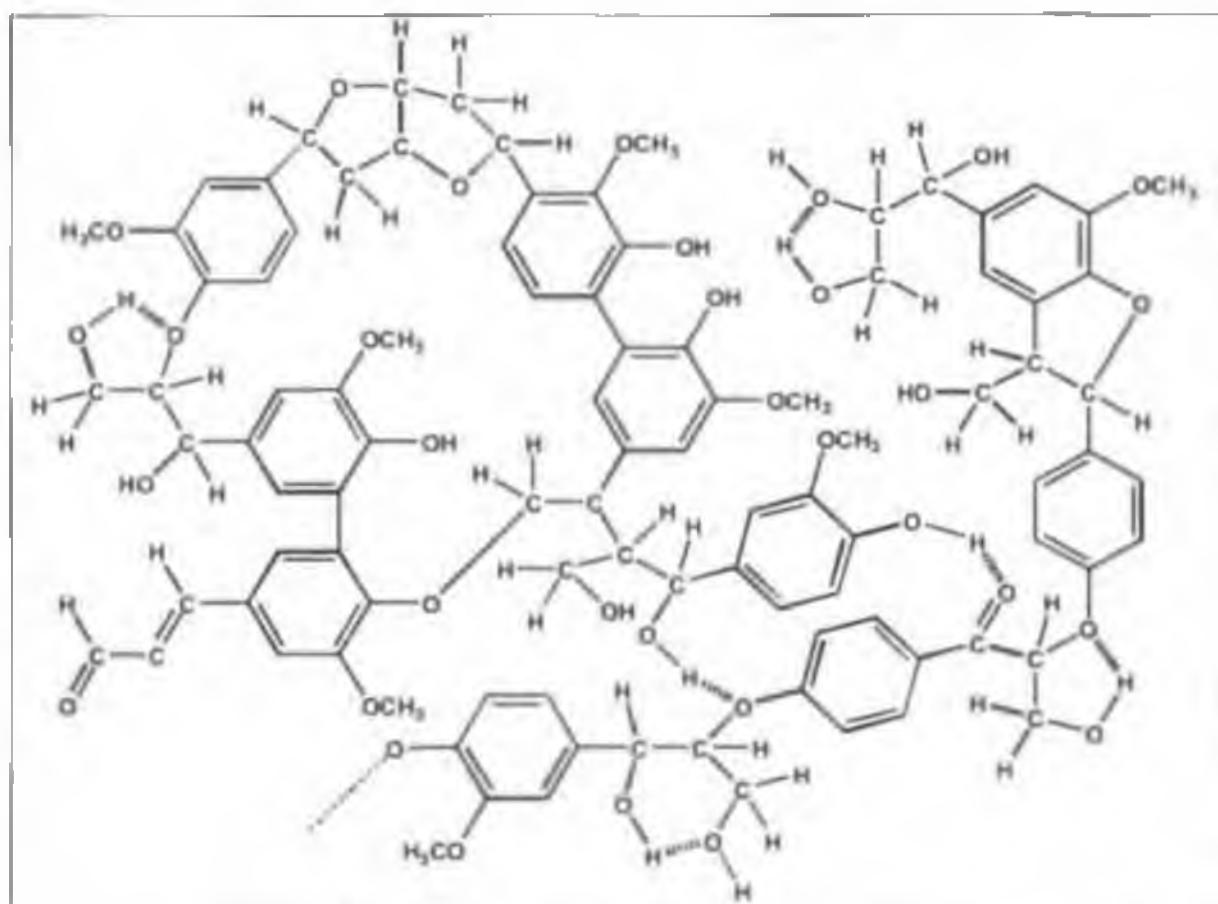


FIGURA 1. Estrutura da lignina.
Fonte: Adler (1977)

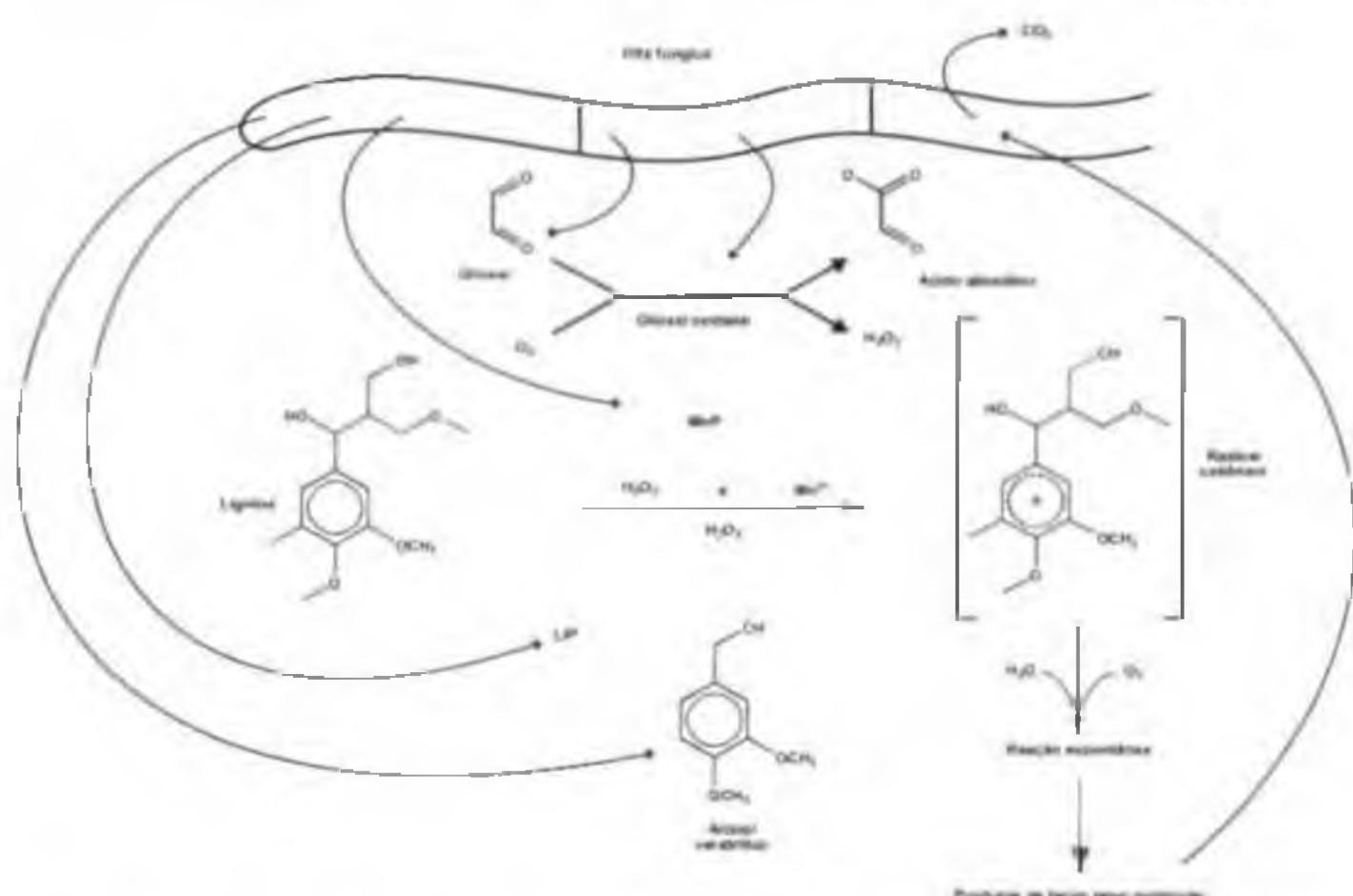


FIGURA 2. Esquema geral do processo de degradação da lignina por *Phanerochaete chrysosporium* mostrando uma hifa e os produtos extracelulares. Fonte: adaptado de Kirk (1993)

Sem a atuação dos basidiomicetos lignocelulolíticos na degradação da lignina, seria muito difícil a vida no planeta, o qual não passaria de um imenso depósito de troncos e resíduos, que permaneceriam por séculos.

2. Os basidiomicetos lignocelulolíticos em biotecnologia

Tradicionalmente, algumas espécies de basidiomicetos lignocelulolíticos têm sido cultivadas para alimentação humana, como *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Auricularia* spp. Algumas espécies cultivadas são também utilizadas no enriquecimento e na melhoria da digestibilidade de rações animais.

A elucidação do processo de degradação da lignina conduziu a inúmeras pesquisas para a utilização dos fungos de podridão branca em processos biotecnológicos. Uma das aplicações relaciona-se com a indústria do papel, onde o objetivo principal é a remoção da lignina com a menor destruição possível de celulose e hemicelulose da polpa. Os processos em uso requerem muita energia e grande volume de produtos químicos, gerando efluentes tóxicos, ricos em ligninas cloradas, com sérios danos ambientais. A utilização dos fungos constitui uma solução para a produção de polpa; no entanto, o processo desenvolvido ainda é muito lento. Fungos também estão sendo avaliados para o branqueamento da polpa e para o tratamento de efluentes da indústria do papel, em substituição aos processos químicos empregados atualmente.

A partir dos anos 80, grande enfoque tem sido dado à utilização desses fungos na área medicinal e ambiental. Pesquisas com algumas espécies têm demonstrado bons resultados na redução do excesso de colesterol e no tratamento de algumas espécies de câncer, pelo aumento da resistência do organismo (JONG & DONOVICK, 1989; JONG & BIRMINGHAM, 1993).

P. chrysosporium Burds é uma espécie extensivamente estudada por sua capacidade de atuar na degradação de compostos orgânicos recalcitrantes, levando à completa mineralização. Isso ocorre devido a inespecificidade do sistema enzimático extracelular desse fungo. *P. chrysosporium*, que degrada três gramas de lignina por grama de biomassa por dia, é capaz de degradar diversas classes de xenobióticos, incluindo compostos organoclorados. Mais recentemente, outras espécies têm sido estudadas, como *Pleurotus* spp., *Trametes versicolor* (Fr.) Pilát, *Lentinula edodes*, *Phlebia radiata* Fr. e outras.

Basidiomicetos lignocelulolíticos também têm sido utilizados para a remoção de corantes utilizados na indústria têxtil. A Tabela 1 mostra uma relação de fungos que degradam corantes e reduzem a toxicidade do meio.

3. Biodegradação de produtos tóxicos recalcitrantes

Processos biológicos e geoquímicos produzem enormes quantidades de compostos orgânicos com uma grande diversidade de estruturas. Quase que 100%

TABELA 1. Espécies de basidiomicetos capazes de degradar corantes.

Fungos		Corantes
<i>Cyathus bulleri</i>	Poly-R478	
	Azure B	Poly-B
<i>Flavodon flavus</i>	Brilliant	Poly-R
	Congo Red	RBBR
	Crystal	
<i>Funalia trogii</i>	Crystal	
	Bromophenol Blue	Methylene Blue
<i>Irpex lacteus</i>	Congo Red Methyl Copper	3Orange
	Pthalocynine	RBBR
	Disperse	Reactive Black 5
	Methyl Red	Reactive Orange
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Crystal Violet	
<i>Phellinus gilvus</i>	Indigo Blue	
<i>Piptoporus betulinus</i>	Acid Green 27	Cibacron Brilliant Red
	Acid Red	Indigo
	Brilliant	Orange II
	Chlorazol	Neutral red
	Acid Black 194	Indigo
	Acid Blue 185	Neutral Red
	Acid Green 27	Orange II
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Acid Red	Orisol Blue
	Brilliant Green	Orisol Turquoise
	Chlorazol	RBBR
	Cibacron Brilliant Red	Reactive Blue 158
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Indigo Blue	Orange G
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Indigo Blue	
	Acid Blue 185	Orisol Turquoise
<i>Trametes hispida</i>	Acid Black 194	Reactive Blue 158
	Orisol Blue	
	Acid Black 194	Everzol Turquoise Blue G
	Acid Blue 185	Indigo Carmine
	Acid Green 27	Neutral red
	Acid Red	Orange II
<i>Trametes versicolor</i>	Azure B	Orisol Blue
	Brilliant	Orisol Turquoise
	Chlorazol Yellow	Phenol Red
	Cibacron Brilliant Red	Poly R478
	Crystal	Reactive Blue 158

desses compostos podem ser utilizados por algum microorganismo como fonte de energia ou na constituição de seu corpo. Na natureza, algumas plantas e organismos marinhos produzem organoclorados e existem fungos que produzem compostos halogenados a partir de compostos derivados da degradação da lignina. Portanto, a mineralização de compostos clorados pode ocorrer naturalmente. Entretanto, para milhares de compostos orgânicos produzidos artificialmente, por síntese química na

indústria, não se conhecem decompósitos naturais. Portanto, esses compostos sintéticos, chamados xenobióticos, geralmente são muito estáveis no ambiente. Eles estão presentes em fertilizantes, pesticidas e herbicidas; podem ser gerados durante a combustão de resíduos e são encontrados em efluentes industriais.

O fungo mais estudado em processos de biorremediação é o *P. chrysosporium*. A degradação de compostos recalcitrantes por este fungo é estimulada em meio de cultura deficiente em nitrogênio, imitando o que ocorre na natureza, porque a madeira também contém baixos teores de nitrogênio. Os mecanismos usados pelos fungos na degradação de compostos orgânicos foram revisados recentemente (RABINOVICH *et al.*, 2004).

Uma série de trabalhos reporta a degradação de DDT (Diclorodifeniltricloroeteno), PCB (Bifenilpoliclorados), dioxina, lindane, pentaclorofenol e antraceno pela aplicação de microorganismos, ao natural ou a partir de enzimas deles isoladas. O DDT é o pesticida mais freqüentemente encontrado no meio ambiente, pois foi utilizado em larga escala como inseticida em campanhas de saúde pública. Apresenta uma estrutura química estável, tem meia-vida de três anos e após dez anos, cerca de 5% a 10% do aplicado ainda permanece no solo. Um estudo do comportamento do DDT marcado com ^{14}C , sob condições de laboratório e campo, foi feito no Instituto Biológico de São Paulo (De ANDREA & FLORES-RUEGG, 1988), em solo argiloso rico em matéria orgânica. A meia-vida foi de aproximadamente um ano e verificou-se baixa mobilidade.

O estudo da biodegradação do DDT e de outros compostos por fungos recebeu, até 1980, pouca atenção, diferentemente da biodegradação por bactérias, que tem sido mais estudada. No entanto, alguns estudos mais recentes têm evidenciado que o sistema enzimático de fungos basidiomicetos é capaz de mineralizar ^{14}C -DDT e um grande número de outros poluentes ambientais persistentes (Tabela 2).

4. Biorremediação

A biorremediação, ou seja, o uso de microrganismos para controlar e destruir compostos orgânicos contaminantes, é atrrente como alternativa tecnológica pela possibilidade de obter-se a completa degradação do poluente, isto é, sua mineralização, ou sua transformação para produtos finais menos tóxicos ou inócuos. O seu custo é geralmente menor que outros processos de remediação ambiental.

Uma vez que os basidiomicetos são capazes de transformar e degradar compostos clorados aromáticos, a inoculação destes organismos para o tratamento de solos contaminados tem sido investigada. Os processos até o momento avaliados envolveram a mistura do solo para obter-se homogeneização do poluente e a inoculação do fungo nos primeiros 30 cm de profundidade. O solo é, geralmente, suplementado com uma fonte de carbono adequada ao crescimento e a umidade é ajustada e controlada durante o período de crescimento do fungo.

Resultados satisfatórios em laboratório possibilitaram o desenvolvimento de estudos pilotos, e esta tecnologia vem sendo avaliada em diversos países, como nos EUA e na Finlândia, onde estão sendo realizadas em áreas contaminadas com resíduos

TABELA 2. Relação de fungos basidiomicetos capazes de degradar diferentes xenobióticos.

Fungo basidiomiceto	Xenobiótico	Referência
<i>Bjerkandera adusta</i>	antraceno	Field <i>et al.</i> , (1992)
<i>Bjerkandera</i> sp.	pentaclorofenol	Boyle (1995)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	pentaclorofenol	Lamar & Dietrich (1992)
<i>Chrysosporium lignorum</i>	3,4-dicloro anilina, dieldrin, fenantreno	Morgan <i>et al.</i> , (1991)
<i>Inonotus dryophilus</i>	Pentaclorofenol	Alleman <i>et al.</i> , (1995)
<i>Lentinula edodes</i>	Pentaclorofenol	Okeke <i>et al.</i> , (1996)
<i>Phanerochaete sordida</i>	pentaclorofenol, creosoto, dibenzo-p-dioxina,dibenzofuranospoliclorados	Lamar <i>et al.</i> , (1994);Lamar & Evans (1993);Davis <i>et al.</i> , (1993);Takada <i>et al.</i> , (1996).
<i>Phellinus badius</i>	Pentaclorofenol	Alleman <i>et al.</i> ,(1992)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pireno, antraceno,fluoreno, dibenzotiofeno	Bezale <i>et al.</i> , (1996)
<i>Polyporus pinsitus</i>	Antraceno	Field <i>et al.</i> , (1992)
<i>Ramaria</i> sp.	Antraceno	Field <i>et al.</i> , (1992)
<i>Stereum hirsutum</i>	3,4-dicloro anilina,dieldrin, fenantreno	Morgan <i>et al.</i> , (1991)
<i>Trametes hirsuta</i>	Pentaclorofenol	Lamar & Evans (1993);
<i>Trametes versicolor</i>	pentaclorofenol3,4-dicloro anilina,dieldrin, fenantreno,antraceno, pireno	Boyle (1995);Morgan <i>et al.</i> , (1991);Field <i>et al.</i> , (1992);Alleman <i>et al.</i> , (1995)
<i>Filibolletus</i> spp.	3,4-dicloroanilina,	Kremer & Sterner (1996)
<i>Peniophora cinerea</i>	Pentaclorofenol	Machado <i>et al.</i> , (2005)
<i>Trametes villosa</i>	Pentaclorofenol	Machado <i>et al.</i> , (2005)
<i>Psilocybe castanella</i>	Pentaclorofenol	Machado <i>et al.</i> , (2005)
<i>Lentinus zeyheri</i>	Hexaclorobenzeno	Matheus <i>et al.</i> , (2000)
	Hexaclorobenzeno	Matheus <i>et al.</i> , (2000)

da indústria de preservação de madeiras (LAMAR & DIETRICH, 1990; LAMAR & EVANS, 1993; OKEKE *et al.*, 1993). No Brasil, vários grupos de pesquisa estão interessados na aplicação destes fungos na solução de problemas de contaminação ambiental, com destaque para efluentes da indústria do papel e têxteis e solo contaminado com organoclorados (DURAN & ESPOSITO, 2000; MATHEUS & MACHADO, 2002).

Pode-se, brevemente, enumerar algumas das vantagens potenciais de se utilizar os basidiomicetos ligninolíticos em sistema de remediação de solos contaminados com compostos orgânicos (MATHEUS & MACHADO, 2002):

- 1) O sistema responsável pela degradação dos poluentes é extracelular e, desta forma, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos, pouco acessíveis à ação bacteriana;

- 2) A inespecificidade deste sistema permite a sua utilização para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para misturas deles;
- 3) O sistema não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença do composto poluente;
- 4) Esse grupo de fungos possui vantagens competitivas quando materiais lignocelulolíticos são utilizados como fontes de carbono;
- 5) A degradação dos xenobióticos pode ocorrer até que a sua concentração seja reduzida a níveis não detectáveis, com mineralização até CO₂.

5. Basidiomicetos brasileiros na degradação de compostos organoclorados em solo

5.1 O Problema

Na Região da Baixada Santista, os fungos basidiomicetos estão sendo avaliados para a biorremediação de solos contaminados com resíduos industriais organoclorados. O histórico desta contaminação remonta às décadas de 1960 e 1970, sendo proveniente de despejos irregulares (Figura 3). Parte do material contaminado foi incinerado. No

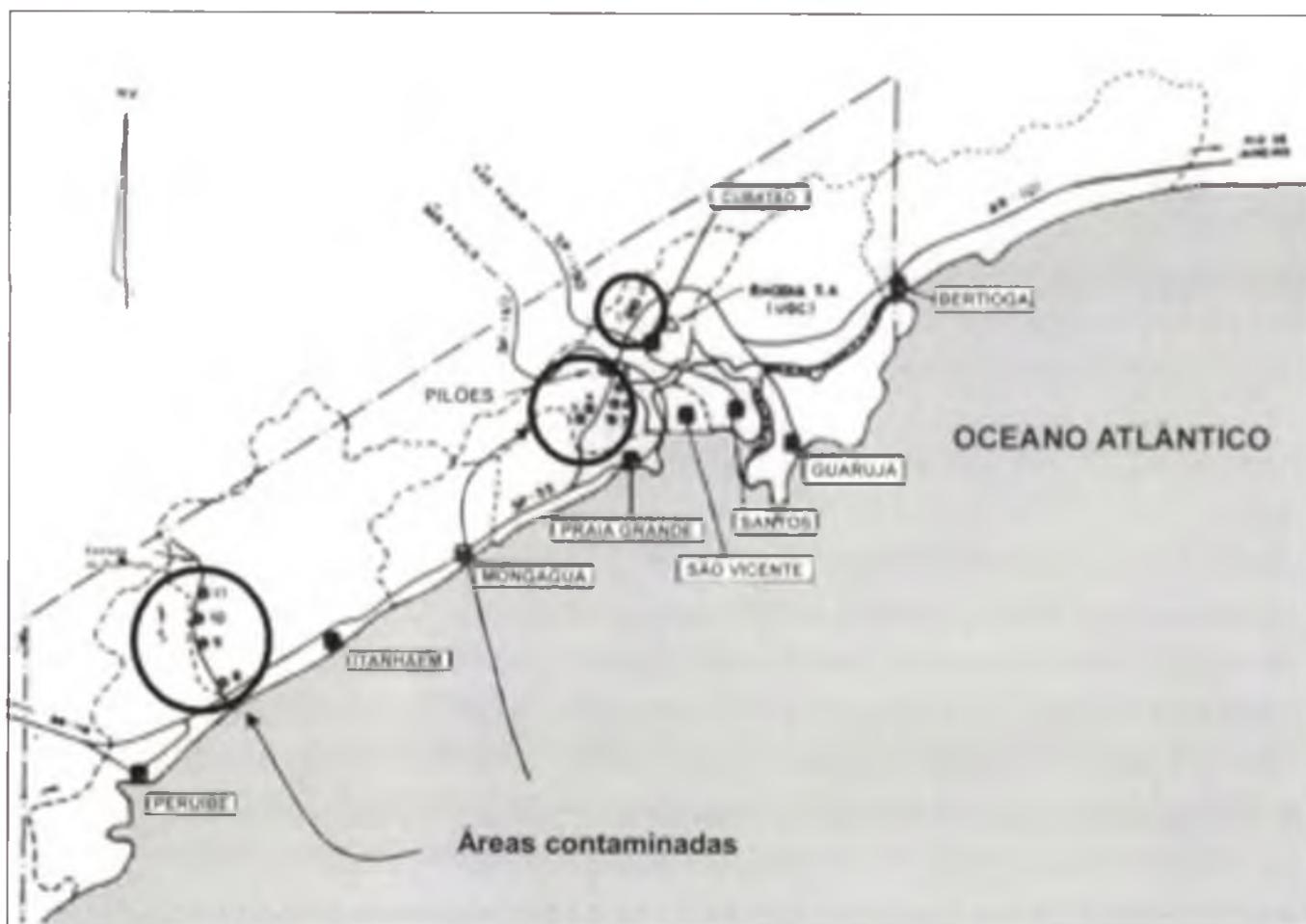


FIGURA 3. Localização dos *sites* com solo contaminado com resíduos industriais, na Baixada Santista, SP.

entanto, a queima em incineradores à altas temperaturas (900-1.200°C) requer muita energia, é caro e tem trazido preocupações à sociedade sobre sua segurança. Teme-se a produção de dioxinas, como resultado da combustão de organoclorados e que o manuseio seja uma ameaça aos operários que trabalham no sistema de tratamento.

Problemas operacionais no processo de incineração levaram à interrupção (interdição judicial) das atividades do incinerador. Desta forma, permaneceram cerca de 33 mil toneladas de solo contaminado que foram escavados, transportados e se encontram armazenados em um local denominado “Estação de Espera”, situado no km 67 da Rodovia Padre Manuel da Nóbrega, São Vicente.

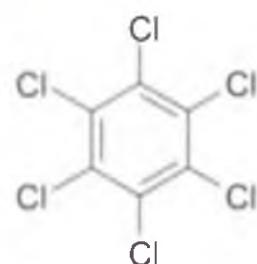
Em 1994, teve início o projeto de pesquisa “Biotecnologia de fungos (basidiomicetos lignocelulolíticos) nativos do Brasil para fins de descontaminação ou redução de poluição ambiental”, com o objetivo de avaliar a capacidade de basidiomicetos nativos de degradar os organoclorados presentes como contaminantes nos solos. Esse projeto encontra-se ainda em desenvolvimento, com o Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, na sua coordenação técnica. Outras instituições colaboradoras foram o Centro de Energia para a Agricultura da Universidade de São Paulo, a Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, a Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho e o Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. O suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto tem sido dado pela Rhodia, além de bolsas concedidas pelo CNPq e CAPES.

5.2 Caracterização do solo

O solo contaminado com organoclorados, principalmente HCB e PCF, foi coletado de mag-sacks com capacidade de uma tonelada que se encontram armazenados em área controlada pela empresa Rhodia, às margens da Rodovia Pe. Manoel da Nóbrega, São Vicente, SP. As características químicas e físico-químicas do solo foram analisadas pelo Laboratório Lagro, Campinas, SP, e estão apresentadas na Tabela 3. As concentrações dos compostos organoclorados contaminantes do solo foram determinadas por cromatografia gasosa (ANDREA *et al.*, 2001), nos laboratórios do CPP/Rhodia, e estão discriminadas na Tabela 4.

5.3 Caracterização dos principais organoclorados presentes no solo

Hexaclorobenzeno (HCB)
Fórmula molecular: C_6Cl_6
Peso molecular: 284,76



O HCB é um composto sintético orgânico, fabricado pela primeira vez em 1933, não ocorrendo naturalmente no meio ambiente. É muito estável, não reativo e solúvel em água. Foi utilizado como fungicida para o tratamento de sementes,

TABELA 3. Características físico-químicas do solo.

Parâmetros analisados	Valores
pH	5,07
Capacidade de troca catiônica (mEq. 100 mL ⁻¹)	5,50
Saturação de bases (V%)	5,60
Matéria orgânica (%)	0,13
Acidez total [H ⁺] (mEq. 100 mL ⁻¹)	5,07
Alumínio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,13
Cálcio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,20
Magnésio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,10
Nitrogênio total (%)	0,06
Fósforo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,00
Potássio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,01
Enxofre ($\mu\text{g g}^{-1}$)	13,47
Sódio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3,67
Ferro ($\mu\text{g g}^{-1}$)	25,53
Manganês ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,10
Cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,10
Zinco ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,37
Boro ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,10

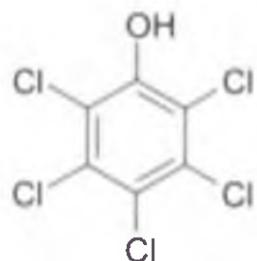
TABELA 4. Presença de algumas enzimas em linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos.

Enzimas	Nº Linhagens positivas	Nº linhagens negativas	% Presença	Corante	Coloração
Fosfatase	36	142	24	a-naftol fosfato 1%+ Fast Read ITR base	púrpura
Citocromo-oxidase	155	23	83	Tetrametil-fenilodiamina (hidrogênio)clorado + ácidoascórbico	azul
Peroxidase	163	15	89	H ₂ O ₂ + pirogalol	amarelo-marrom
Tirosinase	56	122	26	p-cresol+ etano	laranja-marrom
Lacase	163	15	91	a-naftol	Púrpura

Fonte: Okino *et al.* (1995).

preservativo de madeiras, composições pirotécnicas, na fabricação de corantes, polivinil clorado e borracha sintética. Pode também ocorrer como resíduo na fabricação de tetracloreto de carbono e percloroetileno. Seu uso foi proibido inicialmente nos Estados Unidos (1978) e, a seguir, na Comunidade Européia e no Brasil, mas continua sendo produzido como subproduto da fabricação de compostos clorados. Resíduos já foram detectados em populações humanas. O risco adicional de câncer, segundo parâmetros da EPA/USA, é de 1:100.000 na dosagem de 7,2 mg/L.

Pentaclorofenol (PCF)
 Fórmula molecular: $C_6H_5OCl_5$
 Peso molecular: 266,36



O PCP é um composto orgânico estável, pouco solúvel em água e altamente solúvel em solventes orgânicos. É fortemente adsorvido em sólidos orgânicos, como celulose, e pode causar rápida deterioração da borracha, quando dissolvido em óleo. Foi utilizado como anti-séptico para não metais, herbicida, dessecante, fungicida, bactericida, inseticida, preservativo de madeira e componente de tintas, vernizes, papéis, carros e cordas. Hoje seu uso e produção são proibidos em vários países e no Brasil. O limite em água para vida humana é de 1,010 mg/L e para proteção da vida aquática de 55,0 mg/L (parâmetros da EPA/USA).

5.4 Coleta, isolamento e identificação de basidiomicetos

Considerando-se que o número estimado de basidiomicetos ligninolíticos seja de cerca de mais de 200.000 espécies, e que, grande diversidade desses organismos em degradar a lignina corresponda semelhante diversidade na capacidade de degradar xenobióticos, e ainda, que, no Brasil, a introdução de microrganismos provenientes de outros países no ambiente ou em sistemas de tratamento abertos, é uma prática indesejável e, em muitos casos, ilegal, torna-se de grande importância conhecer a capacidade de basidiomicetos nativos de degradar compostos orgânicos tóxicos e recalcitrantes, como subsídio para a utilização desses organismos em sistemas de biorremediação.

Foram feitas coletas em todo o Brasil, incluindo diferentes ecossistemas preservados e áreas notadamente poluídas para contar a diversidade e espécies resistentes a diferentes tipos de poluentes. Todos os fungos coletados foram isolados em meio de cultura. As técnicas de coleta e isolamento (Figura 4) foram descritas

por Fidalgo & Bononi (1984). As linhagens obtidas em culturas puras foram previamente identificadas com auxílio de chaves e por comparação com material do herbário. Espécies de identificação duvidosa foram enviadas a especialistas no exterior para confirmação. Foi ainda anotada a característica da podridão do substrato a olho nu e com auxílio de lupa. Espécimes (basidiocarpos) após identificação foram secos e introduzidos no herbário do Instituto de Botânica (SP) como documentação.

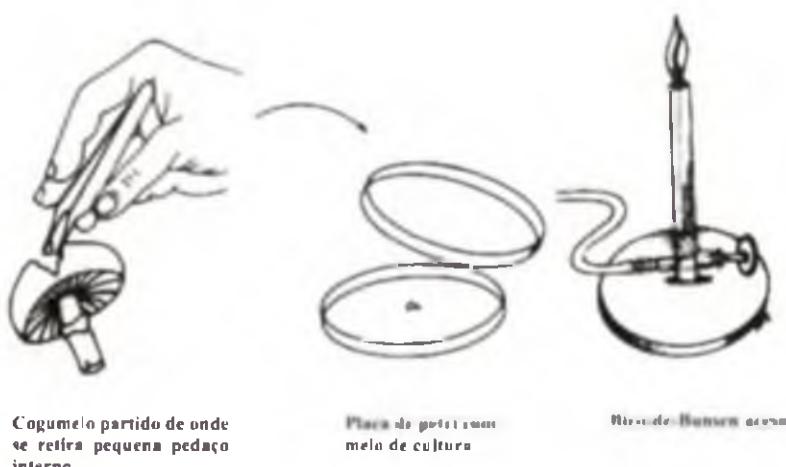


FIGURA 4. Desenho esquemático do isolamento de basidiomicetos em meio de cultura. Fonte: Bononi *et al.* (1995).

De 2.000 espécimes coletados, foram isoladas e cresceram em meio de cultura cerca de 300 linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos que foram identificados e depositados na Coleção de Culturas de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica do estado de São Paulo.

5.5 Seleção de basidiomicetos para a degradação de poluentes

A seleção dos basidiomicetos foi realizada considerando-se a atividade ligninolítica, a taxa de extensão micelial, a tolerância aos compostos organoclorados presentes no solo e a capacidade de degradar os organoclorados PCF e HCB durante crescimento dos fungos em solo (MATHÉUS *et al.*, 1998).

A atividade ligninolítica foi avaliada pela capacidade de descolorir o corante azul brilhante Remazol R (RBBR) durante crescimento dos fungos em meio sólido (MEA, 2%) acrescido de 0,02% de RBBR. De um total de 125 fungos avaliados, 106 formaram halo de descoloração, durante o período de incubação de 14 dias (OKINO *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2005). Pela facilidade desse método, o potencial de degradação tem sido avaliado em meio sólido ou líquido.

O RBBR é usado, freqüentemente, como matéria-prima na produção de corantes poliméricos. Sendo um derivado do antraceno, representa uma importante classe de organopoluentes, tóxicos e persistentes no meio ambiente. Sua semelhança estrutural com certos compostos aromáticos policíclicos pode ser visualizada pela Figura 5.

O teste de Taylor (1975) foi também utilizado para detectar a presença das enzimas lacase, tirosinase, citocromo-oxidase, peroxidases e fosfatases produzidas por 84 destes basidiomicetos em meio de cultura sólido (OKINO *et al.*, 1995). Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

A taxa de extensão micelial foi determinada pela medida do crescimento radial de cada fungo em meio de cultura sólido (MEA). Este estudo foi realizado para identificar os fungos com elevadas taxas de crescimento, característica desejável em microrganismos que poderão ser utilizados em processos de biorremediação uma vez que, o crescimento rápido diminui os riscos de contaminação (LAMAR *et al.*, 1990a). A taxa média de crescimento variou de 1,22 a 5,28 cm.dia⁻¹ evidenciando-se grandes diferenças específicas. Grande parte dos fungos (54,6%) mostrou uma taxa de

crescimento compreendida na faixa de 0,5 a 1,5 cm.dia⁻¹. Destacaram-se *Antrodiella americana* CCB206 e *P. sanguineus* CCB277, com taxas de crescimento de 5,28 e 2,53 cm.dia⁻¹, respectivamente (Machado *et al.*, 2005a). Como resultado da primeira parte do processo de seleção foram identificados noventa e seis fungos nativos do Brasil com capacidade de descolorir o corante RBBR e com crescimento micelial superiores a uma cepa de *Phanerochaete chrysosporium* usada como referência.

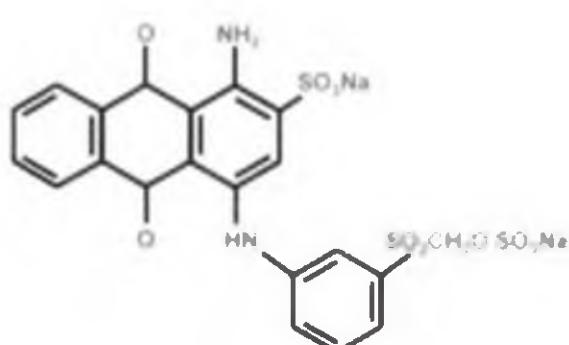


FIGURA 5. Estrutura da molécula do corante azul brilhante de Remazol R (RBBR). Fonte: Machado (1998).

Os resultados de tolerância dos basidiomicetos aos solos contaminados com PCF e HCB foram determinados em função da porcentagem de colonização de colunas de solos contaminados, em tubos de ensaio. As concentrações de PCF utilizadas no teste variaram de 2.700 a 43.300 ppm e de HCB de 3.060 a 51.166 ppm. O maior valor corresponde a concentração real encontrada no solo. Dentre as 36 espécies de basidiomicetos avaliadas nesta etapa, *Agrocybe perfecta*, *Trametes villosa*, *Trichapitum bisogenum*, *Lentinus villosus* e *Psilocybe castanella* apresentaram tolerância ao PCF numa concentração de 4.600 ppm, porém com crescimento menos vigoroso que o observado no solo controle. As demais espécies foram muito sensíveis e não cresceram na presença de PCF (Machado *et al.*, 2005a). *T. villosa*, *P. castanella* e *L. villosus* foram tolerantes a concentrações de até 51.166 ppm de hexaclorobenzeno, apresentando crescimento vigoroso na coluna de solo (MATHEUS *et al.*, 2000).

A capacidade de biodegradação *in vitro* de hexaclorobenzeno e de pentaclorofenol foi avaliada com basidiomicetos lignocelulolíticos selecionados nas etapas anteriores, ou seja, com fungos capazes de descolorir o RBBR, com taxa de extensão micelial acima de 1 cm por dia e tolerância a concentrações relativamente altas de organoclorados. A biodegradação foi avaliada durante crescimento dos fungos em solo, utilizando-se duas técnicas diferentes:

- a) Por análise cromatográfica de alta eficiência com captura de elétrons de amostras do solo aos 15, 30 e 60 dias de incubação com basidiomicetos lignocelulolíticos selecionados, a 25°.
- b) Utilizando hexaclorobenzeno e pentaclorofenol com todos os carbonos marcados com ^{14}C e medindo o CO₂ produzido e a radioatividade residual no substrato a 30, 60 e 90 dias. Essa técnica é preconizada pelo Ibama (1990) e permite determinar as quantidades do produto volatilizadas, as que ficam fortemente aderidas no solo ou ainda nos diferentes solventes utilizados para a extração.

Os resultados foram positivos para a degradação de PCF e HCB (MATHEUS *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2005a). Cinco espécies de basidiomicetos foram capazes de degradar, em diferentes graus, o PCF, sendo *Peniophora cinerea* CBB204, *Psilocybe castanella* CCB444 e *T. villosa* CCB178 as espécies que apresentaram as maiores taxas de degradação (78, 64 e 58% respectivamente) e de mineralização (7,11%, 8,15% e 4,95%, respectivamente). *P. castanella* CCB444 e *Lentinus crinitus* CCB274 removeram, respectivamente, 25 e 18% de HCB do solo com taxas de mineralização inferiores a 1%, num período de 120 dias de tratamento.

Como resultado do processo de seleção, de um total de 125 espécimes de fungos basidiomicetos, foram identificados 15 basidiomicetos que por suas características poderiam ser aplicados em processos de biorremediação de compostos organoclorados (MATHEUS *et al.*, 1998).

A fim de se otimizar a biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos, a temperatura e substratos orgânicos adequados para o crescimento de *Psilocybe castanella* CCB444 e *L. crinitus* CCB274, bem como a influência da

relação C/N do substrato e da adição de óleos vegetais na biodegradação de HCB em solos foram avaliados (MATHEUS, 2003). Os fungos cresceram em diferentes relações C/N e foram inoculados no solo contaminado com 30.000 mg de HCB e tratado com 50 kBq de HCB-UL-¹⁴C kg⁻¹ de solo e com 0,0; 2,5 ou 5,0% de óleo vegetal e Tween 20. *P. castanella* mineralizou até 12,8% de ¹⁴C-HCB quando C/N do inóculo foi de 80, com 5,0% de óleo vegetal adicionado ao solo. *L. crinitus* mineralizou até 9,7% de ¹⁴C-HCB na relação C/N 202, com 2,5% de óleo vegetal e até 25,0% na mesma relação C/N com 8,0% de óleo. Não ocorreu produção de compostos ¹⁴C-voláteis. Foi observada geração de compostos ¹⁴C-não extraíveis. *P. castanella* foi capaz de remover 52,3% de ¹⁴C-HCB na forma de ¹⁴CO₂ e resíduos ¹⁴C-não extraíveis, enquanto que *L. crinitus* removeu 77,5%.

5.6 Enzimas relacionadas a biodegradação da lignina e de compostos organoclorados

Ainda não está completamente esclarecida a atuação das enzimas ligninolíticas no processo de degradação de compostos recalcitrantes, como a lignina e demais poluentes. Acredita-se que o sistema envolvido na degradação conta com a participação de peroxidases, oxidases produtoras de H₂O₂ e compostos metabólicos de baixa massa molecular (DURAN & ESPÓSITO, 2000).

Com o objetivo de conhecer o sistema enzimático ligninolítico dos basidiomicetos selecionados, 36 deles foram crescidos em meio sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar (BGS) e seus extratos foram avaliados quanto a descoloração do RBBR e à produção de atividade de peroxidases (MACHADO *et al.*, 2005b). Todos os fungos mostraram atividade de peroxidases, mas 5 foram incapazes de descolorir o RBBR. Diferentes padrões de enzimas ligninolíticas foram detectados em 12 desses extratos fúngicos, porém todos mostraram atividade de lacase (Tabela 5). Altos níveis de atividades de peroxidases e de lacases não mostraram relação com descoloração do RBBR.

5.7 Consorciação de outros grupos de fungos com basidiomicetos para otimizar a biorremediação

A utilização de deuteromicetos, isolados de áreas contaminadas por organoclorados, para otimizar o processo de biorremediação com basidiomicetos que apresentaram resultados satisfatórios de mineralização dos organoclorados PCF e HCB foi avaliada. Espécies de deuteromicetos isolados de solo contaminado por organoclorados foram utilizados isoladamente, concomitantemente (em cultura mista com basidiomicetos) e em sucessão com basidiomicetos selecionados (VITALI, 2004). Os resultados mostraram que *Paecilomyces* sp. e *Eupemicillium* spp. em cultura mista com *Psilocybe castanella* promoveram acréscimo na degradação de HCB, com a não formação de voláteis.

TABELA 5. Atividade de Manganês peroxidase e lacase durante a descoloração do corante azul brilhante de remazol R (RBBR) por basidiomicetos.

Fungos	Local da Coleta	Descoloração do RBBR	Atividade Enzimática (U.L ⁻¹)	
			MnP	Lacase
<i>Lentimus crinitus</i> CCB356	Ubatuba, SP	++	0,00* ± 0,00	5,8 ± 0,87
<i>L. velutinus</i> CCB268 ^a	São Vicente, SP	+	0,00* ± 0,00	23,8 ± 0,30
<i>L. crinitus</i> CCB274 ^a	São Vicente, SP	+	0,00* ± 0,00	4,3 ± 1,58
<i>Melanoporia nigra</i> CCB184 #	Maceió, AL	+	3,77 ± 2,39	1,6 ± 0,10
<i>Peniophora cinerea</i> CCB204	São Vicente, SP	++	17,57 ± 9,51	6,5 ± 0,80
<i>Psilocybe castanella</i> CCB444 ^a	São Vicente, SP	+	6,39 ± 10,81	2,0 ± 0,21
<i>Trametes vesicolor</i> CCB202	São Paulo, SP	+	25,15 ± 12,66	10,7 ± 0,10
<i>T. villosa</i> CCB165	Campinas, SP	+	1,20 ± 0,00	12,5 ± 3,48
<i>T. villosa</i> CCB213	São Paulo, SP	+	4,31 ± 2,04	2,3 ± 0,68
<i>T. villosa</i> CCB176	Assis, SP	++	6,64 ± 0,96	3,1 ± 0,17
<i>Trichaptum byssogenum</i> CCB203 ^a	São Vicente, SP	++	10,13 ± 7,45	4,4 ± 1,28
<i>Trogia buccinalis</i> CCB390	São Paulo, SP	+++++	0,00* ± 0,00	4,1 ± 1,35

^aFungos coletados em áreas contaminadas por organoclorados; # fungos de podridão parda da madeira. Unidades Enzimáticas = µmol de substrato oxidado por litro. +++++ = 100 % de descoloração (em relação a maior descoloração de 6,39 observada para *T. buccinales*). ++++ = 75 a 99% de descoloração. +++ = 50 a 74 % de descoloração. ++ = 25 a 49% de descoloração. + = até 24 % de descoloração. Todos os valores são médias ± desvio-padrão de 3 replicatas de culturas

5.8 Fisiologia dos basidiomicetos selecionados para degradação de poluentes

O grande potencial dos basidiomicetos como agentes de biorremediação suporta-se em consistentes ensaios laboratoriais. No entanto, a sua aplicação comercial é feita ainda de forma bastante empírica, faltando muitos dados para a compreensão da fisiologia destes organismos. A expressão do sistema enzimático envolvido na degradação de poluentes tem se mostrado bastante dependente das condições de cultivo e da composição do meio de cultura. Além disso, a composição deste sistema varia muito entre as diferentes espécies de fungos, dificultando generalizações. O estabelecimento das melhores condições nutricionais para a produção e expressão do sistema enzimático é imprescindível para auxiliar na aplicação biotecnológica destes organismos.

Estudos estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa com o objetivo de compreender a influência de parâmetros de cultivo no crescimento, na degradação do corante azul Brilhante Remazol R e na produção de enzimas ligninolíticas pelos basidiomicetos selecionados. Até o momento, os seguintes parâmetros foram avaliados: pH, fonte de carbono e de nitrogênio, metais (cobre e manganês) e adição de ácidos graxos insaturados (MOREIRA *et al.*, 2006; MACHADO, 2005).

5.9 Estudo piloto de biodegradação de organoclorados em biorreatores

A aplicação de basidiomicetos lignocelulolíticos para biorremediação de solos contaminados por organoclorados, principalmente HCB e PCF em biorreatores com 400 kg de solo está em andamento. Estão sendo utilizadas três linhagens de basidiomicetos lignocelulolíticos nativos, selecionados nas fases precedentes, em função de capacidade de crescimento, de produção de enzimas lignocelulolíticas, tolerância aos organoclorados e capacidade de biodegradação *in vitro* de PCF e HCB.

A definição do *design* dos biorreatores e o estabelecimento dos fungos *P. castanella* CCB444 e *L. crinitus* CCB274 nos biorreatores foram realizados com solo não contaminado, em área de propriedade da Rhodia, na Baixada Santista (MATHEUS *et al.*, 2003). As condições de cultivo foram aquelas que promoveram o crescimento dos fungos e a degradação do HCB em laboratório. Os seguintes parâmetros foram estudados: temperatura, pH, carbono orgânico total e umidade do solo. O crescimento dos basidiomicetos foi avaliado por análise esteroscópica, biomassa (conteúdo de ergosterol) e atividade ligninolítica (oxidação do ABTS). A recuperação do basidiomiceto foi feita em meio de cultura sólido contendo RBBR (0.02%). A microbiota autóctone foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) usando agar nutritivo e meio de Martin.

Para aplicação de basidiomicetos em biorremediação de solo é necessária a produção de inóculo, que geralmente consiste no crescimento do fungo em substrato sólido.

O preparo do inóculo dos basidiomicetos nativos tem sido realizado utilizando tecnologia usualmente empregada no cultivo de cogumelos comestíveis, em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja. O solo a ser testado, devidamente caracterizado, é submetido a processo de fumigação e de homogeneização.

Encontra-se em andamento os testes de biorremediação de solos contaminados por HCB. O monitoramento do experimento prevê: acompanhamento do crescimento dos fungos e análises de HCB e de outros organoclorados aos 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias após a inoculação dos basidiomicetos nos biorreatores (Figura 6). As principais dificuldades a serem superadas para o uso de basidiomicetos em biorremediação de solos são: *design* dos biorreatores para o desenvolvimento dos basidiomicetos, necessidade de controlar a microbiota autóctone e a produção de inóculo em larga escala.



FIGURA 6. Biorreatores com capacidade para 400 kg de solo, instalados em propriedade da Rhodia do Brasil SA, São Vicente, SP. Foto: Ricardo Ribeiro da Silva (2003)

5.10 Degradação de bifenilas policloradas *in vitro*

Testes preliminares mostraram a capacidade de basidiomicetos nativos do Brasil, selecionados por degradarem organoclorados, de também degradarem Bifenilas policloradas – PCBs, produto que teve ampla utilização em transformadores da rede elétrica e que são muito persistentes no ambiente (PICCA, 2004). Novos estudos neste campo são necessários.

Referências

- ADLER, E. Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Science and Technology*, v.11, p.169-218, 1977.
- ANDREA, M.M.; PAPINI, L.S.; NAKAGAWA, L.E. Optimizing microwave-assisted solvent extraction of pesticides from soil. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 36, n.1, p.87-93, 2001.
- AUST, S.D. Degradation of environmental pollutant by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology*, v.20, n.2, p.197-210, 1990.
- BONONI-PENTEADO, V.L.R. **Basidiomicetos hidnóides da Micota Brasileira**. 1976. 314p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: I. Espécies hidnóides. *Rickia*, v.8, p.85-90, 1979a.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: II. Hymenochaetaceae. *Rickia*, v.8, p.63-74, 1979b.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: III. Espécies clavarióides, teleforóides e estereóides. *Rickia*, v.8, p.105-121, 1979c.
- BONONI, V.L.R. Basidiomicetos da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, SP. *Rickia*, v.11, p.1-25, 1984.
- BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B.; GRANDI, R.A.P. Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, depositados no Herbário do Instituto de Botânica. *Rickia*, v.9, p.37-53, 1981.
- BONONI, V.L.R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S.F.B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995. 205p.
- BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. In: ARORA, D.K.; ELANDER, R.P.; MUKERJI, K.D. **Handbook of applied mycology**. New York: Marcel Dekker, 1992. v.4.
- BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood rotting fungus. In: EXNER, J.H. (Ed.). **Solving hazardous waste problems: learning from dioxins**. Washington: American Chemical Society, 1987a, p.340-349, (ACS Symposium Series, 338).
- BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of DDT (1,1,1-Trichloro-2,2-Bis (4-Chlorophenyl Ethane) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.2001-2008, 1987b.
- CAPELARI, M. **Agaricales do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (exceto Tricholomataceae)**. 1989. 356p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- CAPELARI, M. **Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies de Basidiomicetos: Pleurotus spp e Agrocybe perfecta (Rick) Sing**. 1996. 154p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- CAPELARI, M.; MAZIERO, R. Fungos macroscópicos de Rondônia, região dos rios Jarú e Ji-Paraná. *Hoehnea*, v.15, p.28-36, 1998.
- CAVALCANTI, M.A.Q. **Introdução ao conhecimento de basidiomicetos poliporóides da Zona da Mata de Pernambuco**. 1996. 200p. Tese (Livre-Docência) - Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1997, p.269-292. (Documentos, 11).
- FIDALGO, O. **Revisão do gênero Heteroporus Laz. emend Donk.** 1963. 116p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba.

- FIDALGO, M.E.P.K. Contribution to the fungi of Mato Grosso, Brazil. *Rickia*, v.3, p.171-219, 1968.
- FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. (Coord.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1984. (Manual n.4).
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K. Revisão de fungos São Paulensis. *Arquivos do Museu Nacional*, v.43, p.157-188, 1957.
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K. A new genus based on *Fistulina brasiliensis*. *Mycology*, v.4, n.4, p.342-352, 1962.
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K.; FURTADO, J.S. Fungi of the "cerrado" region of São Paulo. *Rickia*, v.2, p.55-71, 1965.
- FIELD, J.A.; DE JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; DE BONT, J.A.M. Screening ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH*, v.11, p.44-49, 1993.
- FIELD, J.A.; HEESSELS, E.; WIJNGAARDE, K.; KOTTERMAN, M.; JONG, E.; BONT, J.A.M. The physiology of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera sp.*, strain 80555. In: HINCHEE, R.E.; ANDERSON, D.B.; METTING JR., F.B.; SAYLES, G.D. **Applied biotechnology for site remediation**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p.43-151.
- FONSECA, M.P. **Aphyllophorales da Reserva Florestal Armando de Salles Oliveira, São Paulo**. 1994. 171p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- FURTADO, J.S. Some tropical species of *Ganoderma* (Polyporaceae) with pale cortex. *Persoonia*, v.4, n.4, p.379-389, 1967.
- FURTADO, J.S. Taxonomy of Amanoderma (Basidiomycetes, Polyraceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, v.34, p.1-109, 1981.
- GUERRERO, R.T.; HOMRICH, M.H. **Fungos macroscópicos comuns do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade, UFRGS, 1993. 118p.
- GUGLIOTTA, A.M. **Polyporaceae do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil**. 1994. 249p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da USP, São Paulo.
- HARTLEY, R.D.; FORD, C.W. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. In: LEWIS, N.G.; PAICE, M.G. (Ed.). **Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers**. Washington: American Chemical Society, 1985. p.137-145. (ACS Symposium Series, 399).
- HJORTSTAM, K.; BONONI, V.L.R. Fungos corticóides do Brasil (Aphyllophorales) *Rickia*, v.13, p.113-125, 1986.
- JONG, S.C.; DONOVICK, R. Antitumor and antiviral substances from fungi. *Advances in Applied Microbiology*, v.34, p.183-262, 1989.
- JONG, S.C.; BIRGMINGHAM, J.M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Advances in Applied Microbiology*, v.39, p.153-184, 1993.
- KIRK, T.K. Lignin degradation: basic research progress and applications in soil remediation and biopulping. In: KENNEDY, J.F.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. (Ed.). **Cellulosics: pulp, fibre and environmental aspects**. New York: Ellis Horwood, cap.63, 1993, p.421-430.
- KIRSOP, B.; SNELL, J.J.S. **Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods**. London: Academic Press, 1984. 184p.
- LAMAR, R.T.; DIETRICH, D.M. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n.10, p.3093-3100, 1990.
- LEITE, C.L. **Poliporos (Basidiomycotina) xilófilos de la Ilha de Santa Catarina: Brasil**. 1990. 328p. Tese (Doutorado) - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- MACHADO, K.M.G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados por resíduos industriais**. 1998. 144p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- MACHADO, K.M.G. Enzimas ligninolíticas em processos de biorremediação. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOLOGIA, 5, 2005, Brasília, DF.
- MACHADO, K.M.G.; BONONI, V.L.R.B. Identificação de enzimas ligninolíticas extracelulares de basidiomicetos nativos na descoloração do corante polimérico RBBR. In: REUNIÃO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO MEIO AMBIENTE, 1996, Santos.
- MACHADO, K.M.G.; SILVA, W.R.F.; BONONI, V.L.R. Screening of ligninolytic fungi for soil remediation II: production of peroxidases and phenoloxidases. In: LATIN AMERICAN BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION SYMPOSIUM, 2. **Abstracts Book**, 1995, p.35.
- MACHADO, K.G.M.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Pentachlorophenol degradation by White-rot fungus *Psilocybe castanella* CCB 444. In: LATIN AMERICAN BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION SYMPOSIUM, 1998, Florianópolis.

- MACHADO, K.G.M.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes en soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.**, v.21, p.297-310, 2005a.
- MACHADO, K.G.M.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian Basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.246-252, 2005b.
- MATHEUS, D.R. **Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biorremediação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros**. 1998. 161p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.M.G. Biorremediação: potencial de aplicação para os POPs. In: FERNÍCULA, N.A.G.G. (Org). **Produtos Orgânicos Persistentes: POPs**. Salvador: CRA, cap.13, 2002, p.479-500
- MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.G.M.; BONONI, V.L.R. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p.415-421, 2000.
- MATHEUS, D.R.; VITALI, V.M.; BONONI, V.L.R. Degradação de hexaclorobenzeno por *Psilocybe castanella* e *Paecilomyces* sp. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2002, 8, Rio de Janeiro.
- MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.M.G.; SILVA, R.R.; RODRIGUES, T.A.; BONONI, V.L.R. Basidiomycetes growth in bioreactors to apply in HCB soil bioremediation. In: MAGAR, V.; KELLEY, M. (Ed.). **Fungal technologies**. Columbus: Battelle Press, v.G5, 2003, p.1-8.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; ADAMI, A.; BONONI, V.L.R. Exopolysaccharide and biomass production in submerged culture by edible mushrooms. **Mushroom Science**, v.14, n.2, p.887-892, 1996.
- MOREIRA, S.L.; MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.M.G. Influence of pH on the growth and production of the ligninolytic system of tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 2006. In Press.
- OKINO, L.K.; LUCON, C.M.M.; BONONI, V.L.R. Seleção de basidiomicetos nativos para atividade ligninolítica *in vitro*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46., 1995, Ribeirão Preto. **Resumos**. Ribeirão Preto, 1995, p.53-54.
- OKINO, L.K.; MACHADO, K.M.G.; BONONI, V.L. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p.889-893, 2001.
- PICCA, L.C. **Degradção de PCBs por basidiomicetos brasileiros: testes preliminares**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASIL'CHENKO, L.G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, p.1-17, 2004.
- RICK, J. Basidiomycetes Eubasidii in Rio Grande do Sul. Brasília. Index (Rambo, B. ed.) **Iheringia**. Série Botânica, v.11, p.1-32, 1963.
- SAKAKIBARA, A. Chemical structure of lignin related mainly to degradation products. In: IGUCHI, T.; CHANG, H.M.; KIRK, T.K. (Ed.). **Recent Advances in Lignin Biodegradation Research**. 1983, p.12-33 (UNI).
- SHEWALE, J.G.; SADANA, J.C. Enzymatic hydrolysis materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar productions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.25, p.773-783, 1979.
- SILVA, J.V.B. **Contribuição ao conhecimento dos fungos poliporáceos na arborização de João Pessoa, PB, Brasil**. 1987, 106p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SILVEIRA, R.M.B. **Aphyllophorales polipróides (Basidiomycetes) do Parque Nacional de Aparados da Serra, RS**. 1990, 204p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SOUZA, M.A. **Contribuição ao estudo do gênero *Phellinus* Quelet (hymenochaetaceae) da Reserva Florestal do Parque Estadual Turvo Tenente Portela, RS**. 1977, 167p. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SOUZA, M.A. **O gênero *Phellinus* Quelet (Hymenochaetaceae) na Amazônia Brasileira**. 1980, 199p. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.
- SUSSIN, V.L.M. **Biologia de Aphyllophorales xilófilos (basidiomycetes)**. 1987, 167p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- TAYLOR, J.B. Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. **Annals of Applied Biology**, v.78, p.113-123, 1974.
- TEIXEIRA, A.R. **Himenomicetos brasileiros: Hymeniales Thelephoraceae**. Campinas: Instituto Agronômico, p.397-434. Boletim Técnico. Divisão de Experimentação e Pesquisas, n.7, 1945.

- TEIXEIRA, A.R. Himenomicetos brasileiros: Polyporaceae 2. **Bragantia**, v.10, p.13-120, 1950.
- THEISSEN, F. Polyporaceae austro-brasiliensis imprimis Rio Grandensis. **Denkschriften der Akademie de Wissenschaften**, v.83, p.31-71, 1911.
- TORREND, C. As poliporáceas da Bahia e estados limítrofes. In: REUNIÃO SUL-AMERICANA DE BOTÂNICA, 1., Rio de Janeiro. **Anais**, v.2, 1938, p.325-341.
- VIEGAS, A.P. A pedra flexível descrita por Anchieta. **Bragantia**, v.18, p.31-37, 1959.
- VITALI, V.M.; MACHADO, K.M.G; ANDREA, M.M.; BONONI, V.L.R. Action of *Eupenicillium* spp. on biotransformation of hexachlorobenzene in soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2005, In press.
- VYAS, B.R.M.; BAKOWISKI, S.; SASEK, V.; TATUCHA, M. Degradation of anhracene by selected white rot fungi. **FEMS Microbiology**, v.14, p.65-70, 1994.

*Biodegradação de Lignina e
Tratamento de Efluentes por Fungos
Ligninolíticos: Atualização*

Nelson Durán^{1,2} e Elisa Esposito²



Foto: I.S. Melo

I. Biodegradação de lignina na madeira

I.1 Fungos degradadores de lignina

Os fungos degradadores da madeira podem ser divididos em três grupos, de acordo com a morfologia da degradação que produzem: fungos de degradação branca, marrom e macia. Os fungos degradadores da madeira são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence à subdivisão Basidiomycotina. Os basidiomicetos de degradação branca são os mais eficientes organismos degradadores de lignina. São capazes de mineralizar lignina, eventualmente até CO_2 e H_2O (DURÁN & ESPOSITO, 1997; TUOR *et al.*, 1995; TUOMELA *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; LOZOVARAYA *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2006).

Os fungos de degradação marrom e macia são capazes de degradar lignina em alguma extensão, embora preferencialmente ataquem a celulose presente na madeira (RABINOVICH *et al.*, 2004).

I.2 Fungos de degradação branca

Os basidiomicetos causadores de degradação branca na madeira realizam degradação seletiva da lignina presente na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta (JELLISON & JASALAVICH, 2000; OSSES *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2005). Entretanto, esses fungos variam consideravelmente de acordo com o tipo de ataque à lignina e aos polissacarídeos da madeira. Além disso, demonstram velocidades diferentes na remoção da lignina (KIRK & FARRELL, 1987). Com base nessas propriedades, podem ser divididos em dois subgrupos: a) fungos que degradam simultaneamente todos os componentes, aproximadamente a mesma velocidade; b) fungos que preferencialmente degradam lignina. Estes últimos criam, tipicamente, áreas localizadas de degradação, sendo designados fungos de bolsos brancos ou manchados (ERIKSSON *et al.*, 1990).

A identificação dos fungos de degradação branca é baseada nas características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria dos basidiomicetos tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (DURÁN & ESPOSITO, 1997). Sua habilidade comum é oxidar compostos fenólicos, relacionados à lignina, que na maioria das vezes está associada a enzimas extracelulares ligninolíticas, em particular lacases (ELISSETCHE *et al.*, 2006).

Estudos de microscopia eletrônica nos últimos anos têm revelado que esses fungos colonizam a madeira, invadindo o lúmen de traqueídeos e fibras, segregando enzimas que degradam lignina e polissacarídeos (BARRASA *et al.*, 1992; DANIEL, 1994; MANKOWSKI & MORRELL, 2000; SOLAR *et al.*, 2003; BRANDSTROM *et al.*, 2003; SINGH *et al.* 2006),

1.3 Fungos de degradação marrom

Fungos de degradação marrom produzem tipicamente uma quebra extensiva dos polissacarídeos da madeira (ex.: celulose e hemicelulose) e deixam a maioria da lignina intacta. Logo, a madeira degradada por esses fungos tem um aspecto amarronzado e de aparência frágil (BLANCHETTE, 1991; LEE *et al.*, 2004). Os fungos de degradação marrom predominantemente atacam madeiras moles, enquanto os de degradação branca são eficientes no ataque a madeiras duras. Os fungos responsáveis pela degradação marrom também pertencem a classe Basidiomicotina e a maioria das espécies à família Polyporaceae; entretanto, correspondem a apenas 6% de todos os basidiomicetos que degradam a madeira (DURÁN & ESPOSITO, 1997).

Embora esses fungos não sejam capazes de efetivamente despolimerizar a lignina, podem fazer modificações, resultando em decréscimo dos grupos metoxilas da lignina da madeira. Logo, os grupos fenólicos aumentam significativamente, alterando a lignina para subsequentes biodegradações. Além disso, um aumento dos grupos hidroxilas alifáticos, como os carboxílicos, também produzem quebras parciais de interunidades de ligações com cadeias laterais. Portanto, não é possível generalizar; pois as propriedades de degradação mostram grande variedade entre as espécies (ERIKSSON *et al.*, 1990; PANDY & PITMAN, 2004).

O mecanismo pelo qual os fungos de degradação marrom modificam a lignina é ainda desconhecido, já que não produzem enzimas ligninolíticas. Acredita-se que moléculas pequenas (glicoproteínas), que têm ferro, poderiam estar participando das transformações da lignina via produção de radicais hidroxila (DURÁN, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 2003; OVIEDO *et al.*, 2003ab; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; KANEKO *et al.*, 2005; CONTRERAS *et al.*, 2006; ARANTES E MILAGRES, 2006).

Os fungos de degradação marrom produzem porosidade e erosão nas células da parede da madeira, devido a uma quebra rápida do suporte celulósico das microfibrilas. Perda da lignina, em particular das células dos cantos, e remoção dos grupos metoxilas são visualizadas por técnicas de microscopia eletrônica (BLANCHETTE, 1991). Com base nessa observação, as hifas de fungos de degradação marrom podem ser divididas em dois grupos fisiológicos: a) hifas que degradam todos os componentes da parede celular da madeira, incluindo a lignina; b) hifas que podem somente modificar a lignina quando estão degradando os polissacarídeos da madeira. Microfibrilas específicas, por exemplo, extensões lineares e emaranhado de células da parede da hifa, foram detectadas nesses fungos, que podem transportar enzimas hidrolíticas a um contato direto com seu substrato (DURÁN & ESPOSITO, 1997).

1.4 Fungos de degradação macia

Os fungos pertencentes a classe *Ascomycotina* e *Deuteromicotina* podem causar um tipo específico de degradação na madeira, caracterizada por ser suave, de aparência úmida, que sob condições de secagem pode lembrar a degradação do tipo marrom (BLANCHETTE, 1991).

A degradação macia inclui cavidades na camada 52 das células da parede da madeira, abertas por penetração fina das hifas (ERIKSSON *et al.*, 1990; TOTH *et al.*, 2003). A formação de cavidades segue a orientação de microfibrilas na parede secundária, que é designada como degradação do Tipo 1. Células da parede da madeira podem também ser degradadas adjacentemente às hifas, degradação designada do Tipo 2. De acordo com a morfologia, há fungos de degradação macia responsáveis por degradação tanto do Tipo 1 como do Tipo 2 ou uma combinação de ambos, não existindo fungos para decomposição somente do Tipo 2 (DURÁN & ESPOSITO, 1997).

Os fungos de degradação macia preferencialmente colonizam e degradam madeiras duras, especialmente as de alta umidade. Em madeiras moles, a velocidade de degradação por fungos de degradação macia é geralmente mais lenta que a dos de degradação branca e marrom. Embora estes normalmente metabolizem os polissacarídeos da madeira, são capazes de algumas transformações da lignina. No caso dos fungos de degradação marrom, a lignina é usualmente modificada por desmetilação. Entretanto, os fungos de degradação macia são deficientes na despolimerização de ligninas sintéticas, embora convertam rapidamente compostos fenólicos relacionados com lignina. Isso deixa mais discrepâncias na natureza dos agentes e nos mecanismos dos fungos de degradação macia, no possível envolvimento na degradação de lignina. Entretanto, em ascomicetos, como, por exemplo, *Chrysonilia sitophila*, foram isoladas isoenzimas de lignina peroxidase, que se mostraram semelhantes às de fungos de degradação branca, como o *Phanerochaete chrysosporium* (DURÁN *et al.*, 1987a,b; FERRAZ *et al.*, 1991; FERRER *et al.*, 1992; FERRAZ & DURÁN, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 1997). Estudos de degradação de madeira mole sugerem quebras oxidativas em ligações α -C β e β -O-aryl na lignina. Outro ascomiceto estudado recentemente é o *Thermoascus aurantiacus* e uma de suas enzimas, a fenoloxidase (MACHUCA & DURÁN, 1993, 1996, 1999). Também, assim como os fungos de degradação branca e marrom, estes produzem moléculas de baixo peso molecular que degradam lignina e geram, aparentemente, radicais hidroxilos (DURÁN & MACHUCA, 1995; DURÁN, 1996).

2. Enzimas ligninolíticas

2.1 Aspectos gerais

A atividade de fenoloxidases extracelulares, indicando a presença de enzimas ligninolíticas, foi descoberta na década de 30 em fungos de degradação branca. Logo

depois foi demonstrado que as reações eram catalisadas por oxidoredutases do tipo de lacases e peroxidases. A habilidade em oxidar compostos fenólicos, especificamente, tem sido utilizada como critério de identificação para fungos de degradação branca verdadeiros. Em seguida ao isolamento e caracterização de lacases, duas peroxidases, chamadas lignina peroxidase e Mn-peroxidase, foram evidenciadas na participação da quebra da lignina e outras enzimas. Essas enzimas, além das relacionadas à quebra da lignina, como a produção de peróxido de hidrogênio, são indispensáveis para ligninólises e logo serão também relatadas (DURÁN & ESPOSITO, 1997, 2000; DURÁN, 2003; COHEN *et al.*, 2002; TORTELLA *et al.*, 2005).

2.2 Lignina peroxidase

Em 1983, dois grupos relataram a descoberta de uma enzima extracelular degradadora de lignina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. A enzima, primeiramente chamada de ligninase, é uma glicoproteína, que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica. Estudos subsequentes revelaram que a lignina peroxidase (LiP) (nome atual) de *P. chrysosporium* apresenta múltiplas formas com pl de 3,2-4,7 e massa molar de 38-43kDa. Diferentes LiPs têm sido isoladas, dependendo da cepa, condições de cultura, idade e tipo de separação (DURÁN & ESPOSITO, 1997; DURÁN, 2003, 2004).

Lignina peroxidases têm sido isoladas em numerosos fungos de degradação branca e em alguns fungos de degradação marrom e macia (IKEHATA *et al.*, 2004; WESENBERG *et al.*, 2003; PIONTEK, 2002).

O ciclo catalítico da lignina peroxidase fundamentado na peroxidase de raiz forte é o seguinte (KHINDARA *et al.*, 1995; HIRATSUKA *et al.*, 2005; HIGUCHI, 2006);

- a) $\text{LiP}(\text{Fe [III]})\text{P} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{LiP-I}(\text{Fe[IV=O]})\text{P} + \cdot$
- b) $\text{LiP-I}(\text{Fe[IV=O]})\text{P} + \cdot + \text{AH} \longrightarrow \text{LiP-II}(\text{Fe[IV=O]})\text{P} + \text{AH}\cdot + \cdot$
- c) $\text{LiP-II}(\text{Fe[IV=O]})\text{P} + \text{AH} \longrightarrow \text{LiP}(\text{Fe [III]}) + \text{AH}\cdot + \text{H}_2\text{O}$
- d) $\text{LiP-II}(\text{Fe(IV)=O})\text{P} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{LiP-III}(\text{Fe [III-O}_2\text{.-]})$ (inativo)
- e) $\text{LiP-III}(\text{Fe[III-O}_2\text{.-]}) + \text{AH}\cdot \longrightarrow \text{LiP}(\text{Fe [III]})\text{P} + \text{O}_2 + \text{AH}$

A lignina peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, é capaz de degradar compostos fenólicos e não fenólicos, anéis aromáticos alcoxilados do tipo da lignina, e realiza quebras de anéis em modelos da lignina dimérico como poliméricos e as cloroligninas. Em resumo, a LiP gera: a) oxidação de álcoois benzílicos; b) quebra de cadeias aromáticas laterais C α -C β ; c) desmetilação; d) rearranjos intramoleculares; e) quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina. O álcool veratrílico tem um papel importante na catálise da LiP: é o redutor

preferido pela enzima, produzido pelo fungo de degradação branca após ligninólise, e aparentemente protege a enzima contra a inativação do excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool veratrílico a veratraldeído, que é comum nos ensaios da atividade da LiP. *In vitro*, LiP degrada ligninas metiladas de "spruce e birch", como de palha de milho e ligninas sintéticas (DURÁN & ESPOSITO, 1997, 2000).

2.3 Manganês peroxidase

A enzima manganês peroxidase MnP foi descoberta em *P. chrysosporium* junto à LiP (KUWAHARA *et al.*, 1984). Essa enzima é muito semelhante à LiP: é extracelular, glicosilada, massa molar de 45-47 kDa e possui um grupo protético heme. Entretanto, é dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{+2} , e a-cetoácido como lactato estabiliza sua atividade oxidativa (HOFRICHTER, 2002; CONESA *et al.*, 2002; GIANFREDA & RAO, 2004). O ciclo catalítico da MnP é similar ao da LiP (GOLD *et al.*, 1989; POULUS *et al.*, 1995; MERSTEN *et al.*, 1995);

- $MnP(Fe[III])P + H_2O_2 \rightarrow MnP-I(Fe[IV=O])P + H_2O$
- $MnP-I(Fe[IV=O])P + Mn^{+2} \rightarrow MnP-II(Fe[IV=O])P + Mn^{+3}$
- $MnP-I(Fe[IV=O])P + AH \rightarrow MnP-II(Fe[IV=O])P + A. + H^+$
- $MnP-II(Fe[IV=O])P + Mn^{+2} \rightarrow MnP(Fe[III])P + Mn^{+3} + H_2O$
- $Mn^{+3} + AH \rightarrow Mn^{+2} + A. + H^+$

Na presença de peróxido de hidrogênio, MnP/ Mn^{+2} /malonato catalisa quebras C α -C β , oxidações C α e quebras de ligações arilalquílicas de fenóis siringílicos diméricos β -I e β -O-4 (TUOR *et al.*, 1995).

Embora a mineralização efetiva de ligninas sintéticas se correlacionem com baixo teor de Mn, com elevadas da LiP e baixa MnP, outros dados implicam a MnP na degradação da lignina. A MnP é implicada na degradação de cloroligninas e não a LiP. A MnP também desmetila e deslignifica polpas Kraft (KANEKO *et al.*, 1995).

2.4 Lacases

Lacases são fenoloxidases produzidas por fungos e por plantas, e pertencem ao grupo de oxidases que complexam cobre (LEONOWICZ *et al.*, 2001; MINUSSI *et al.*, 2002; DURÁN *et al.*, 2002). Essas enzimas são segregadas na maioria dos basidiomicetos. As massas molares estão dentro da faixa de 60-100kDa. A lacase de *T. versicolor* possui 4 átomos de cobre e todos no estado de oxidação 2+ na enzima nativa, mas em três tipos iônicos: uma do tipo I, outra do tipo II e duas no tipo III, tendo diferentes coordenações no sítio ativo. Nos tipos I e II, os íons de cobre são Cu^{+2} e paramagnéticos, enquanto nos dois do tipo III os íons formam um par binuclear

antiferromagnético não detectável por EPR. As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos, gerando radicais fenoxilos (HIGUCHI, 1990).

- a) $2(\text{Cu}[\text{II}]\text{-Lacase} + \text{fenol} \longrightarrow 2(\text{Cu}[\text{I}]\text{-Lacase} + \text{radical fenolato} + 2\text{H}^+$
b) $2(\text{Cu}[\text{I}]\text{-Lacase} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2(\text{Cu}[\text{II}]\text{-Lacase} + \text{H}_2\text{O}$

Os radicais formados rapidamente atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Logo, essas reações múltiplas levam a:

- a) polimerização;
b) quebras alquílicas;
c) oxidações nos C α e desmetilações (Katase e Bollag, 1991).

A lacase de *T. versicolor* pode oxidar modelos de lignina não fenólicos na presença de ABTS ou siringaldeído, logo se assemelhando à LiP (BOURBONNAIS *et al.*, 1995). Foi proposto outro mediador, o 1-hidroxibenzotriazole, que permite 50% de deslignificação de polpas na presença de lacases (CALL & MUCKE, 1995) além de outros (D'ACUNZO *et al.*, 2003, 2006; BARRECA *et al.*, 2004; CANTARELLA *et al.*, 2004; ANNUNZIATINI *et al.*, 2005; KULYS & VIDZIUNAITE, 2005; FERNAUD *et al.*, 2006).

2.5 Outras enzimas relacionadas com a degradação da lignina

Existem enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, por exemplo, glicose l-oxidase (GO), que preferencialmente oxida glicose, e glicose -2-oxidase (POD), que oxida glicose, xilose ou d-D-gliconolactona. Álcool oxidase, ácidos graxos CoA oxidase, gioxal oxidase e arilálcool oxidase (DURÁN & ESPOSITO, 1997). Outras enzimas que podem estar relacionadas com degradação da são a NAD(PH): quinona óxido redutase, a celobiose: quinona l-oxidoreductase (CBQ), celobiose desidrogenase (CDH), celobiose oxidase (CBO) e peroxidase independente de manganês (DURÁN *et al.*, 2006).

3. Importância das condições ecológicas

Como todos os basidiomicetos degradam os três componentes da madeira, (celulose, hemicelulose e lignina) embora a diferentes velocidades e extensão, têm-se dividido os fungos de degradação branca em classes de degradadores simultâneos da lignina com polissacarídeos ou degradadores seletivos. Esta classificação tem se mostrado difícil, pelo fato desses fungos poderem apresentar ambos comportamentos quando estão atuando no mesmo substrato ou atacam a lignina e polissacarídeos

seqüencialmente. As condições ambientais, tais como temperatura, umidade, microclimas, conteúdo de nitrogênio dos substratos e compartmentalização, podem também governar a seletividade da biodegradação da lignina *in vivo* (TUOR *et al.*, 1995). Os gases na madeira podem influenciar as atividades enzimáticas, já que, por exemplo, no âmbito de hifas, elevadas concentrações de dióxido de carbono com concomitante depressão de oxigênio sugerem que a degradação de lignina *in vivo* pode acontecer sob condições microaeróbicas. *P. chrysosporium* degrada eficientemente lignina/dioxano de palha em atmosfera de 30% de dióxido de carbono e 10% de oxigênio. A degradação da lignina ocorre a pHs baixos. Seus ótimos diferem entre as espécies. *P. chrysosporium* degrada lignina a pH 4 com perda da atividade a pHs mais baixos. Em outro estudo, enquanto que, a degradação da lignina por *P. chrysosporium* e *Pleurotus sajor-caju* é maior com o decréscimo do pH, abaixo de 3. De acordo com a literatura, a LiP do *P. chrysosporium* tem atividade ótima a pH 3,0 e MnP a pH 4,5, e a lacase de *P. noxius* a pH é 4,6. O pH dos substratos naturais varia entre 4 e 6, tanto para madeiras duras como moles, e corresponde ao ótimo crescimento para a maioria dos fungos degradadores de madeira. Além disso, os fungos podem manter o pH ambiental baixo com relação as hifas, secretando camadas finas de polissacarídeos (DURÁN & ESPOSITO, 1997; DURÁN, 2003, 2004).

4. Mecanismo de biodegradação de ligninas

A despolimerização da lignina pode ser considerada como um processo oxidativo, mas a metabolização dos fragmentos da lignina envolve a combinação de processos oxidativos e redutivos. A compartmentalização das conversões oxidativas e redutivas pede um potente mecanismo de transporte nas células das paredes. As evidências deste mecanismo se deram através da remoção dos substratos da quinona redutase em culturas líquidas de *P. chrysosporium* e da observação de secreção subsequente e imediata dos produtos de redução.

5. Enzimas ligninolíticas e seu papel no tratamento de efluentes

5.1 Tratamento biológico de efluentes

A industrialização da polpa e papel kraft gera uma grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, extremamente danosos ao ambiente. Neste capítulo serão analisados os efluentes líquidos provenientes desse processo, os tratamentos convencionais aplicados na indústria papeleira e o tratamento fúngico como um método alternativo.

Os efluentes originados da produção do branqueamento das polpas kraft contêm açúcares provenientes da madeira, carboidratos, ácidos orgânicos, ácidos resinosos, compostos neutros e produtos da transformação de ligninas, além de uma série de organoclorados derivados (FULTHORPE & ALLEN, 1995). Estes últimos são formados a partir das reações entre a lignina presente nas fibras e o cloro empregado para o branqueamento.

Os efluentes podem causar toxicidade aguda ou crônica, mutagenicidade, deficiência de oxigênio, eutroficação nos corpos de água receptores e, por consequência, modificações nas comunidades de plantas e animais (MELO *et al.*, 2006; KOVACS *et al.*, 2004; SEPULVEDA *et al.*, 2003). Alguns dos compostos presentes nestes efluentes foram classificados como altamente recalcitrantes. Recentemente foi constatada a presença de dioxinas (polifenóis clorados) altamente tóxicas (em concentrações de parte por trilhão) em polpas branqueadas com cloro molecular e seu licor residual de branqueamento. A princípio, pouca atenção foi dada ao problema e em 1983 foram encontrados traços de dioxinas e furanos em peixes no rio Wiscosin, nos EUA. Mais tarde, em 1986, pesquisadores suecos constataram deformidade em peixes no mar Báltico, próximo da área de lançamento de efluentes de uma indústria papeleira. A forma mais tóxica de dioxina clorada, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, já foi eliminada das indústrias papeleiras na América do Norte. As dioxinas são os compostos químicos mais tóxicos regulados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA/EUA). Em vista do impacto ambiental causado por esses efluentes, esforços têm sido feitos com o objetivo de reduzir ou eliminar o uso de compostos clorados das etapas de branqueamento da polpa kraft (DURÁN & ESPOSITO, 1997). A tendência atual é a substituição desses compostos por agentes à base de oxigênio (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio).

Entretanto, as perspectivas são de que, pelo menos nos próximos 10 anos, ainda se utilizem compostos clorados. Em 1992, a produção mundial de polpa totalmente livre de cloro (TCF-totally chlorine free) atingiu somente 1% (ODENDAHAL, 1994).

Informações recentes confirmam que a produção de polpa TCF permanece praticamente inalterada. O problema, é que os efluentes originados do processo apresentam toxicidade crônica e os compostos ainda não foram identificados. Entretanto, sabe-se que estes efluentes possuem alta porcentagem de peróxido de hidrogênio, o que dificulta o tratamento biológico por fungos, uma vez que as enzimas ligninolíticas estariam sendo inativadas nessas condições. A perspectiva atual é a produção de polpas ECF (elementary chlorine free), processo no qual se utiliza dióxido de cloro, ao invés do cloro elementar. Estão sendo desenvolvendo estudos sobre a relação siringil/guaiacil e seu impacto no processo kraft, além de considerar modificações genéticas na lignina de espécies de eucaliptos (PEREIRA *et al.*, 1995). A Ripasa Celulose Papel (SP) introduziu o peróxido de hidrogênio no branqueamento, substituindo, dessa forma, 30% dos compostos clorados. As empresas papeleiras vêm investindo em pesquisas, em conjunto com as universidades nacionais e estrangeiras sobre oxigênio, xilanases, ozônio e peróxido de hidrogênio (ANGELO *et al.*, 1995ab, 1997). Felizmente, a maioria das empresas tem demonstrado preocupação em diminuir os níveis de poluição e implementar novas tecnologias para a redução

dos compostos clorados. Supõe-se que essa preocupação se deve principalmente às crescentes pesquisas desenvolvidas na área, à ação de ambientalistas, às pressões do mercado externo e também da opinião pública (BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.23, p.3-26, mar. 2006).

5.2 Tratamentos de efluentes mais empregados pelas indústrias

As lagoas de estabilização, ou lagoas aeradas, são freqüentemente empregadas para reduzir os níveis de sólidos suspensos e a demanda bioquímica de oxigênio de efluentes kraft. O decréscimo tanto das quantidades de AOX (uma estimativa do total de organoclorados) quanto da toxicidade é muito variável (FULTHORPE & ALLEN, 1995). As lagoas aeradas são o método mais comumente empregado pelas indústrias papeleiras. Possuem aproximadamente 2-6 m de profundidade e têm um tempo de detenção de menos de 10 dias. São mecanicamente aeradas com difusores de ar ou aeradores mecânicos. A eficiência do processo depende do tempo de aeração, da temperatura e do tipo de efluente. Aproximadamente 80% da população microbiana das lagoas de tratamento são bactérias Gram-negativas e apenas 1% são bactérias anaeróbicas facultativas (LISS & ALLEN, 1992). O efluente gerado a cada novo processo varia muito. A temperatura ambiental, à qual está exposta a lagoa, não é um valor constante, e o tipo de madeira empregada para a polpação também afeta a microflora local. Logo, é de se esperar que o tratamento apresente tantas variações nas reduções de toxicidade e AOX. Outro tratamento empregado por algumas indústrias papeleiras é o lodo ativado. O processo consiste essencialmente de um tratamento aeróbico, que oxida a matéria orgânica a CO₂ e H₂O, NH₄⁺, e nova biomassa, onde o ar é provido por aeração mecânica ou por um difusor e as células microbianas formam flocos. Uma característica importante do lodo ativado é a recirculação de uma grande proporção da biomassa, pois ajuda a manter grande número de microrganismos, que efetivamente oxidam compostos orgânicos em um tempo relativamente curto. O tempo de detenção varia de 4 a 8 horas, entretanto, a quantidade de lodo formado é muito alta, o que é uma séria desvantagem do método (DIEZ *et al.*, 2002; SUBILAMPI & RINTALA, 2004; POKHREL & VIRARAGHAVAN, 2006; WHITE & LEE, 2006).

5.3 Métodos alternativos de tratamento de efluentes: o potencial de fungos de decomposição branca e macia no tratamento de efluentes

Os fungos de decomposição branca possuem um sistema enzimático extracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (BARR & AUST, 1994ab).

O processo de obtenção de polpas celulósicas e de fabricação de papel é um dos responsáveis pela maior carga poluente, que atinge os ecossistemas na forma de efluentes ou resíduos sólidos, altamente tóxicos e, muitas vezes, mutagênicos,

persistentes e/ou bioacumulativos, embora estes problemas têm diminuído drasticamente nos últimos anos. O efluente proveniente da primeira extração alcalina contém compostos clorados de alta e baixa massa molar, cloroligninas e clorofenóis, respectivamente. A cor escura do efluente é atribuída essencialmente a esse estágio (E1).

A utilização de fungos objetiva a descontaminação dos efluentes. A eficiência desses processos está diretamente relacionada com a capacidade do fungo em degradar lignina (ONYSKO, 1993; SELVAM *et al.*, 2002; RAGUNATHAN & SWAMINATHAN, 2004)

Enzimas, como a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), são produzidas por esses fungos, em geral, como resposta a baixas concentrações de fontes de carbono, nitrogênio ou nutrientes sulfurados. Evidências indicam que essas enzimas são responsáveis pela fragmentação inicial do polímero de lignina. Entretanto, o papel específico do manganês é incerto. Foi observado que, na ausência da enzima, o Mn³⁺ quelado foi um agente ligninolítico capaz de oxidar álcool veratrílico, compostos modelo de lignina. Foi demonstrado que a atividade ligninolítica de *Lentinula* (=Lentinus) *edodes*, atualmente selecionado para o tratamento de efluentes (ESPOSITO *et al.*, 1991), é dependente da adição de manganês. Acredita-se que, sob condições adequadas, o Mn³⁺ gerado por MnP possa ser uma parte importante do sistema ligninolítico de *L. edodes* e de outros fungos de decomposição branca, sendo a MnP a principal peroxidase detectada em culturas de *L. edodes*. A enzima foi purificada e estudada, quanto às suas características e seqüência de aminoácidos. Foi observado o efeito de vários compostos fenólicos derivados da lignina sobre o crescimento e degradação por *L. edodes*, sendo demonstrada sua eficiência na descontaminação de efluentes provenientes das indústrias de polpa e papel, foi previamente demonstrada (ESPOSITO *et al.*, 1991). *L. edodes* foi selecionado dentre 51 cepas de fungos ligninolíticos para descoloração de efluente kraft E1 (ESPOSITO *et al.*, 1991). Após 5 dias de tratamento biológico, sem fonte adicional de carbono e nitrogênio, obtiveram-se 60% de redução de DQO e 73% de descoloração, desse e total apenas 13% foram devidos à adsorção micelial. Em trabalho posterior com *L. edodes* UEC-2021, obtiveram-se valores de 83% de descoloração, 53% de remoção de fenóis totais, 60% de redução de carbono orgânico total após 5 dias de tratamento (DURÁN & ESPOSITO, 1997). Esse fungo mostrou-se altamente eficiente na descontaminação de efluente E1.

As MnP participam de reações de despolimerização de ligninas sintéticas, degradação de cloroligninas de alta massa molar, descoloração de efluentes do tipo kraft (DURÁN & ESPOSITO, 1997).

O papel da LiP e MnP na descoloração de efluentes de branqueamento foi estudado por Michel *et al.*, 1991. Nesse estudo foi evidenciada a importância das peroxidases extracelulares na descontaminação de efluentes, onde MnP parece ter um papel predominante sobre LiP. Esses resultados foram corroborados por outros autores em trabalhos anteriores entre 1990 e 1994. Neste último, foi demonstrado que MnP, mas não LiP, foi produzida por *P. chrysosporium* (*Basidiomycete*) no efluente E1 e que o tipo de pellet formado pelo fungo tem uma importância significativa sobre a produção enzimática. Lee *et al.* (1994) observaram que, durante o tratamento

do efluente E1 com o fungo ligninolítico KS-62, foram produzidas altas taxas de MnP e muito pouco ou nada de LiP. Esse fato, associado à eficiência do processo (80% de descoloração em 10 dias, 34% de redução da DQO e 40% de redução de AOX), levou os autores à conclusão de que MnP tem um papel relevante sobre LiP. Experimentos com as enzimas purificadas demonstraram que MnP é capaz de catalisar parcialmente a descoloração do efluente E1, mas o mesmo não foi observado com LiP. Contudo, também foi demonstrado que a LiP produzida por *Chrysonilia sitophila* TFB27441 (*Ascomycete*) foi capaz de remover a cor de efluentes E1 (DEZOTTI *et al.*, 1995), e a LiP purificada a partir de cultura de *C. sitophila* TFB-27441 (LiP-I e LiP-III) foi estudada nas formas livres e imobilizadas para descoloração de efluentes. Os resultados demonstraram que, após 72 horas, a enzima imobilizada em sefareose removia 45,7% da cor do efluente. Ao que tudo indica, as condições para a aplicação dessa enzima são muito importantes, bem como o tipo de microrganismo produtor de LiP. Soares & Durán (1998; 2001) questionaram a importância de MnP na descoloração do efluente kraft E1 em um estudo realizado com *Trametes villosa*. O fungo secreta quantidade significativa de lacase, β -glicosidase e insignificantes quantidades de peroxidases (LiP, MnP e álcool veratrílico oxidase) e, 48 horas, descolora 70-80% do efluente e consome cerca de 75% de fenóis totais. As lacases oxidam compostos fenólicos até radicais ariloxila, os quais polimerizam espontaneamente, formando complexos insolúveis que facilmente podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação. A remoção da cor de efluentes E1 por enzimas ligninolíticas, entre estas lacases foi estudada por vários autores (DURÁN & ESPOSITO, 1997). A lacase produzida por *Phlebia radiata* e *Merulius tremellosus* aumenta a cor do efluente nos primeiros dias de cultivo, possivelmente devido à oxidação de estruturas fenólicas a quinonas, que polimerizam originando complexos insolúveis, conforme mencionado.

Acredita-se que os fungos considerados de decomposição branca, que utilizam MnP para mediar a degradação de lignina na natureza, também produzem agentes quelantes, tais como oxalato, para estabilizar Mn³⁺.

Tanto LiP quanto MnP são dependentes de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio extracelular, produzido a partir do oxigênio molecular, é suplementado por enzimas oxidativas, que utilizam glicose, gioxal, metilgioxal e outros produtos da degradação da celulose e lignina como substrato. A LiP, após sofrer oxidação por peróxido de hidrogênio, oxida núcleos aromáticos na lignina (fenólicos e não fenólicos) por extração de um elétron, gerando radicais cátions. Estes reagem com nucleófilos e com oxigênio molecular. O resultado é uma "combustão enzimática", na qual as ligações C-C e C-O são clivadas causando a despolimerização do polímero e a abertura dos anéis aromáticos. O álcool veratrílico é um excelente substrato para LiP e, aparentemente, atua como um "mediador" ou liberador de elétron entre LiP e seu substrato. Acredita-se que o álcool veratrílico proteja a enzima da inativação do excesso de H₂O₂ (DURÁN, 2003; 2004). A oxidação do álcool veratrílico para aldeído veratrílico pela LiP, na presença de H₂O₂, é a reação mais utilizada como método de determinação da atividade catalítica desta enzima (DURÁN & ESPOSITO, 1997).

A MnP tipicamente oxida Mn²⁺ a Mn³⁺: Mn³⁺ é empregado para oxidar compostos químicos. Aparentemente Mn³⁺ pode oxidar hidroquinonas a radicais

semiquinonas, as quais podem atuar como agentes redutores. A MnP possui um forte potencial de oxiredução ($E^\circ = 1,54$ V em água) e pequeno tamanho, comparado a proteínas, o que favorece a penetração de Mn^{3+} em substratos lignocelulósicos e oxidação da lignina.

Além das enzimas ligninolíticas mencionadas, outras enzimas oxidativas, também podem ser importantes no tratamento biológico de efluentes, como as lacases, polifenóis oxidases que contêm cobre no seu sítio ativo e catalisam a redução de O_2 para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos (DURÁN *et al.*, 2002).

Pode-se concluir que fungos ligninolíticos apresentam excelente potencial na reciclagem de contaminantes, no caso, efluentes da indústria papeleira. Aparentemente, algumas enzimas, como MnP e lacase, são mais importantes no processo de descontaminação do que outras, como LiP (MARTINEZ *et al.*, 2005; TORTELLA *et al.*, 2005).

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, FAPESP e FINEP pelo apoio a nossas pesquisas.

Referências

- ANGELO, R.; AGUIRRE, C.; CUROTTI, E.; ESPOSITO, E.; FONTANA, J.D.; BARON, M.; MILAGRES, A.M.F.; DURÁN, N. Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus* sp. (2MI strain). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.25, p.9-27, 1997.
- ANGELO, R.S.; AGUIRRE, C.; CUROTTI, E.; DURÁN, N. Utilização de hemicelulases em seqüências de branqueamento de polpas Kraft totalmente livres de cloro. In: ENZITEC-95, SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2. Rio de Janeiro, 1995. Anais. v.2, p.1-4, 1995.
- ANGELO, R.S.; ESPOSITO, E.; CUROTTI, E.; SACON, V.M.; BAEZA, J.; FREER, J.; DURÁN, N. TCF eucalyptus kraft pulp: effect of asperzyme 2M1 on bleaching and its effluent bioremediation with *Lentinula edodes*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS. Recife, 1995. Proceedings. v.5, p.210-214.
- ANNUNZIATINI, C.; BAIOCCHI, P.; GERINI, M.F.; LANZALUNGA, O.; SJOGREN, B. Aryl substituted N-hydroxyphthalimides as mediators in the laccase-catalysed oxidation of lignin model compounds and delignification of wood pulp. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v.32, p.89-96, 2005.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. *Process Biochemistry*, v.41, p.887-891, 2006.
- BARR, O.P.; AUST, S.O. Conversion of lignin peroxidase compound III to active enzyme by cation radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.312, p.511-515, 1994b.
- BARR, O.P.; AUST, S.O. Critical review: Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, v.28, p.78-87, 1994a.
- BARRASA, J.M.; GONZÁLEZ, A.E.; MARTÍNEZ, A.T.: Ultrastructural aspects of fungal delignification of Chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*: a study of natural and *in vitro* degradation. *Holzforschung*, v.46, p.1-8, 1992.
- BARRECA, A.M.; SJOGREN, B.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Catalytic efficiency of some mediators in laccase-catalyzed alcohol oxidation. *Biocatalysis and Biotransformation*, v.22, p.105-112, 2004.
- BLANCHETTE, R.A. Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v.29, p.381-398, 1991.

- BRANDSTROM, J.; BARDAGE, S.L.; DANIEL, G.; NILSSON, T. The structural organization of the S-1 cell wall layer of Norway spruce tracheids. *IAWA Journal*, v.24, p.27-40, 2003.
- CALL, H.P.; MUCKE, I. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY**, Vienna, Austria, 1995. Abstracts. O-F3-234, p.38.
- CANTARELLA, G.; GALLI, C.; GENTILI, P. Oxidation of non-phenolic substrates with the laccase/N-hydroxyacetanilide system: Structure of the key intermediate from the mediator and mechanistic insight. *New Journal of Chemistry*, v.28, p.366-372, 2004.
- COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.582-594, 2002.
- CONESA, A.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**, v.93, p.143-158, 2002.
- CONTRERAS, D.; FREER, J.; RODRIGUEZ, J. Veratryl alcohol degradation by a catechol-driven Fenton reaction as lignin oxidation by brown-rot fungi model. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57, p.63-68, 2006.
- D'ACUNZO, F.; BAIOCCHI, P.; GALLI, C. A study of the oxidation of ethers with the enzyme laccase under mediation by two N-OH-type compounds. **New Journal of Chemistry**, v.27, p.329-332, 2003.
- D'ACUNZO, F.; GALLI, C.; GENTILI, P.; SERGI, F. Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bifunctional substrates. **New Journal of Chemistry**, v.30, p.583-591, 2006.
- DANIEL, G. Use of electron-microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p.199-233, 1994.
- DEZOTTI, M.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; DURÁN, N. Silica-immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignins from Eucalyptus Kraft effluent. **Journal of Biotechnology**, v.43, p.161-167, 1995.
- DIEZ, M.C.; CASTILLO, G.; AGUILAR, L.; VIDAL, G.; MORA, M.L. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. **Bioresource Technology**, v.83, p.131-138, 2002.
- DURÁN, N. Application of oxidative enzymes in wastewater treatment. In: A. Sakurai. (Org.). **Wastewater Treatment using Enzymes**, Kerala-India: Research Signpost, 2003, v.2, p.41-51.
- DURÁN, N. Enzimas lignonolíticas, In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Biología, Bioquímica e Biotecnología de Fungos**. Univ. Mogi das Cruzes Editora, Mogi das Cruzes, SP, Cap.7, p.245-262, 2004.
- DURÁN, N. Siderophores on wood degradation: Reduction of molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous trono In: **BRAZILIAN SYMPOSIUM ON CHE-MISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS**, 4, Recife, 1996. Proceedings, v.5, p.164-169, 1996.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de Lignina e Tratamento de Efluentes por Fungos Ligninolíticos", In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Microbiologia Ambiental**, CNPMA/EMBRAPA Editora, p.269-292, 1997.
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B-Environmental**, v.28, p.83-99, 2000.
- DURÁN, N.; MACHUCA, A. Kraft pulp bleaching by an extracellular low molecular metabolite from the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v.53, p.3-46, 1995.
- DURÁN, N.; RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; CAMPOS, V. *Chrysonilia sitophila*: A hyperligninolytic strain. **Biotechnology Letters**, v.9, p.357-360, 1987a.
- DURÁN, N.; RODRIGUEZ, J.; FERRER, I. Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.16, p.157-163, 1987b.
- DURAN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.907-931, 2002.
- ELISSETCHE, J.P.; FERRAZ, A.; FREER, J.; RODRIGUEZ, J. Influence of forest soil on biodegradation of *Drimys winteri* by *Ganoderma australe*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57, p.174-178, 2006.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer, 1990.
- ESPOSITO, E.; CANHOS, V.P.; DURÁN, N. Screening of lignin-degrading fungi for removal of colar from kraft mill wastewater with additional extra carbon-source. **Biotechnology Letters**, v.13, p.571-576, 1991.
- FERNANDES, L.; LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E.; REIS, M.M. *In vitro* wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.55, p.187-193, 2005.

- FERNAUD, J.R.H.; CARNICERO, A.; PERESTELO, F.; CUTULI, M.H.; ARIAS, E.; FALCON, M.A. Upgrading of an industrial lignin by using laccase produced by *Fusarium proliferatum* and different laccase-mediator systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.40-48, 2006.
- FERRAZ, A.; BAEZA, J.; DURÁN, N. Softwood biodegradation by an ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 strain). **Letters of Applied Microbiology**, v.13, p.82-86, 1991.
- FERRAZ, A.; DURÁN, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Biodegradation**, v.6, p.265-274, 1995.
- FERRER, I.; ESPOSITO, E.; DURÁN, N. Lignin peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat-denaturation, kinetics and pH stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.402-406, 1992.
- FULTHORPE, R.R.; ALLEN, D.G. A comparison of organochlorine removal from bleached Kraft pulp and paper-mill effluents by dehalogenating *Pseudomonas*, *Ancylobacter* and *Methylobacterium* Strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.782-789, 1995.
- GIANFREDA, L.; RAO, M.A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.339-354, 2004.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, v.24, p.23-63, 1990.
- HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v.52, p.2-8, 2006.
- HIRATSUKA, N.; OYADOMARI, M.; SHINOHARA, H.; TANAKA, H.; WARIISHI, H. Metabolic mechanisms involved in hydroxylation reactions of diphenyl compounds by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.241-246, 2005.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.454-466, 2002.
- IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v.3, p.1-19, 2004.
- JELLISON, J.; JASALAVICH, C. A review of selected methods for the detection of degradative fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.46, p.241-244, 2000.
- KANEKO, S.; YOSHITAKE, K.; ITAKURA, S.; TANAKA, H.; ENOKI, A. Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood, crystalline cellulose, and a lignin-related compound of accumulation of oxalic acid in cultures of brown-rot fungi. **Journal of Wood Science**, v.51, p.262-269, 2005.
- KATASE, T.; BOLLAG, J.M. Transformation of trans-4-hydroxycinnamic acid by a laccase of the fungus *Trametes versicolor*: its significance in humidification. **Soil Science**, v.151, p.291-296, 1991.
- KHINDARIA, A.; BARRY, O.P.; AUST, S.O. Lignin peroxidase can also oxidize manganese? **Biochemistry**, v.34, p.7773-7779, 1995.
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.465-505, 1987.
- KOVACS, T.; GIBBONS, S.; O'CONNOR, B.; MARTEL, P.; PAICE, M.; NAISH, V.; VOSS, R. Summary of case studies investigating the causes of pulp and paper mill effluent regulatory toxicity. **Water Quality Research Journal of Canada**, v.39, p.93-102, 2004.
- KULYS, J.; VIDZIUNAITE, R. Kinetics of laccase-catalysed TEMPO oxidation. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.37, p.79-83, 2005.
- KUMAR, A.G.; SEKARAN, G.; KRISHNAMOORTHY, S. Solid state fermentation of Achras zapota lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v.97, p.1521-1528, 2006.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLO, M.H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.169, p.247-250, 1984.
- LEE, K.H.; WI, S.G.; SINGH, A.P.; KIM, Y.S. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. **Journal of Wood Science**, v.50, p.281-284, 2004.
- LEE, S.H.; KONDO, R.; SAKAI, K. Treatment of Kraft Bleaching Effluents by Lignin-Degrading Fungi. Treatment by Newly Found Fungus Ks-62 Without Additional Nutrients. **Mokuzai Gakkaishi**, v.10, p.612-619, 1994.
- LEONOWICZ, A.; CHO, N.S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v.41, p.185-227, 2001.
- LISS, S.N.; ALLEN, D.G. Microbiological study of a bleached Kraft pulp mill aerated lagoon. **Journal of Pulp and Paper Science**, v.18, p.216-221, 1992.

- LOZOVAYA, V.V.; LYGIN, A.V.; ZERNOVA, O.V.; LI, S.; WIDHOLM, J.M.; HARTMAN, G.L. Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*, v.90, p.77-82, 2006.
- MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURAN, N. Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.256, p.20-26, 1999.
- MACHUCA, A.; DURAN, N. Optimization of some parameters influencing *Thermoascus aurantiacus* growth: Effects of lignin-related compounds. *Journal of Industrial Microbiology*, v.16, p.224-229, 1996.
- MACHUCA, A.; DURÁN, N. Phenoloxidase production and wood degradation by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.43, p.37-44, 1993.
- MANKOWSKI, M.; MORRELL, J.J. Patterns of fungal attack in wood-plastic composites following exposure in a soil block test. *Wood and Fiber Science*, v.32, p.340-345, 2000.
- MARTINEZ, A.T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUENAS, F.J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLEN, F.; MARTINEZ, M.J.; GUTIERREZ, A.; DEL RIO J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, v.8, p.195-204, 2005.
- MELO, P.S.; FABRIN-NETO, J.B.; DE MORAES, S.G.; ASSALIN, M.R.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the Algae *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere*, v.62, p.1207-1213, 2006.
- MERSTEN, T.; JONG, Y.; DE FIELD J.A.A. Manganese regulation of veratryl alcohol in white-rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1881-1887, 1995.
- MICHEL Jr., F.C.; DASS S.B.; GRULKE, E.A.; REDDY, C.A. Role of manganese peroxidase and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of Kraft plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.2368-2375, 1991.
- MINUSSI, R.C.; PASTORE, G.M.; DURAN, N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v.13, p.205-216, 2002.
- ODENDAHAL, S. Environmental protection and consumer demands: a review of trends and impacts. *Pulp and Paper Canada*, v.95, p.30-34, 1994.
- ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. *Biotechnology Advance*, v.11, p.179-198, 1993.
- OSÉS, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodegradation & Biodegradation*, v.57, p.129-135, 2006.
- OVIEDO, C.; CONTRERAS, D.; FREER, J.; RODRIGUEZ, J. Degradation of Fe(II)-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) complex by a catechol-driven Fenton reaction. *Fresenius Environmental Bulletin*, v.12, p.1323-1327, 2003b.
- OVIEDO, C.; CONTRERAS, D.; FREER, J.; RODRIGUEZ, J. A screening method for detecting iron reducing wood-rot fungi. *Biotechnology Letters*, v.25, p.891-893, 2003a.
- PANDEY, K.K.; PITMAN, A.J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodegradation & Biodegradation*, v.52, p.151-160, 2003.
- PEREIRA, D.E.D.; DEMUNER, B.J.; BERTOLUCCI, F.L.G.; DA SILVA, C. The influence of the variability of lignin characteristics of eucalypt species in delignification rate of wood pulping process In: **BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS**, 4., Recife, 1996. Proceedings. v.5, p.39-44, 1995.
- PIONTEK, K. New insights into lignin peroxidase. *Indian Journal of Chemistry Section A-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry*, v.41, p.46-53, 2002.
- POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. Treatment of pulp and paper mill wastewater - a review. *Science of the Total Environment*, v.333, p.37-58, 2004.
- POULUS, T.L.; PATTERSON, W.R.; SUNDARAMOORTHY, M. The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidase: The role of non-haem material on the catalytic mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, v.23, p.228-232, 1995.
- RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASIL'CHENKO, L.G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.40, p.1-17, 2004.
- RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.20, p.389-393, 2004.
- RODRIGUEZ, J.; CONTRERAS, D.; OVIEDO, C.; FREER, J.; BAEZA, J. Degradation of recalcitrant compounds by catechol-driven Fenton reaction. *Water Science and Technology*, v.49, p.81-84, 2004.

- RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; DE MELLO, M.P. Role of metals in wood biodegradation. **Wood Deterioration and Preservation ACS Symposium Series**, v.845, p.154-174, 2003.
- SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; SONG, M.H.; CHAE, K.S. Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Fomes lividus* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.523-526, 2002.
- SEPULVEDA, M.S.; QUINN, B.P.; DENSLAW, N.D.; HOLM, S.E.; GROSS, T.S. Effects of pulp and paper mill effluents on reproductive success of largemouth bass. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, p.205-213, 2003.
- SINGH, A.P.; SCHMITT, U.; MOLLER, R.; DAWSON, B.S.W.; KOCH, G. Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. **Wood Science and Technology**, v.40, p.16-25, 2006.
- SOARES, C.H.L.; DURAN, N. Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained in E-1-pulp bleaching effluent by fungal treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.95, p.35-149, 2001.
- SOARES, C.H.L.; DURAN, N. Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E-1 effluent by *Trametes villosa*. **Environmental Technology**, v.19, p.883-891, 1998.
- SOLAR, R.; KURJATKO, S.; LIPTAKOVA, E.; MAMONOVA, M. Alterations of beech wood (*Fagus sylvatica* L.) physical properties in the course of degradation by selected white-rot fungi. **Wood Research**, v.48, p.1-14, 2003.
- SUVILAMPI, J.E.; RINTALA, J.A. Pilot-scale comparison of the rophilic aerobic suspended carrier biofilm process and activated sludge process in pulp and paper mill effluent treatment. **Water Science and Technology**, v.50, p.95-102, 2004.
- TORTELLA, G.R.; DIEZ, M.C.; DURAN, N. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. **Critical Reviews in Microbiology**, v.31, p.197-212, 2005.
- TOTH, I.K.; BELL, K.S.; HOLEVA, M.C.; BIRCH, P.R.J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.17-30, 2003.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v.72, p.169-183, 2000.
- TUOR, O.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v.41, p.1-17, 1995.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v.22, p.161-187, 2003.
- WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.291-316, 2006.
- WU, J.; XIAO, Y.Z.; YU, H.Q. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. **Bioresource Technology**, v.96, p.1357-1363, 2005.

Biodegradação de Corantes Têxteis

**Priscila Maria Dellamatrice¹, Regina Teresa Rosim Monteiro¹ e
Doralice de Souza Luro Balan²**



Foto: I.S. Melo

I. Introdução

Os corantes e pigmentos são substâncias empregadas pelo homem há mais de 20 mil anos para a coloração de alimentos, couro, lã, materiais têxteis naturais e sintéticos, cosméticos, plásticos, papel etc. São retidas por adsorção física, formações de sais, soluções, retenção mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes.

Os corantes podem ser substâncias naturais ou compostas sintéticas; para ter utilidade têxtil são necessárias três características: cor, afinidade com a fibra e solidez aos agentes a que o artigo têxtil será submetido após o tingimento, como luz, peróxidos etc (GOMES, 2001).

Tendo em vista que corantes, pigmentos e branqueadores ópticos são compostos complexos, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química - alguns são misturas de vários compostos e outros não possuem estrutura química definida. Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, preferindo-se utilizar os nomes comerciais. Para identificar os mesmos corantes, comercializados com diferentes nomes, utiliza-se o Colour Index (CI), publicação da American Association of Textile Colorists and Chemists (AATCC) e da British Society of Dyers and Colorists, que contém uma lista organizada de nomes e números para designar os diversos tipos destes corantes (ABIQUIM, 2005).

Em sentido amplo, o termo corante designa toda e qualquer substância que dá cor, colore, tinge, pinta. Em química, corante denomina apenas as substâncias de caráter aromático, capazes de colorir irreversivelmente um substrato-suporte.

Em meados no século XIX surgiu a patente e a indústria de malva (púrpura de Tiro), primeiro corante orgânico obtido por Perkin em seu laboratório caseiro em 1856. No fim do século XIX, fabricantes de **corantes sintéticos** estabeleceram-se na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, suprindo as necessidades das indústrias que, na época, fabricavam tecidos, couro e papel. Nos anos de 1994 e 1995, as grandes corporações implantaram unidades fabris próprias ou em parcerias com fabricantes locais em diversos países asiáticos, como China, Índia e Indonésia (ABIQUIM, 2005).

Há duas formas de classificação dos corantes: a primeira é pela constituição química, de acordo com os grupos cromóforos ou unidades de cor da molécula, a segunda é baseada na aplicação ou uso final do corante. Para Gomes (2001), temos várias classificações de corantes, seja pelos grupos cromóforos ou afinidade às fibras:

- *Os ácidos*: são aniônicos e solúveis em água; aplicam-se às fibras de nylon, seda, acrílico e lã. Em sua molécula há grupos químicos sulfônicos ou carboxílicos; quimicamente consistem de compostos azo, xanteno, antraquinonas e outros.
- *Os básicos*: são catiônicos, solúveis em água e aplicam-se em acrílicos, nylon, poliésteres; são azocorantes, antraquinona, metano, oxazina, acridina e outros.

- *Os reativos:* ligam-se covalentemente com as fibras de algodão, nylon, lã e com grupo compatível hidroxila da celulose. De estrutura química simples são azo, antraquinona e ftalocianina.
- *Os dispersos:* são aniônicos e praticamente insolúveis em água. São utilizados em fibras de poliéster, nylon, diacetato de celulose e acrílicas.
- *Os sulfurosos:* após banho de redução alcalina com sulfato de sódio, são aplicados em algodão. É um grupo pequeno, contudo muito empregado por seu baixo custo.
- *Os a cuba:* aplicam-se em fibras celulósicas como sais leuco-solúveis, após redução em banho alcalino; seguindo-se a exaustão da fibra são reoxidados para a forma ceto-insolúvel. As principais classes são antraquinona e indigóides.

Para as fibras celulósicas, como o algodão e o rayon, são aplicados os corantes reativos, diretos, azóicos, à tina e sulfurosos. No caso das fibras sintéticas, deve-se distinguir entre as fibras e os corantes aplicados, principalmente no caso de: Poliéster – corantes dispersos; Acrílicos – corantes básicos; e Nylon (poliamida) – corantes ácidos. Restam, ainda, fibras menos importantes no mercado brasileiro, como a seda para a qual é aplicado corantes reativos e a lã que recebe corantes ácidos e reativos.

Outros critérios, além da afinidade por uma certa fibra têxtil, influenciam na aplicação de um determinado corante, como o processo de tingimento. Em sua maioria, esses processos podem ser divididos em categorias (contínuo, semicontínuo e por esgotamento), o que define a escolha do corante adequado (LANGE *et al.*, 2005; ROSA, 2003; SANTOS, 2003). São também fatores decisivos para a seleção do corante adequado as características técnicas que se quer atingir em matérias de solidez como, por exemplo, à luz, à fricção, ao suor etc.

A utilização de corantes no Brasil concentra-se, principalmente, nos corantes reativos para fibras celulósicas, que hoje respondem por 57% do mercado, seguidos pelos corantes dispersos com 35%, poliamida com 3% e acrílico com 2% (ABIQUIM, 2005).

Pelo Colour Index os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos, segundo os critérios das classes químicas e em 20 tipos (Tabela 1), além de algumas subdivisões, do ponto de vista das aplicações (Tabela 2). Na Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), estão classificados nas posições 3204; 3205; 3206 e 3207.

No processo de enobrecimento têxtil para atender a demanda do consumidor, moda e tendências de mercado ocorre o uso de corantes, pigmentos e branqueadores ópticos. Os pigmentos têm a característica funcional de somente fornecer cor ao sistema. Por esse motivo, sua aplicação é extremamente difundida nos diferentes materiais e substratos. São materiais orgânicos sintéticos, obtidos por meio de sínteses químicas, partindo-se do petróleo ou carvão. Diferentemente de corantes ou pigmentos, que incorporam a cor ao substrato tratado, **branqueadores ópticos** ou agentes de **branqueamento fluorescentes** que conferem o “branco puro” ou “branco-neve” são compostos orgânicos incolores ou pouco coloridos que, em solução ou aplicados a um substrato, absorvem luz, na região próxima ao ultravioleta do espectro

TABELA 1. Classificação pelo Colour Index segundo o substrato a ser tingido.

Classe	Principais campos de aplicação
Branqueadores ópticos	Detergentes, fibras naturais, fibras artificiais, fibras sintéticas, óleos, plásticos, sabões, tintas e papel
Corantes	
A Cuba Sulfurados	Fibras naturais e fibras artificiais
À Tina	Fibras naturais
Ácidos	Alimentos, couro, fibras naturais, fibras sintéticas, lã e papel
Ao Enxofre	Fibras naturais
Azóicos	Fibras naturais, fibras sintéticas
Básicos	Couro, fibras sintéticas, lã, madeira e papel
Diretos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Dispersos	Fibras artificiais e fibras sintéticas
Mordentes	Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e fibras sintéticas
Reativos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Solventes	Ceras, cosméticos, gasolina, madeira, plásticos, solventes orgânicos, tintas de escrever e vernizes
Pigmentos Orgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamparia têxtil, plásticos
Pigmentos Inorgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamparia têxtil, plásticos

TABELA 2. Classificação pelo Colour Index: de materiais corantes por aplicação.

Classes	
Acridina	Básicos, pigmentos orgânicos
Aminoacetona	À tina, mordentes
Antraquinona	Ácidos, mordentes, à tina, dispersos, azóicos, básicos, diretos, reativos, pigmentos orgânicos
Ao enxofre	Enxofre, a cuba
Azina	Ácidos, básicos, solventes, pigmentos orgânicos
Azo	Ácidos, diretos, dispersos, básicos, mordentes, reativos
Azóico	Básicos, naftóis
Bases de oxidação	Corantes especiais para tingimento de pelo, pelegos, cabelos
Difenilmetano	Ácidos, básicos, mordentes
Estilbeno	Diretos, reativos, branqueadores ópticos
Ftalocianina	Pigmentos orgânicos, ácidos, diretos, azóicos, a cuba, reativos, solventes
Indamina e Indofenol	Básicos, solventes
Indigóide	À tina, pigmentos orgânicos
Metina e Polimetina	Básicos, dispersos
Nitro	Ácidos, dispersos, mordentes
Nitroso	Ácidos, dispersos, mordentes
Oxazina	Básicos, mordentes, pigmentos orgânicos
Quinolina	Ácidos, básicos
Tiazina	Básicos, mordentes
Tiazol	Branqueadores ópticos, básicos, diretos
Triarilmelano	Ácidos, básicos, mordentes
Xanteno	Ácidos, básicos, mordentes, branqueadores ópticos, solventes

(340-380 nm), e reemitem a maior parte da energia absorvida como luz fluorescente violeta-azulada, na região visível (400-500 nm). Os primeiros branqueadores óticos eram fabricados a base de cumarina, mas atualmente os principais tipos de branqueadores óticos usados industrialmente são derivados estilbênicos, obtidos pela condensação de cloreto cianúrico com ácido diamino-estilbeno-dissulfônico, seguido de condensação sucessiva com outras aminas. Outros tipos são derivados de distirilobifenila, de benzoxazol-tiofenina etc.

Os branqueadores óticos representam atualmente, mais de 2,5 mil marcas, representando mais de 200 produtos, pertencentes a mais de 15 grupos com unidades químicas. O consumo mundial é estimado em mais de 200 mil toneladas, distribuídas entre as seguintes principais aplicações: Detergentes para lavagem doméstica 40%, Papel 30%, Têxtil 25%, Fibras e plásticos 5%.

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, gerando efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica e elevado teor de sais inorgânicos. Esta condição descrita, resulta em enorme dificuldade para o gerenciamento ambiental dos efluentes, quer sejam gerados pelas emissões ou descargas dos processos de rotina, pelo descarte de resíduos do processo, embalagens usadas e mesmo por emissões acidentais (BALAN, 2002; YUZHU & VIRARAGHAVAN, 2001). Dentro de vários setores industriais, os usuários e produtores de corantes estão se confrontando dia-a-dia com questões sobre saúde, segurança e proteção ao meio ambiente com o uso e manuseio desse grupo de produtos químicos. Nos efluentes líquidos a presença do corante é de fácil percepção visual, atraindo atenção à necessária proteção ambiental e alternativas de degradação e minimização de toxicidade (ROSOLEN *et al.*, 2004).

Embora atualmente os corantes representem menos de 1% do total de venda de químicos orgânicos no mundo, esta medida não fornece o grau de importância dos corantes na vida cotidiana. Aproximadamente 10.000 corantes sintéticos são usados como insumos industriais especialmente na indústria têxtil e tinturarias (ZAMORA *et al.*, 2002). A preocupação com a estética e qualidade do ambiente atingido por efluentes coloridos leva à busca das mais variadas alternativas de descoloração, quer sejam biológicas, físicas, químicas ou fotoeletroquímicas (ZAMORA & LIMA, 2005).

Novas classes de corantes têm surgido, visando atender as necessidades e exigências atuais do mercado em relação ao tingimento de novos tipos de fibras químicas. Isto agrava um problema já existente que é o do efluente industrial da manufatura dos corantes ou de indústrias que deles se utilizam, já que são considerados potencialmente tóxicos aos organismos vivos (MACEDO & SILVA, 2002).

Os resíduos da indústria têxtil se caracterizam por sua baixa degradabilidade sendo considerados um dos mais difíceis de serem tratados. A origem sintética e estrutura molecular complexa dos corantes dificultam a degradação, pois os organismos presentes na natureza não possuem enzimas específicas para sua degradação. Assim, estes resíduos não têm um método adequado de tratamento, sendo que, efluentes tratados não eficientemente têm sido descartados no ambiente contendo ainda alta carga poluidora levando a degradação dos ambientes aquáticos.

Características desejáveis para o processo de tingimento tornam essas moléculas mais difíceis de serem degradadas, como: brilho, cor visível a baixas concentrações e estabilidade à luz e a ataques químicos. Corantes como antraquinonas ($C=O$), as quais possuem estrutura aromática fundida e corantes básicos, que possuem cores brilhantes e intensas, são bastante resistentes à degradação. Segundo Robinson *et al.* (2001), corantes aniônicos, como os reativos e ácidos, são muito solúveis e tendem a passar inalterados pela estação de tratamento, principalmente se contém também grupos azo, os quais têm forte afinidade por elétrons, o que confere a estas substâncias proteção contra enzimas oxigenases.

Cerca de 15% dos corantes empregados no processo de coloração são encontrados no efluente como resultado da incompleta fixação dos corantes durante a etapa de tingimento (KANDELBAUER & GUBITZ, 2001). Métodos convencionais de tratamento como os lodos ativados têm demonstrado baixa eficiência na remoção da cor, sendo inclusive sugerido que a maior parte dos corantes são removidos do efluente durante o processo de decantação indo se acumular no lodo que é o subproduto da degradação do efluente (MEYER, 1978).

Na maioria dos estudos, tem se verificado especificidade entre produtos e microrganismos, influenciada, principalmente, pela estrutura química da molécula. Por exemplo, Spadaro *et al.* (1992) encontraram maiores taxas de degradação na presença de grupos hidroxila, amina, acetamida e nitro ligados ao anel, enquanto grupos sulfonados e azo foram mais resistentes (PAGGA & BROWN, 1986). Nigam *et al.* (1996) sugerem que corantes azo contendo grupos amino e hidroxila são degradados em maior extensão que corantes contendo grupos metil, metoxi, sulfo e nitro. A degradação também foi correlacionada com o número de ligações azo ($N=N$). Corantes sulfonados são mais difíceis de atravessarem membranas celulares e assim, são mais resistentes à degradação. Porém, corantes sulfonados podem ser degradados mais facilmente que carboxílicos devido à sua maior eletronegatividade que faz com que eles recebam elétrons mais facilmente. Em geral, corantes com estrutura mais simples e peso molecular menor exibem maiores taxas de degradação, enquanto moléculas altamente substituídas com elevado peso molecular são mais difíceis de degradar (PEARCE *et al.*, 2003).

Também fatores do meio influenciam a degradação, principalmente presença de carbono, nitrogênio e oxigênio, nutrientes, tempo de incubação, pH, temperatura etc (FU & VIRARAGHAVAN, 2001).

2. Métodos de tratamento de efluentes têxteis

Enquanto indústrias de grande porte dão preferência para processos biológicos de tratamento, indústrias de médio porte têm adotado sistemas de tratamento envolvendo métodos como a coagulação química, adsorção por carbono ativado e, menos freqüentemente ultrafiltração. Esses sistemas são não-destrutivos, assim o volume dos rejeitos é diminuído, porém a disposição das fases sólidas ficam sem solução.

2.1 Tratamento físico-químico

O sistema de coagulação utilizando polieletrolitos ou floculantes inorgânicos (sais de ferro e alumínio) seguido de separação por flotação ou sedimentação apresenta elevada eficiência na remoção de material particulado, porém a remoção de cor e compostos dissolvidos é deficiente (KUNZ & PERALTA, 2002; SELCUK, 2005). O resultado depende do tipo de corante, composição, concentração e fluxo de produção do rejeito. Para se obter alta eficiência utiliza-se um excesso de polieletrolitos que acrescenta um outro resíduo ao rejeito.

As técnicas de adsorção têm se baseado na remoção do corante através da passagem da amostra em carvão ativo ou outros materiais como lascas de madeira, turfa, bentonita etc (KARGI & OSMIHCE, 2004; ROBINSON *et al.*, 2001). Em geral, consistem em um método lento, não econômico, porém efetivo principalmente para rejeitos de menor volume. Uma desvantagem deste sistema é que a superfície química do carbono possui cargas positivas, o que restringe a adsorção de corantes catiônicos.

Processos de separação molecular fundamentados na utilização de membranas, como ultrafiltração e osmose reversa, são baseados na remoção de moléculas de corantes com dimensão suficientemente grande para serem retiradas pelo sistema. O sistema pode ser muito eficiente, porém o custo é alto e a limpeza de membranas problemática. Este sistema tem a grande vantagem de permitir o reuso da água no processo industrial. Alguns trabalhos tem revelado a alta eficiência deste processo (KIM *et al.*, 2004).

Outro processo utilizado é a ozonização, a qual promove a clivagem das moléculas através da ação oxidante do ozônio. A oxidação pode ocorrer de maneira direta através da reação do ozônio com as moléculas orgânicas, ou indireta através da reação da hidroxila que é gerada pela decomposição do ozônio. Wang *et al.* (2003) encontraram descoloração completa do corante Remazol Black 5, com redução na DQO e toxicidade e aumento na DBO sugerindo que um tratamento biológico poderia se utilizado associado.

Outros autores relatam elevada descoloração em sistema fotocatalítico através da exposição dos corantes à luz ultravioleta na presença de um semi-condutor, como TiO₂, o qual cria um meio altamente oxidante que leva a mineralização destes compostos (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1999; WANG, 2000).

A utilização de mais de um tipo de tratamento pode aumentar a eficiência do sistema, já que estes produtos não são degradados pelos sistemas biológicos convencionais. Assim, a combinação de tratamentos pode aumentar significativamente a degradação. Muitas indústrias tem utilizado o sistema físico-químico de precipitação-coagulação seguido de tratamento biológico por lodo ativado. O sistema tem apresentado alta eficiência com remoção de 80% da carga de corantes (KUNZ & PERALTA-ZAMORA, 2002).

2.2 Degradiação por bactérias

A degradação de efluentes têxteis é feita usualmente em sistemas aeróbios por bactérias, como o sistema de lodo ativado, porém este sistema tem apresentado baixa eficiência na degradação de corantes (FU & VIRARAGHAVAN, 2001). A

causa desta baixa degradação pode ser a falha em se isolar bactérias com capacidade para degradação destes compostos (PAGGA & BROWN, 1986), uma vez que a degradação de alguns corantes por linhagens isoladas de *Pseudomonas* e *Sphingomonas* tem sido documentada. Coughlin *et al.* (1999) encontraram uma espécie de *Sphingomonas* capaz de degradar vários corantes do grupo azo, dentre eles Orange II, Acid Orange 8 e Acid Orange 10 até 99% em 96h. A degradação foi correlacionada com a presença da estrutura 1-amino-2-naftol na molécula. Chen (2002) encontrou degradação do corante azo Reactive Black B por *Pseudomonas luteola*, através da quebra das ligações azo e formação de aminas (Figura 1). Keck *et al.* (2002) isolaram uma espécie de *Sphingomonas* capaz de utilizar mediadores oxi-redutores gerados durante metabolismo aeróbio de 2-naftalenosulfonate para aumentar em 20 vezes a habilidade para degradar o corante sulfonado Amaranth (Figura 2). Banat *et al.* (1997) isolaram um consórcio de microrganismos termofílicos composto principalmente pela bactéria *Corynebacterium* que foi hábil para degradar corantes dos grupos azo, diazo, reativos e dispersos com porcentagens de descoloração variando de 70 a 99%.

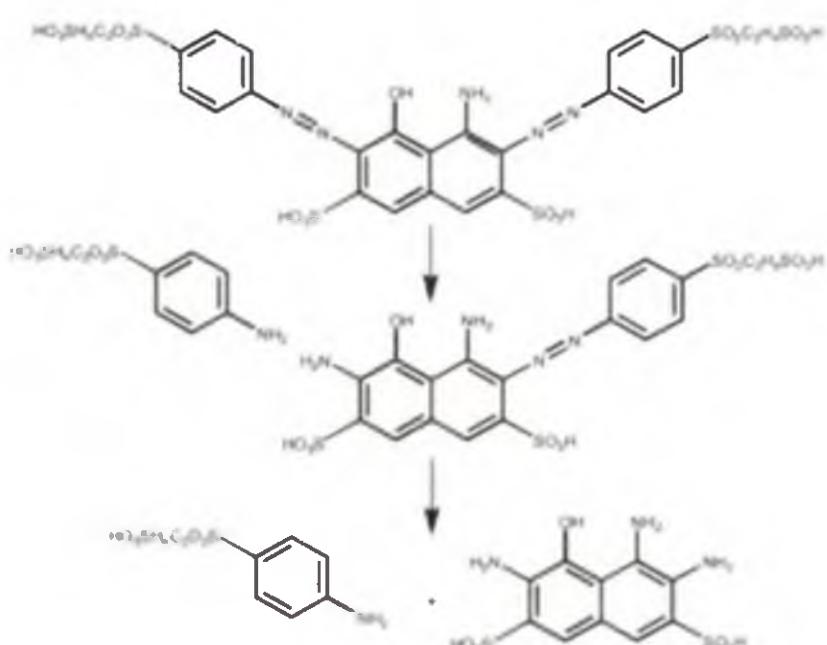


FIGURA 1. Descoloração do corante Reactive Black B por *Pseudomonas luteola* (CHEN, 2002).

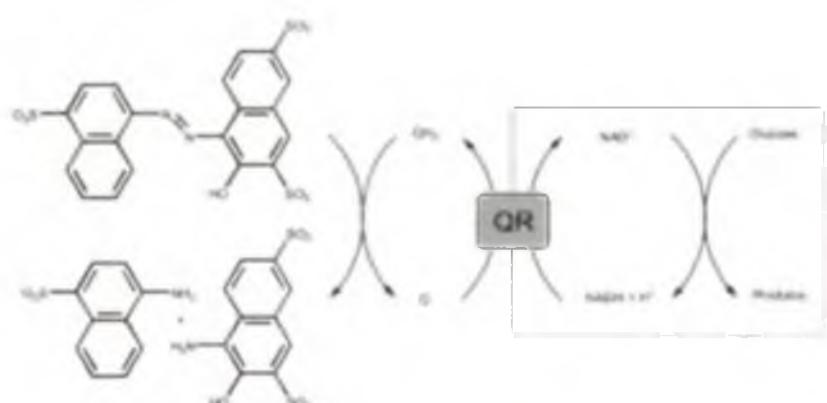


FIGURA 2. Mecanismo proposto para a degradação do corante Amaranth por *S. xenophaga* (KECK *et al.*, 2002).

Chang *et al.* (2001) estudaram a degradação do corante Reactive Red 22 por células de *Pseudomonas luteola* livres ou imobilizadas e encontraram degradação completa. Embora a degradação por células livres tenha sido mais rápida, células imobilizadas mostraram maior estabilidade a mudanças no pH e oxigênio, comum em sistemas de tratamento. Chang *et al.* (2004) inseriram a enzima azoredutase retirada de *Pseudomonas luteola* em *Escherichia coli* e encontraram 95% de descoloração do corante Reactive Red 22.

Buitrón *et al.* (2004) estudaram a degradação do corante azo Acid Red 151 em reator aeróbio preenchido com rocha vulcânica e encontraram descoloração de 99% e mineralização de 73%. Degradação anaeróbia também pode ter ocorrido no interior do material poroso. Corantes por serem moléculas complexas são freqüentemente degradados por consórcios de microrganismos e não por culturas puras (Nigam *et al.*, 1996). Desta forma, um microrganismo

inicia a quebra da molécula através de reações como oxidação, redução, hidroxilação, desalogenização, hidrólise, demetilação tornando-a suscetível à ação de outros organismos (RAJAGURU *et al.*, 2000). Degradação até a mineralização de corantes pertencentes aos grupos azo, diazo e reativos através de consórcio de bactérias foram relatadas por Nigam *et al.* (1996), Coughlin *et al.* (2002) & Khehra *et al.* (2005).

Embora alguns autores tenham encontrado degradação completa de corantes azo em meio anaeróbio (ISIK & SPONZA, 2005; RAZO-FLORES *et al.*, 1997), tem se verificado também a formação de aminas tóxicas, como sub-produtos da degradação, as quais são mutagênicas e cancerígenas (Van der ZEE *et al.*, 2001). A quebra da ligação azo (N=N), que é o principal passo na degradação, ocorre principalmente por azo-redutases que são enzimas de baixa especificidade. Estas aminas podem ser degradadas aerobicamente e vários trabalhos tem confirmado a degradação completa de corantes azo em sistemas anaeróbio-aeróbios (O'NEILL *et al.*, 2000; RAJAGURU *et al.*, 2000; SUPAKA *et al.*, 2004). Sponza & Isik (2005) encontraram degradação completa do corante azo Direct Red 28 em sistema anaeróbio-aeróbio com formação de benzidina, como intermediário, que foi degradada após tratamento aeróbio e a toxicidade reduzida. Libra *et al.* (2004) encontraram 65% de degradação do corante Reactive Black 5 (diazo, reativo e sulfonado) em sistema anaeróbio-aeróbio com formação de dois metabólitos na fase anaeróbia, *p*-ABHES e TAHNDS (Figura 3). Somente *p*-ABHES foi mineralizado na fase aeróbia. A toxicidade aumentou após o tratamento anaeróbio e foi parcialmente reduzida após o tratamento aeróbio. Segundo Lee & Pavlostathis (2004), toxicidade dos corantes Reactive Blue 4 e Reactive Blue 19 (antraquinonas) inibiram a atividade acidogênica e metanogênica impedindo a completa degradação em meio anaeróbio, porém Isik & Sponza (2004) observaram que os corantes bloqueiam os sítios ativos das enzimas e concluíram que a degradação anaeróbia é interrompida por inibição competitiva.

A adição de doadores de elétrons, como glicose ou acetato, pode estimular a clivagem redutiva das ligações azo. Segundo Haug *et al.* (1991), a glicose promoveria formação de redutores como NADH e FADH₂ para a degradação.

2.3 Fungos Basidiomicetos

Os fungos da podridão branca são degradadores naturais de lignina, celulose e hemicelulose. Tanto moléculas de lignina como alguns poluentes contêm compostos

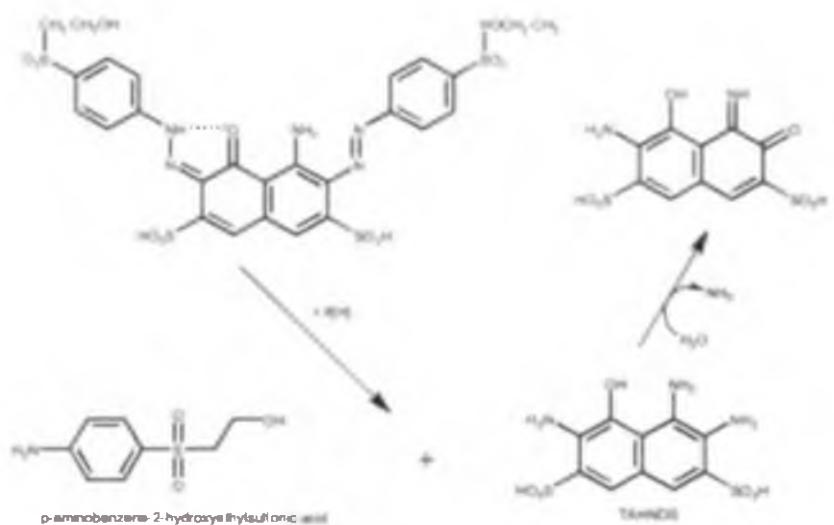


FIGURA 3. Degradação do corante Reactive Black 5 em sistema anaeróbio-aeróbio (LIBRA *et al.*, 2004).

fenólicos, diésteres e bifenilas e, assim, seu sistema enzimático tem sido estudado na degradação de outras moléculas recalcitrantes (BALAN & MONTEIRO, 2001). Os principais fungos envolvidos são *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus* sp., *Coriolus versicolor*, *Trametes versicolor* entre outros.

As enzimas responsáveis pela degradação destas moléculas são peroxidases como manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), lacases e fenol oxidases. Estas enzimas ligninolíticas são intra ou extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato sendo bastante interessantes para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis.

Esses fungos dividem-se em cinco grupos baseados na sua capacidade de produzir uma ou mais enzimas ligninolíticas. O gênero *Pleurotus* produz lacases e MnP mas não LiP (RODRÍGUEZ *et al.*, 1999), enquanto *Phanerochaete chrysosporium* é caracterizado por produzir principalmente LiP e insignificante quantidade de lacases.

A contribuição relativa de cada enzima (LiP, MnP ou lacase) para a descoloração de corantes pode ser diferente para cada fungo, indicando alguma seletividade na degradação. Foi encontrada correlação da descoloração com a enzima MnP (DOMINGUEZ *et al.*, 2001; MOLDES *et al.*, 2003; HARAZONA & NAKAMURA, 2005; BOER *et al.*, 2004; NOVOTNY *et al.*, 2004; ROSOLEN *et al.*, 2004; KAMIDA *et al.*, 2005) e com lacase (CHIVUKULA & RENGANATHAN, 1995; RODRÍGUEZ *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2003). Segundo Shrivastava *et al.*, (2005), corantes halogenados não são degradados por MnP.

Rodrigues *et al.* (1999), Ranzani (2002), Rosolen *et al.* (2004), Kamida *et al.* (2005), observaram descoloração/degradação completa de diversos corantes, efluentes e resíduo sólido por fungos do gênero *Pleurotus*. Porém, utilizando somente o extrato enzimático fúngico não foram observados a mesma degradação, indicando que há outros fatores envolvidos. A ação das enzimas ligninolíticas na degradação tem sido comprovada, porém o processo de degradação é complexo e envolve outros fatores como radicais mediadores, H₂O₂, produzidos pelo fungo.

Alguns compostos têm capacidade de induzir o sistema ligninolítico, dentre eles o álcool veratril, o qual é um metabólito produzido por diversos fungos e atua como restaurador da enzima LiP após sua ação oxidativa sobre o substrato, protegendo-a da inativação por excesso de H₂O₂. Segundo Heinfling *et al.* (1998), a atividade da LiP na ausência do álcool veratril foi de 1 a 12% menor que na presença deste indutor. A adição do surfactante Tween 80, também elevou a degradação de uma mistura de corantes azo e antraquinona por *Phanerochaete sordida* (HARAZONA & NAKAMURA, 2005).

Segundo alguns autores, a atividade ligninolítica pode ser estimulada em condições limitadas de nutrientes, principalmente nitrogênio (CRIPPS *et al.*, 1990; GLENN & GOLD, 1983; SPADARO *et al.*, 1992), ou adição de suplementos como glicose e asparagina.

Knapp *et al.* (1995) estudaram a degradação de 14 diferentes corantes por sete linhagens de fungos basidiomicetos, dentre elas *Phanerochaete chrysosporium*,

Piptoporus betulinus, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*. A degradação do corante Índigo Blue pelos fungos basidiomicetos *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pycnoporus sanguineus* foi estudada por Balan & Monteiro (2001). Houve especificidade de linhagens para os compostos e a descoloração foi correlacionada com a estrutura química da molécula. Martins *et al.* (2003) estudaram a degradação de 8 corantes azo por quatro fungos e encontrou que *Trametes versicolor* produziu as maiores porcentagens de degradação (76-100%). A análise dos metabólitos em GC-MS permitiu identificar os passos da degradação. Após a clivagem da ligação azo, houve a hidroxilação dos produtos e posterior formação de derivados de catecol, os quais são susceptíveis à clivagem do anel benzênico (Figura 4).

O mecanismo de degradação de corantes phthalocyanine-Cu por *Phanerochaete chrysosporium* foi proposto por Conneely *et al.* (2003). Primeiramente o átomo de Cu é removido e, em seguida, a estrutura phthalocyanine é quebrada (Figura 5). O mesmo mecanismo foi encontrado por Heinfling-Weidtmann *et al.* (2001) na degradação de Reactive Blue 15 e Reactive Blue 38 por *Bjerkandera adusta* (Figura 6).

2.4 Cianobactérias e algas

Cianobactérias são organismos procariotos, unicelulares, fotoautotróficos e em alguns casos fixadores de nitrogênio atmosférico. Sua habilidade em degradação de compostos orgânicos vem sendo utilizada, principalmente no tratamento terciário para remover nitrogênio e fósforo em estações de tratamento de esgotos e, por sua fácil manutenção poderia ser utilizada também para remover outros poluentes e metais.

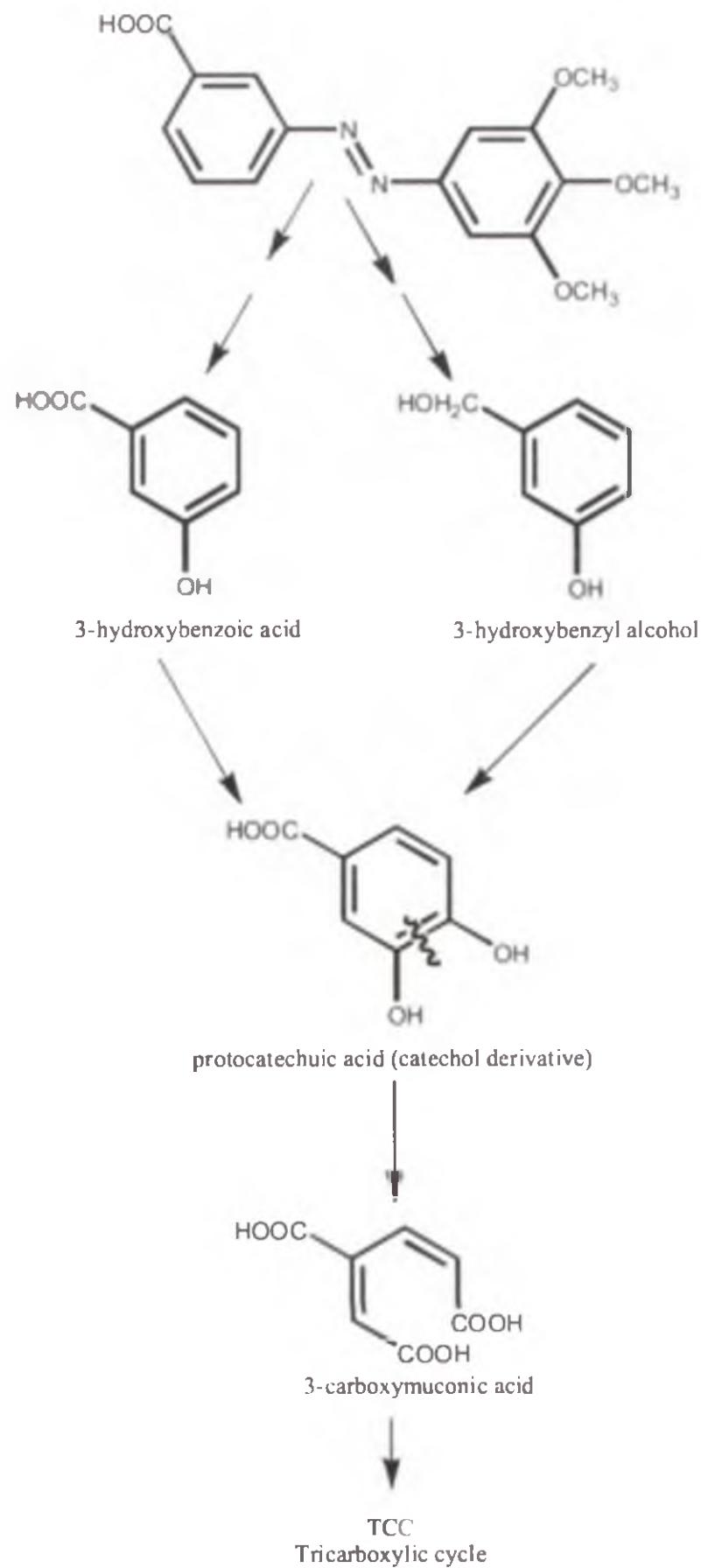


FIGURA 4. Mineralização de compostos azo por *Trametes versicolor* (MARTINS *et al.*, 2003).

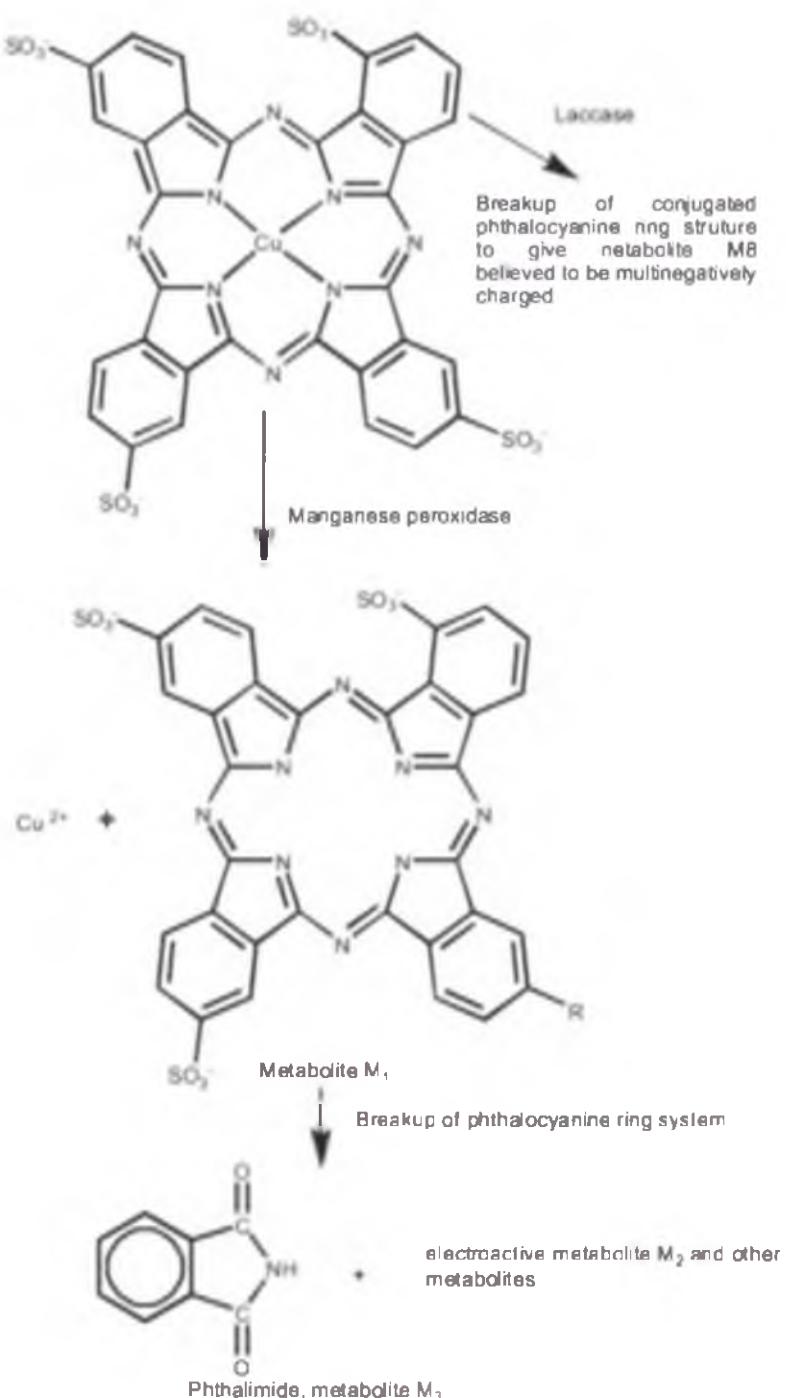


FIGURA 5. Degradação de Cu-phthalocyanine por *P. chrysosporium* (CONNEELY *et al.*, 2003).

Jinqui & Houtian (1992) estudaram a degradação de 30 corantes do grupo azo pelas algas *Chlorella pyreidosa* e *Chlorella vulgaris* e pela cianobactéria *Oscillatoria tenuis* e encontraram porcentagens de descoloração variando de 7 a 100% para *Chlorella vulgaris*. A degradação foi correlacionada com a estrutura química do composto, sendo que grupos amina e hidroxila foram mais facilmente degradados que grupos metil, metoxi, nitro e sulfonados. Shah *et al.* (2001) observaram descoloração acima de 90% para os corantes Acid Red, Acid Red 119 e Direct Black 155 pela cianobactéria *Phormidium valderianum*. A eficiência aumentou com pH acima de 11, muito comum nestes efluentes. A cianobactéria *Phormidium autumnale* foi capaz de descolorir e reduzir a toxicidade de efluente contendo corantes dos grupos antraquinona e indigóides (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2004).

2.5 Fitorremediação - planta raiz-forte

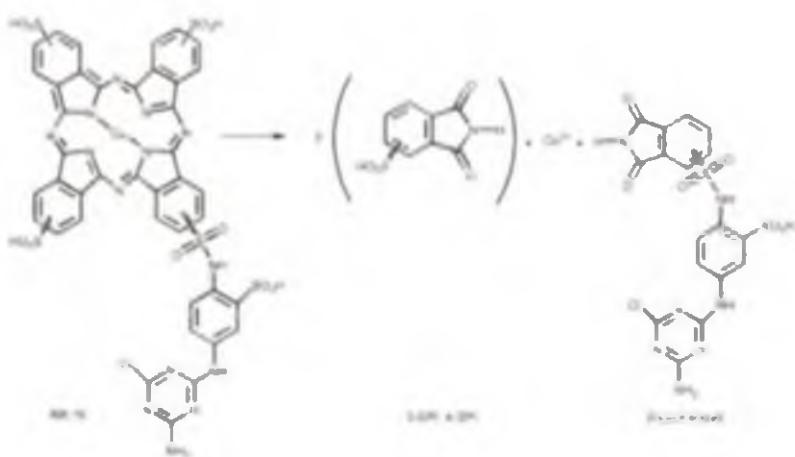


FIGURA 6. Degradação de Reactive Blue 15 por peroxidases do fungo *B. adusta* (HEINFLING-WEIDTMANN *et al.*, 2001).

Materiais contendo alto teor de enzimas, como a planta raiz-forte, têm sido testados na remediação de poluentes, principalmente resíduos sólidos. Os tubérculos desta planta contêm alto teor da enzima peroxidase (HRP), a qual catalisa reações envolvendo a transferência de hidrogênio de moléculas orgânicas para peróxidos formando água. Na presença de H₂O₂, a enzima forma um complexo que pode oxidar uma

variedade de doadores de elétrons formando água no final (Mesulam, 1982). Por causa da baixa especificidade deste complexo, pode promover a oxidação de uma grande variedade de poluentes orgânicos.

O uso da planta raiz-forte na degradação de corantes azo foi estudado por Pasti-Grigsby *et al.* (1992), que verificaram degradação de 6 dos 22 corantes testados com valores entre 3,91 e 30,68% de degradação. Ferreira-Leitão *et al.* (2003) observaram que somente 4,7% do corante Metileno Blue permaneceu na mistura após a reação com HRP. Foram relatadas também a degradação, por raiz-forte, dos corantes Sudam I, crystal Violet e Yellow 3 (STIBOROVÁ *et al.*, 1988; YESILADA, 1996 ; SPADARO & RENGANATHAN, 2004) e de aminas, as quais são conhecidos metabólitos de corantes azo (TONEGAWA, 2003). A reação promovida por estas enzimas é rápida e a maior parte da degradação de Remazol Blue foi encontrada dentro de 3 h por Bhunia *et al.* (2001). Dellamatrice & Monteiro (2005) obtiveram a completa descoloração do efluente e lodo da estação de Tratamento de esgoto da cidade de Americana, SP, que trata efluentes de 43 indústrias têxteis (3/4 do volume total) conjuntamente com o esgoto urbano. Utilizando 10% da raiz moída (p/v) o efluente foi descolorido em duas horas, e o resíduo sólido foi descolorido na proporção de 50% (p/p) após dois dias de incubação.

Extração e imobilização das enzimas em gel acrilamida mostrou aumento na eficiência da degradação, sendo que 79% do corante Acid Black foi degradado com a enzima imobilizada e apenas 67% com a enzima livre. A enzima imobilizada permitiu o reuso embora com menor eficiência (MOHAN *et al.*, 2005).

2.6 Toxicidade dos corantes

Segundo Bumpus (1995) a maior parte dos corantes não apresentam toxicidade elevada, sendo considerados mais tóxicos os básicos e diazo diretos. De 4.461 corantes testados somente 44 (1%) apresentaram LD₅₀ menor que 250 mg kg⁻¹, 314 (7%) tiveram LD₅₀ entre 250 e 2.000 mg kg⁻¹ e 434 (aproximadamente 9,7%) tiveram LD₅₀ entre 2.000 e 5.000 mg kg⁻¹.

Entretanto, os corantes à base de benzidina e aminas podem liberar estas substâncias como metabólitos, as quais são cancerígenas. Gottlieb *et al.* (2003), mostraram que a quebra da ligação azo em meio anaeróbio do corante Acid Orange 7 gerou compostos causadores de genotoxicidade, a qual foi relacionada com a produção do metabólito 1-amino-2-naftol. Estes corantes também podem ser reduzidos por microrganismos anaeróbios presentes no trato digestivo e assim serem potenciais causadores de câncer e outras desordens. Méndez-Paz *et al.* (2005), encontraram que o metabólito 1-amino-2 naftol, metabólito do Acido Orange 7, induziu a formação de tumores no sangue. Também o corante Amaranth foi carcinogênico para ratos. Outros efeitos adversos causados pelos corantes incluem as alergias rinopáticas, asmáticas e cutâneas. O corante comporta-se como hapteno, reage com a albumina do sangue e então, por ação como um antígeno gera IgEs, desencadeando os fenômenos alérgicos (SALEM, 1995).

Corantes contendo grupos amino, aquilamino ou acetilamino são propensos a sofrer oxidação através da hidroxilação das moléculas com a formação de grupos nitrenium (NH^+), o qual pode apresentar potencialidade mutagênica ou carcinogênica devido a interações com grupos nucleofílicos do DNA (GUARATINI & ZANONI, 2000). Outros corantes portadores de grupos reativos e cromóforos diazo sulfonados são configurados para reagirem fortemente com substâncias portadoras de grupos amina e hidroxila, presentes em todos os organismos vivos na forma de proteínas/enzimas, dentre outras. Corantes complexados com metais, principalmente o cromo, podem liberar este metal que é carcinogênico.

Oros *et al.* (2003) encontraram inibição do crescimento de bactérias por vários corantes, sendo que os mais hidrofóbicos foram os mais tóxicos, os quais se ligam a grupos hidrofóbicos nas células inibindo atividade enzimática e outras funções. Isto indica que os corantes podem ser tóxicos também para os microrganismos presentes nas Estações de Tratamento. *P. chrysosporium* mostrou ser sensível ao corante Malachite Green em concentrações acima de 64 μM . Em meio líquido o efeito tóxico foi maior, com efeito a 4 μM (PAPINUTTI & FORCHIASSIN, 2004). Dellamatrice *et al.* (2005) encontraram sinais de toxicidade pelo efluente da Estação de Tratamento de Americana, SP, contendo corantes dos grupos das antraquinonas e indigóides, para o fungo *Pleurotus ostreatus* através de análise em microscopia eletrônica, ocorrendo sinais de degeneração nas hifas e desagregação completa das células.

O efluente de uma indústria têxtil contendo corantes azo apresentou potencial altamente mutagênico pelo Teste de Ames, mostrando que estes corantes não foram degradados pelo sistema de tratamento por Lodo Ativado realizado pela Indústria. Análises realizadas no Ribeirão dos Cristais, onde estes efluentes são despejados, também apresentaram potencial mutagênico 5-17 vezes maior que o controle (UMBIZEIRO *et al.*, 2004). Segundo os autores, estes corantes ou seu metabólitos podem se ligar ao cloro utilizado nas estações de tratamento de água formando compostos nitroaromáticos halogenados, altamente mutagênicos.

Corantes dos grupos azo, trifenilmetano, antraquinona, heterocíclicos, oxazina e metina/polimetina foram degradados e perderam a potencial genotoxicidade após tratamento com reações Foto-Fenton e enzimas ligninases (CHOUDHARY *et al.*, 2004).

O lodo têxtil antes e após tratamento por compostagem foi estudado por Araújo & Monteiro (2005) quanto a fitotoxicidade para soja e trigo. Os resultados indicaram que a compostagem é capaz de biodegradar e remover a toxicidade destes resíduos, com efeito tóxico sendo bastante reduzido após o tratamento.

Referências

- ABIQUIM. Disponível em: <www.abiquim.org.br>. Acesso em: 25 jul. 2005.
- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola*, v.62, p.286-290, 2005.
- BALAN, D.S.L. A industria têxtil e o meio ambiente. Tecnologia limpa e controle ambiental. *Química Têxtil*, v.66, p.26-31, 2002.
- BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, v.89, p.141-145, 2001.

- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. The isolation of thermophilic bacterial cultures capable of textile dyes decolorization. *Environment International*, v.23, p.547-551, 1997.
- BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANIKAR, P.P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*, v.72, p.562-567, 2001.
- BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZA, E.G.M.; PERALTA, R.M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*, v.94, p.107-112, 2004.
- BUITRÓN, G.; QUEZADA, M.; MORENO, G. Aerobic degradation of the azo dye Acid Red 151 in a sequencing batch biofilter. *Bioresource Technology*, v.92, p.143-149, 2004.
- BUMPUS, J.A. Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V.P. *Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds*. Amsterdam: Elsevier Science, 1995. p.157-177.
- CHANG, J.; CHOU, C.; CHEN, S. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*, v.36, p.757-763, 2001.
- CHANG, J.S.; CHEN, B.Y.; LIN, Y.S. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Bioresource Technology*, v.91, p.243-248, 2004.
- CHEN, B.Y. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. *Process Biochemistry*, v.38, p.437-446, 2002.
- CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.12, p.4374-4377, 1995.
- CHOUDHARY, E.; CAPALASH, N.; SHARMA, P.S. Genotoxicity of degradation products of textile dyes evaluated with rec-assay after photoFenton and lignine treatment. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v.23, p.40-48, 2004.
- CONNELLY, A.; SMYTH, N.F.; McMULLAN, G. Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by a capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam v.451, p.259-270, 2003.
- COUGHLIN, M.E.; KINKLE, B.K.; BISHOP, P.L. Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm. *Chemosphere*, v.46, p.11-19, 2002.
- COUGHLIN, M.E.; KINKLE, B.K.; BISHOP, P.L. Degradation of azo dyes containing aminonaphthol by *Sphingomonas* sp. strain 1 CX. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.341-346, 1999.
- CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.1114-1118, 1990.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R.T.R.; KAMIDA, H.M.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M. L.; BLAISE, C. Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, p.1363-69, 2005.
- DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization and Toxicity of Municipal waste by Horseradish (*Cochlearia armoracia*). *Química Nova*, v.29, p.419-421, 2006.
- DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R. Toxicidade e degradação de efluentes contendo corantes, por microrganismos. In: CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE, 2004, Paulínia. *Anais*, p.72-73.
- DOMINGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Process Biochemistry*, v.37, p.549-554, 2001.
- FERREIRA-LEITÃO, V.S.; SILVA, J.G.; BON, E.P.S. Methylene Blue and Azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.42, p.213-221, 2003.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewater: a review. *Bioresource Technology*, v.79, p.251-262, 2001.
- GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p.1741-1747, 1983.
- GOMES, J.R. *Estrutura e propriedades dos corantes*. Braga: Universidade do Minho, 2001.
- GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*, v.101, p.49-56, 2003.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. *Química Nova*, v.23, p.71-78, 2000.
- HARAZONA, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere*, v.59, p.63-68, 2005.
- HAUG, W.; SCHMIDT, A.; NORTEMANN, B.; HEMPEL, D.C.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H. J. Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.3144-3149, 1991.

- HEINFLING, A.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngi* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, p.2788-2793, 1998.
- HEINFLING-WEIDTMANN, A.; REEMTSMA, T.; STORM, T.; SZEWZYK, U. Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*. v.203, p.179-183, 2001.
- ISIK, M.; SPONZA, D.T. A batch kinetic study on decolorization and inhibition of Reactive Black 5 and Direct Brown 2 in an anaerobic mixed culture. *Chemosphere*. v.55, p.119-128, 2004.
- ISIK, M.; SPONZA, D. T. Effects of alkalinity and co-substrate on the performance of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor through decolorization of Congo Red azo dye. *Bioresource Technology*. v.96, p.633-643, 2005.
- JINQUI, L.; HOUTIAN, L. Degradation of azo dyes by algae. *Environmental Pollution*. v.75, p.273-278, 1992.
- KAMIDA, H.M.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E. D.; DURRANT, L. R. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor caju*. *Química Nova*. v.28, p.629-632, 2005.
- KANDELBAUER, A.; GUBITZ, G.M. Current strategies for enzymatic and microbial treatments of textile effluents. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA TÊXIL. 2001, Blumenau, S.C. Anais... p.83-99.
- KARGI, F.; OZMIHCI, S. Biosorption performance of powdered activated sludge for removal of different dyestuffs. *Enzyme and Microbial Technology*. v.35, p.267-271, 2004.
- KECK, A.; RAU, J.; REEMTSMA, T.; MATTES, R.; STOLZ, A.; KLEIN, J. Identification of quinoid redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6. *Applied and Environmental Microbiology*. v.68, p.4341-4349, 2002.
- KHEHRA, M.S.; SAINI, H.S.; SHARMA, D.K.; CHADHA, B.S.; CHIMNI, S.S. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*. v.67, p.55-61, 2005.
- KIM, T.H.; LEE, Y.; YANG, J.; LEE, B.; PARK, C.; KIM, S. Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. *Desalination*. v.168, p.287-293, 2004.
- KNAPP, J.S.; NEWBY, P.S.; REECE, L.P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. v.17, p.664-668, 1995.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*. v.25, p.78-82, 2002.
- LANGE, C.R.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.U. Estudo das condições operacionais do processo de tingimento de fibra mista acrílico/algodão em bobina cruzada. *Química Têxtil*. v.73, p.12-17, mar. 2005.
- LEE, Y.H.; PAVLOSTATIS, S.G. Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions. *Water Research*. v.38, p.1838-1852, 2004.
- LIBRA, J.A.; BORCHERT, M.; VIGELAHLN, L.; STORM, T. Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. *Chemosphere*. v.56, p.167-180, 2004.
- MACEDO, J.C.; SILVA, E.P. Inovações na estamparia com pigmentos. *Química Têxtil*, v.69, p.28-38, dez. 2002.
- MARTINS, M.A.M.; LIMA, N.; SILVESTRE, A.J.D.; QUEIROZ, M. J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*. v.52, p.967-973, 2003.
- MÉNDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Anarobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. v.36, p.264-272, 2005.
- MESULAM, M.M. *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. New York: John Wiley & Sons, 1982.
- MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A.W.A. (Ed.). *Ecology of pesticides*. New York: John Willey & Sons, 1978. 525p.
- MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA, P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*. v.58, p.1097-1105, 2005.
- MOLDES, D.; RODRÍGUEZ COUTO, S.; CAMESELLE, C.; SANROMÁN, M.A. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. *Chemosphere*. v.51, p.295-303, 2003.
- NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry*. v.31, p.435-442, 1996.
- NOVOTNY, C.; SVOBODOVÁ, K.; KASINATH, A.; ERBANOVÁ, P. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.54, p.215-223, 2004.
- O'NEILL, C.; LOPEZ, A.; ESTEVES, S.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; WILCOX, S. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.53, p.249-254, 2000.

- OLLIKKA, P.; ALHONMAKI, K.; LEPPANEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.4010-4016, 1993.
- OROS, G.; CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E. Separation of the strength and selectivity of the microbiological effect of synthetic dyes by spectral mapping technique. *Chemosphere*, v.52, p.185-193, 2003.
- PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuffs: Part II - Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, v.15, p.479-491, 1986.
- PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Modification of Malachite Green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, v.231, p.205-209, 2004.
- PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, A.; GOSZZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.3605-3613, 1992.
- PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v.58, p.179-196, 2003.
- PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; MORAES, S.G.; PELLEGRINI, R.; MOLEIRO, P.C.; REYES, J.; DURAN, N. Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical process. *Chemosphere*, v.38, p.835-852, 1999.
- RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON, M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye direct red 2 using the *in vivo* mouse bone marrow micronucleous test. *Mutation Research*, v.444, p.175-180, 2000.
- RANZANI, M.R.T.C. Uso de Basidiomicetos comestíveis - *Pleurotus* spp para descoloração/degradação de corantes têxteis. 2002. 218p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.
- RAZO-FLORES, F.; LUITEN, M.; DONLON, B.A.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Complete biodegradation of the azo dye azodisalicylate under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology*, v.31, p.2098-2103, 1997.
- ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAN, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, v.77, p.247-255, 2001.
- RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, v.38, p.27-32, 1999.
- ROSA, J.M. Determinação da cinética de um tingimento em poliamida: um exemplo de como tomar ações preventivas. *Química Têxtil*, v.72, p.26-34, set. 2003.
- ROSOLEN, L.A.; MONTEIRO, R.T.R.; DELLAMATRICE, P.M.; KAMIDA, H.M. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. *Química Têxtil*, v.76, p.44-52, 2004.
- SALEM, V. Corantes na indústria têxtil: uma abordagem ecológica. *Química Têxtil*, v.28, p.16-21, 1995.
- SANTOS, W.V. Tingimento com corantes polifuncionais de nova geração em lavanderias. *Química Têxtil*, v.72, p.5-6, set. 2003.
- SELCUK, H. Decolorization and detoxification of textile wastewater by ozonation and coagulation process. *Dyes and Pigments*, v.64, p.217-222, 2005.
- SHAH, V.; GARG, N.; MADAMWAR, D. An integrated process of textile dye removal and hydrogen evolution using cyanobacterium, *Phormidium valderianum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.17, p.499-504, 2001.
- SHRIVASTAVA, R.; CHRISTIAN, V.; VYAS, B.R.M. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.36, p.333-337, 2005.
- SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2397-2401, 1992.
- SPADARO, J.T.; RENGANATHAN, V. Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of disperse yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.312, p.301-307, 1994.
- SPONZA, D.T.; ISIK, M. Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. *Process Biochemistry*, v.40, p.2735-2744, 2005.
- STIBOROVÁ, M.; ASFAW, B.; ANZENBACHER, P. Activation of carcinogens by peroxidase: Horseradish peroxidase-mediated formation of benzenediazonium ion from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) and its binding to DNA. *FEBS Letters*, v.232, p.387-390, 1988.

- SUPAKA, N.; JUNTONGJIN, K.; DAMRONGLERD, S.; DELIA, M.L.; STREHAIANO, P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Chemical Engineering Journal**, v.99, p.169-176, 2004.
- TONEGAWA, M.; DEC, J.; BOLLAG, J.M. Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. **Journal of Environmental Quality**, v.32, p.1222-1227, 2003.
- UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.Z.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, v.54, p.1589-1597, 2004.
- VAN DER ZEE, F.P.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**, v.44, p.1169-1176, 2001.
- WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Ozonation of na azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. **Chemosphere**, v.52, p.1225-1232, 2003.
- WANG, Y. Solar photocatalytic degradation of light commercial dyes in TiO₂ suspension. **Water Research**, v.34, p.990-994, 2000.
- YESILADA, O. Decolorization of crystal violet by fungi and commercial horseradish peroxidase. **Turkish Journal of Biology**, v.20, p.129-138, 1996.
- YUZHU, F.; VIRARAGHAVAN, T. Fungai decolorization of dye wastewaters: a review **Bioresource Technology**, v.79, p.251-262, 2001.
- ZAMORA, P.P.; LIMA, L. Remediação de resíduos têxteis aquosos por processos Fotoeletroquímicos. **Química Têxtil**, v.73, p.58-62, mar. 2005.
- ZAMORA, P.P.; TIBURTIUS, E.R.L.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Degradação enzimática de corantes têxteis. **Química Têxtil**, v.68, p.32-38, set. 2002.

*Biodegradação de Superfícies
Pintadas*

Denise de Souza Saad

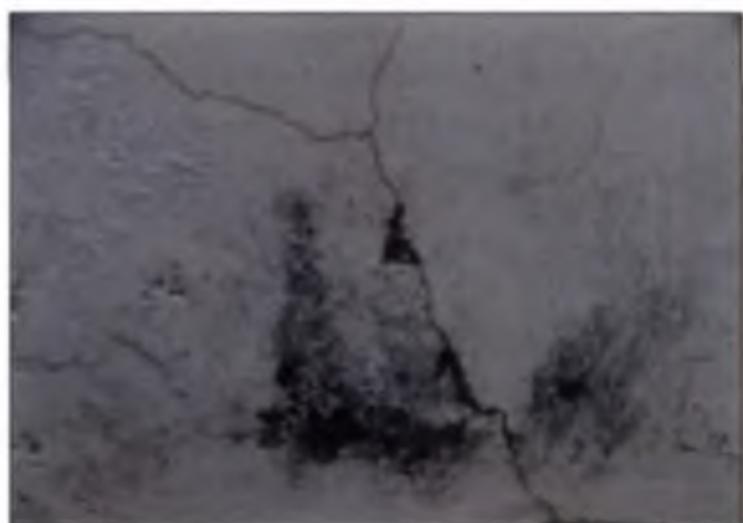


Foto: I.S. Melo

I. Introdução

Ao avaliar uma edificação, o primeiro fator a ser observado pelos engenheiros é a sua capacidade de resistir aos esforços mecânicos. Outros agentes, tais como temperatura, radiação e agentes químicos são também considerados. Problemas causados por cupins, pombos, ratos e morcegos são de fácil visualização e constatação, gerando grande preocupação aos profissionais da área. Entretanto, a contaminação microbiana e os seus danos, ainda são pouco conhecidos pela maioria dos engenheiros e arquitetos que atuam nesta área específica, sendo que este pode ser um problema extremamente danoso por reduzir a durabilidade dos revestimentos e afetar esteticamente as fachadas das edificações.

Normalmente as edificações, atuais ou históricas, são revestidas de tinta. O termo tinta tem sido empregado para descrever filmes contendo material pigmentado, diferenciando-os dos filmes transparentes, os quais são denominados de vernizes. Tintas apresentam duas funções fundamentais, a função decorativa e a de proteção, podendo o material ser base solvente ou base água. Atualmente, devido aos problemas ambientais, tem-se desenvolvido materiais que possibilitem a redução ou eliminação de tintas base solvente.

Os solventes orgânicos empregados no processo de fabricação de tintas assumiam diversas funções, o que lhes conferia grande vantagem no seu emprego e que dificultava em se ter um sistema alternativo substituto. Estudo realizado na União Européia, no final do século passado, demonstrava que num total de 10 milhões de toneladas de substâncias orgânicas emitidas, 53% seriam relativos ao tráfego de veículos, 34% relativos às emissões de solventes orgânicos e 13% relativos a outras causas, o que confirmava o alto grau de poluição provocado por tais compostos. Além disso, estes seriam normalmente tóxicos aos seres vivos nas concentrações utilizadas.

Os problemas ambientais relativos à emissão dos solventes foram reconhecidos a partir da década de 60, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias, nas quais estes compostos seriam utilizados em pequenas quantidades ou substituídos por produtos ecologicamente aceitáveis. Dentre os novos sistemas desenvolvidos, cite-se tintas base água, material geralmente formado por compostos orgânicos, sendo que um dos principais problemas que afetam seu desempenho é a deterioração por microrganismos, o que reduz a sua vida útil, acarretando custo para reparo e manutenção.

2. Contaminação em tintas

A biodeterioração da tinta poderá ocorrer na lata, ou após sua aplicação. Na lata, a origem do problema de contaminação poderá iniciar com o emprego de

alguma matéria-prima e/ou água contaminadas, bem como uma deficiência de higiene na indústria fabricante do produto. A incorporação de biocida na primeira carga de água utilizada asseguraria sua presença desde as primeiras fases do processo, reduzindo a contaminação inicial. Assim, um controle adequado na fase de produção da tinta deveria ser utilizado no sistema para garantir uma preservação eficiente nas etapas posteriores, com menor utilização de biocidas no produto final, com uma melhor relação custo-benefício. Convém salientar que os produtos disponíveis para evitar este tipo de contaminação nesta etapa incluem derivados de benzoisotiazolinonas e misturas de compostos heterocíclicos, entre outros.

No estado líquido, a tinta é suscetível à bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, muitas delas do gênero *Pseudomonas* e os seus principais efeitos são: o desenvolvimento de gases, a produção de odores na lata fechada, a desintegração da emulsão, variações do pH, alteração da cor e perda da viscosidade da tinta, sendo este último uma importante propriedade durante o processo de aplicação. Todos estes problemas impossibilitam a venda do produto.

Em filmes de tinta, o crescimento microbiano pode ocorrer tanto na face interna quanto na externa das edificações. Muitos autores têm demonstrado que os maiores problemas de deterioração ocorrem, principalmente, em regiões tropicais.

Diversos fatores estão envolvidos na deterioração de tintas, podendo ser provenientes do substrato, onde a tinta será aplicada ou de fatores naturais, tais como a ação da temperatura, umidade, radiação solar e microrganismos. Na biodeterioração, o fator mais importante é a umidade, seguida pela temperatura, oxigênio e luz. Além disso, carboidratos, que são provenientes de resíduos depositados sobre a superfície pintada ou do próprio revestimento, servem como origem de carbono, bem como nitrogênio e outros minerais, que são necessários para o crescimento dos microrganismos. No entanto, tem-se pouco conhecimento sobre o processo de deterioração de superfícies pintadas relacionadas com a deterioração causada por microrganismos.

3. Biofilmes, microrganismos e seus efeitos em superfícies pintadas

A deterioração dos materiais pode ser acelerada por uma camada superficial aderida, chamada biofilme. Esta camada contém células microbianas aderidas, metabolicamente ativas ou não, bem como ácidos e vários polímeros. Todos esses componentes são adsorvidos em uma matriz complexa de Polímeros Extra-Celulares, denominada de PEC, que aumenta a adesão desta estrutura na superfície do material. A Figura 1 e 2 representa um biofilme genérico em superfície pintada.



FIGURA 1. Biofilme Esquemático.

A PEC tem uma estrutura porosa, na qual os espaços vazios contêm água. Neste sistema, substâncias solúveis podem mover-se livremente,



FIGURA 2. Biofilmes de organismos fototróficos e esporos fúngicos sobre superfície pintada. (Foto cedida pela Dra. Christine Gaylarde).

como um material aderente para outros microrganismos e partículas inertes. Existem também poros na estrutura da matriz da PEC permitindo assim a penetração de oxigênio e material nutriente para células microbianas. Esta camada gelatinosa também fornece água e nutrientes para manter a resistência à secagem e em períodos com escassez de nutrientes, o que torna mais difícil destruir as células com biocida, assim o estudo deste micro-ambiente torna-se muito importante.

Os microrganismos mais freqüentemente envolvidos em biodeterioração de superfícies pintadas são bactérias, cianobactérias, algas e fungos. Estes são hábeis em obter cálcio, alumínio, sílica, ferro e potássio do substrato, dentre outras moléculas, pois ocorre solubilização através dos diferentes tipos de ácidos produzidos durante seu metabolismo.

Bactérias modificam a coloração da superfície e seus metabolismos podem causar degradação, além da degradação já mencionada que ocorre na tinta na lata. Bactérias autotróficas e heterotróficas estão envolvidas, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Achromobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, entre outras.

O crescimento microbiano fototrófico tem uma importante função na biodeterioração. Danos causados por algas podem ser mecânicos e químicos. Estes microrganismos são capazes de acumular enxofre e grandes quantidades de cálcio em suas células, o que aumenta sua capacidade para deteriorar o material. As bactérias azuis-verdes ou cianobactérias são mais resistentes a ciclos de hidratação-desidratação, e a grandes variações de temperatura. A maior importância destes microrganismos é que são considerados os primeiros colonizadores de superfícies limpas.

Cianobactérias induzem a deterioração de materiais porosos em diversas etapas. Assim, inicialmente as células fixam-se e crescem no interior de pequenos poros e fissuras. A massa celular absorve água e intumesce, exercendo pressão na estrutura. Há a precipitação de carbonatos e oxalatos ao redor das células, aumentando o tamanho das fissuras devido à pressão interna. Sujeira, grãos de pólen, bactérias,

mas partículas podem ficar retidas. Este sistema pode ser bem dinâmico devido a biossíntese da PEC, divisão celular, crescimento celular, morte celular e autólise.

A facilidade de formação do biofilme depende de muitas características do material. A rugosidade da superfície é aparentemente mais importante do que fatores como hidrofobicidade, energia superficial livre, fisiologia celular, estrutura celular e o filme condicionante da superfície. A rugosidade proporciona uma maior superfície para adesão microbiana e os poros preenchidos com água auxiliam na absorção de nutrientes. A camada gelatinosa PEC protege as células e atua

fungos e pequenos animais, que requerem carbono orgânico para seu crescimento, entram nas fissuras. A pressão interna aumenta na camada superficial da estrutura, o que induz a formação de biofilmes.

As cianobactérias e algas mais comumente isoladas a partir da deterioração de tintas são *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Tetracystis*, *Trentepholia*, *Rhodophiceae*, *Xanthophyceae*, *Calothrix*, *Choococcus*, *Nostoc*, *Plectonema* e *Synechocystis*.

Fungos são considerados os microrganismos mais deletérios devido aos seus efeitos físicos, químicos e mecânicos no material. Eles produzem estruturas reprodutivas chamadas esporos, que podem ser pigmentados afetando esteticamente a superfície, principalmente devido à sua coloração preta ou cinza. Os efeitos químicos na superfície são causados pelas enzimas e ácidos produzidos durante o metabolismo das células.

Os fungos também provocam o chamado efeito mecânico devido ao crescimento de suas estruturas filamentosas, as hifas, as quais podem penetrar no material, aumentando a porosidade e permeabilidade.

Há três etapas de ataque na deterioração do filme de tinta. Inicialmente, há a ruptura mecânica, não sendo esta diretamente relacionada à utilização de componentes da formulação. Em uma segunda etapa, a degradação do material poderá ocorrer devido aos efeitos corrosivos ou cáusticos, produzidos por metabólitos orgânicos, geralmente ácidos orgânicos complexos. Em uma terceira etapa, a deterioração seria causada pela atividade enzimática dos microrganismos.

Alguns fungos geralmente envolvidos na deterioração de tintas base água são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aurebasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma* e *Fusarium*. Estes microrganismos podem excretar ácidos oxálico, cítrico e glucônico, entre outros orgânicos e inorgânicos, podendo solubilizar os componentes do substrato (Figura 3).

A taxa de crescimento destes microrganismos em pintura poderá ser afetada pelo substrato. Análises realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura indicam que a desfiguração fúngica seria um fenômeno superficial,

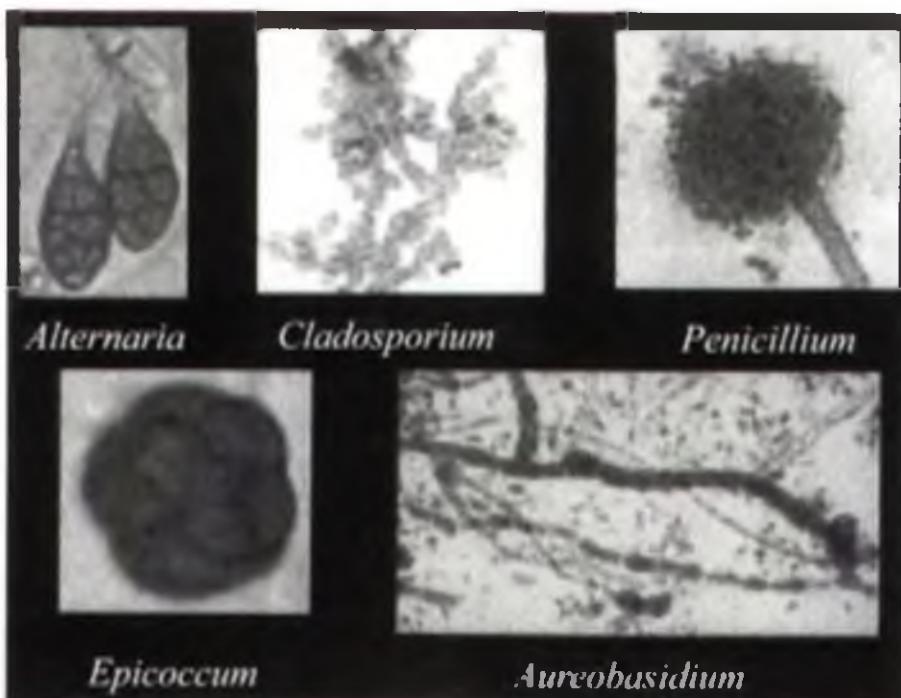


FIGURA 3. Fungos comumente isolados de superfícies pintadas. (<http://www.dehs.umn.edu/iaq/fungus/pictures.html>)

entretanto, na prática a resistência ao ataque fúngico é dependente, tanto do tipo de tinta empregada quanto da base do substrato utilizado. Geralmente, este segundo parâmetro não é considerado durante a análise do crescimento fúngico.

A exposição externa, em tempo real e em condições favoráveis de crescimento é o

método adequado para testar verdadeiramente as propriedades de resistência ao crescimento fúngico de qualquer produto. Análise com culturas simples e biocidas são usadas somente para testes preliminares.

Na contaminação nas superfícies internas, a predominância na flora microbiana é fúngica. Este crescimento pode estar associado a problemas de saúde dos moradores, principalmente sintomas alérgicos, mas também a irritações produzidas pela presença de compostos voláteis e micotoxinas no ar.

Aspergillus, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* e *Trichoderma* são algumas das espécies encontradas em materiais de construção pintados que têm capacidade para produzir micotoxinas, que podem causar várias doenças tais como: tumores, pneumonias e imunossupressão. O fungo *Stachybotrys chartarum* (= *S. atra*), uma das espécies mais isoladas em prédios úmidos na Europa, produzem tricotecenos, que causam micotoxicoses em animais, irritação da pele e imunossupressão. Alguns estudos realizados já demonstraram que as micotoxinas podem ser produzidas durante o crescimento fúngico sobre materiais de construção. Assim, o biofilme formado, principalmente por contaminação fúngica em superfícies pintadas, não atua somente como uma camada potencialmente destrutiva da superfície, poderá também ser uma fonte de risco potencial à saúde humana.

4. Técnicas utilizadas para análise microbiana de superfícies pintadas

Biofilmes são matrizes heterogêneas e muito complexas de micro-colônias entrelaçadas com canais, que permite o movimento de fluidos. O uso de diferentes técnicas é recomendado para melhor compreensão das trocas espaciais e temporais no biofilme (Figura 4).

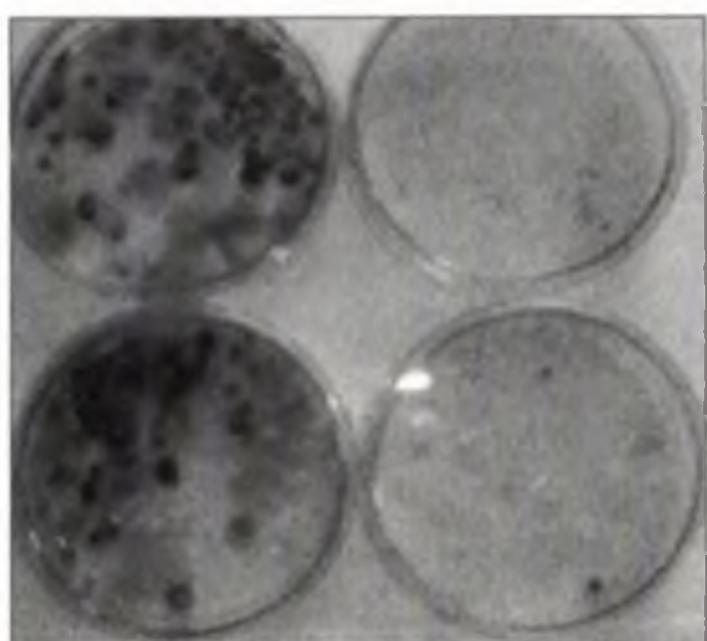


FIGURA 4. Coleta de amostras por raspagem em painéis pintados com tintas do mercado do sul do país. A esquerda tinta sem biocida e à direita tinta com biocida, após 1 mês de exposição dos painéis ao meio ambiente.

Normalmente, técnicas de remoção e plaqueamento são usadas para análise de população de biofilmes em superfícies, envolvendo incubações lentas e, quando há investigações ambientais, é preferível o uso de uma variedade de meios de crescimento de laboratório, para maximizar o número de gêneros microbianos encontrados. Técnicas tradicionais de identificação geralmente usadas são baseadas nas características morfológicas usando microscopia ótica e testes bioquímicos em culturas puras isoladas.

Tem-se relatado que o principal problema relacionado às técnicas

tradicionais é que somente 0,1 a 10% do total de microrganismos, contidos em amostras, podem ser detectados por meios de cultura. Além disso, o crescimento nestes meios pode ser muito lento, 7 a 10 dias para fungos, e acima de 21 dias para cianobactérias, o que retarda o resultado. Assim, devem ser usados métodos alternativos para análises e quantificações da população microbiana no biofilme.

Métodos moleculares envolvendo análise de DNA reduzem o tempo de detecção consideravelmente e garantem a detecção de organismos não-cultiváveis. Estas técnicas auxiliam na elucidação de questões relacionadas à interação entre os microrganismos na comunidade, servindo como uma ferramenta para compreender a estrutura do ecossistema no material contaminado.

4.1 Emprego de técnicas moleculares para estudo da deterioração em superfícies pintadas

Dentre as biomoléculas encontradas nos seres vivos, há os ácidos nucléicos, DNA e RNA. O DNA de qualquer microrganismo pode ser representado através de seqüência de suas bases (AAATTTCCCCGGG...). Assim, por meio da determinação desta seqüência é possível conhecer os microrganismos presentes em qualquer amostra de material contaminado, inclusive os de construção.

4.1.1 Reação em Cadeia da Polimerase em Superfícies Pintadas

O DNA, que caracteriza os microrganismos, pode ser isolado a partir da ruptura da célula, ou seja, lise celular. A replicação do DNA que ocorre na divisão celular, pode ser realizada em laboratório. Este processo de replicação, desenvolvido pelo americano Karol Mullins, é denominado de reação em cadeia da polimerase-PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Isto permite amplificar e analisar DNA dos mais diversos organismos, mesmo aqueles os quais não poderiam ser analisados por técnicas tradicionais de cultivo. Para o emprego desta técnica, quantidades mínimas, na ordem de 10 ng do DNA de qualquer microrganismo são suficientes.

Para que a reação ocorra, além da molécula de DNA proveniente do microrganismo a ser analisado, denominada de fita molde, faz-se necessário os outros componentes existentes na replicação da molécula: o açúcar pentose, o grupo fosfato, quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (A, T, C, G), os dois oligonucleotídeos iniciadores sintéticos, que são fitas do DNA com pequeno número de bases, bem como a enzima que realiza a replicação, sendo que varia a quantidade final de todos os componentes. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são específicos para os microrganismos estudados. Há indicadores para bactérias, fungos, cianobactérias e algas.

O procedimento do PCR consiste na seqüência de três etapas: elevação da temperatura até 90°C a 95°C, para desnaturação da fita dupla de DNA. Nesta etapa, as ligações das pontes de hidrogênio entre duas fitas são rompidas, liberando duas

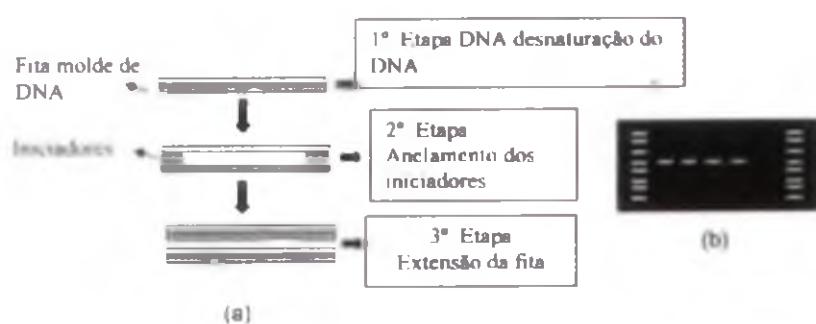


FIGURA 5. a) Três etapas na reação de PCR. b) Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose.

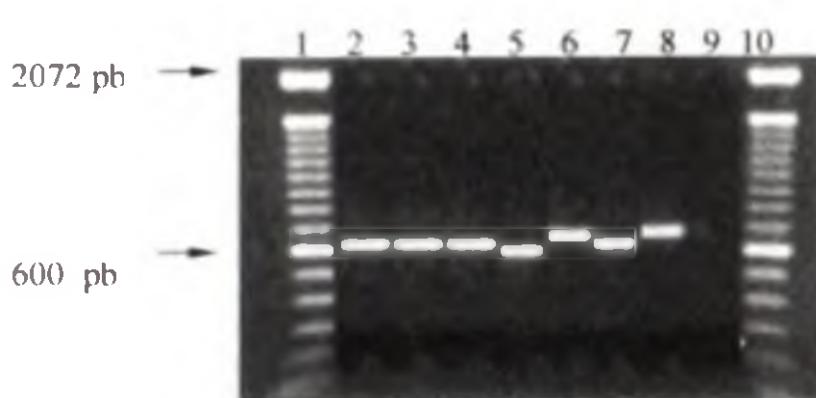


FIGURA 6. Amplificação do DNA através da técnica de PCR de diferentes fungos em gel de agarose. canaleta 1 e 10: Marcadores (pb) (fragmentos de DNA de 100pb repetidos, com comprimentos variando de 100 a 1500pb, com incremento de 100pb e um fragmento adicional de 2.072pb); canaleta 2: *Aureobasidium pullulans*; canaleta 3: *Alternaria alternata*; canaleta 4: *Aspergillus* sp.; canaleta 5: *Cladosporium* sp.; canaleta 6: *Curvularia verruciformes*; canaleta 7: *Epicoccum nigrum*; canaleta 8: *Penicillium* sp.; canaleta 9: Controle negativo: água.

celular de esporos fúngicos contaminadores de superfícies pintadas, com subsequente amplificação do DNA extraído via PCR. O trabalho demonstrou que a metodologia mais adequada para extração utilizou um *kit* para extração do DNA, sendo seu protocolo parcialmente modificado em conjunto com 15 minutos de agitação com pérolas de vidro.

Na Figura 6, tem-se o DNA fúngico de paredes pintadas amplificado após reação de PCR.

Observando o resultado do DNA amplificado dos diversos diferentes fungos, verifica-se que numa amostra ambiental, os fragmentos teriam aproximadamente o mesmo comprimento, em torno de 600pb, o que dificultaria sua visualização no gel. Para tanto se utiliza uma segunda técnica denominada de DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturante).

fitas simples. Após, há redução da temperatura, entre 50°C a 60°C, na qual ocorre o pareamento dos iniciadores em ambas as fitas. Na fase final, há novamente um aumento de temperatura para 72°C, na qual há a extensão, ou seja, a enzima faz a leitura da base nitrogenada na fita molde e liga a base correta na fita que está sendo construída (Figura 5).

Aplicações deste método têm sido dadas em diversas áreas, incluindo genética, sistemática bacteriana, fúngica, de algas e cianobactérias, em ecologia, na área médica, biotecnologia, entre outras.

O emprego desta técnica foi inicialmente desenvolvido por Rollecke *et al.* (1998) em afrescos de murais do século XIII, o que permitiu a detecção de *archaeas* que não puderam ser isoladas previamente em meios de cultura. A técnica de PCR também foi utilizada por Crispim (2003) para estudos de cianobactérias contaminadoras de superfícies de igrejas em Porto Alegre, RS.

Em tintas, esta técnica foi aplicada no trabalho desenvolvido por Saad *et al.* (2003), no qual foram analisados diversos métodos de lise

4.1.2 Eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE)

Quando há uma amostra exposta ao ambiente, diversos microrganismos estão contidos nela, o que dificulta suas identificações. Por tanto, após extrair o DNA e amplificá-lo via PCR, tem-se uma mistura de DNA, que estão contidos na amostra. Como a seqüência de bases (A, T, G, C) permite sua identificação, é possível, por meio de outra técnica denominada de gel em eletroforese com gradiente de desnaturante – DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis) (Figura 7), separar o DNA dos mais diversos microrganismos. Este é um método parcialmente quantitativo.

A Figura 8 permite uma melhor compreensão da técnica pois representa o comportamento no gel de dois fragmentos de DNA de dois microrganismos diferentes. Os fragmentos iniciam o deslocamento do topo do gel (30% de desnaturante) para a base (60% do desnaturante) e ambos, por serem de microrganismos diferentes, apresentam diferentes seqüências de base. Assim, inicialmente os dois fragmentos

têm a mesma posição no gel do DGGE.

O aumento do gradiente provoca uma desnaturação interna em um dos fragmentos, de acordo com sua seqüência das bases (quanto maior o número de bases CG, maior será sua resistência à desnaturação). Há, portanto, a formação de uma bolha interna na molécula, o que retarda sua mobilidade, devido à sua dificuldade em percorrer os poros do gel de agarose. Assim, o fragmento apresenta uma região com maior área superficial, o que dificulta sua passagem por meio dos poros da agarose.

Com um aumento da quantidade do desnaturante, próximo a 60%, o fragmento pode ter suas ligações totalmente rompidas, desnaturando a fita, o que dificultaria ainda mais o seu deslocamento, causando maior retardo na mobilidade. Para evitar a desnaturação total, o que causaria problema no processo, é utilizada uma “cola de GC” em um dos oligonucleotídeos iniciadores.

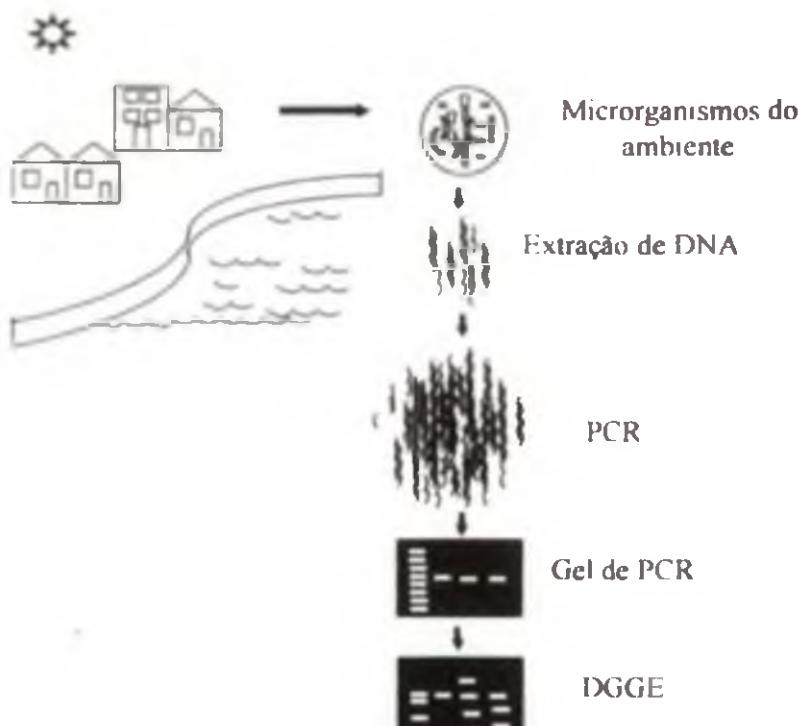


FIGURA 7. Etapas de realização do DGGE.

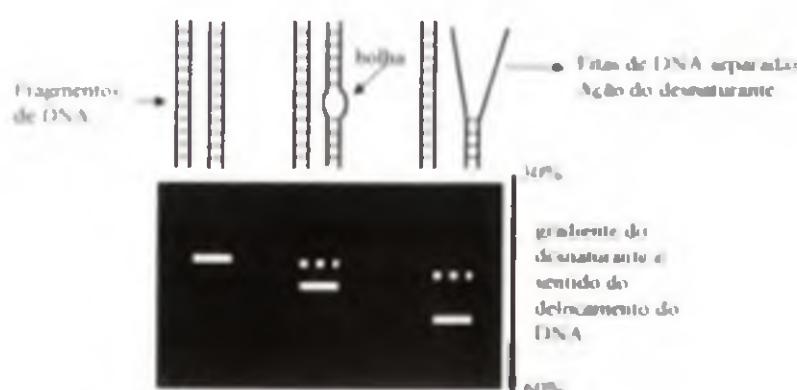


FIGURA 8. Etapas durante o DGGE (SAAD, 2002).

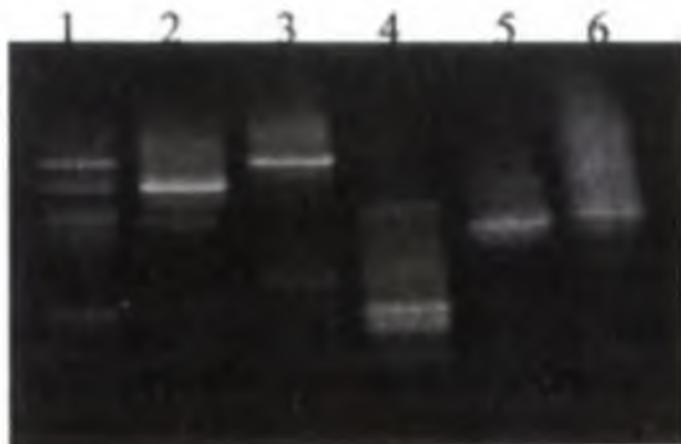


FIGURA 9. DGGE do DNA amplificado fungos isolados de superfícies pintadas (foto do autor). Canaleta 1: Mistura do DNA dos fungos *Acremonium* sp + *Alternaria alternata* + *Aspergillus* sp. + *Cladosporium cladosporioides* + *Penicillium* sp. ; canaleta 2: *Penicillium* sp.; canaleta 3: *Cladosporium cladosporioides*; canaleta 4: *Aspergilus* sp.; canaleta 5: *Alternaria alternata*; canaleta 6: *Acremonium* sp.

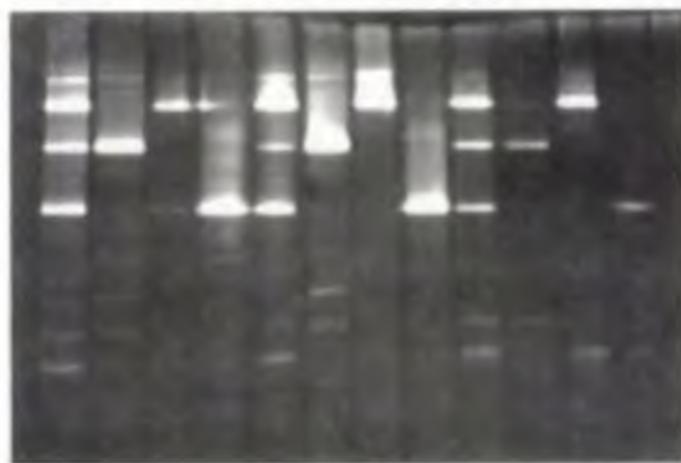


FIGURA 10. DGGE do DNA amplificado de fungos isolados em presença de 10mg de tinta durante a extração por dois métodos diferentes. **Canaleta 1:** (*Acremonium* sp.+*Cladosporium* sp.+*Penicillium* sp.) + tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 2:** *Penicillium* sp. + tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 3:** *Cladosporium* sp. + tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 4:** *Acremonium* sp. + tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 5:** (*Acremonium* sp. + *Cladosporium* sp.+ *Penicillium* sp.) + sem tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 6:** *Penicillium* sp. + sem tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 7:** *Cladosporium* sp. + sem tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 8:** *Acremonium* sp. + sem tinta – Extração do kit Qiagen; **canaleta 9:** (*Acremonium* sp. + *Cladosporium* sp.+ *Penicillium* sp.) + sem tinta – Extração segundo Cenis; **canaleta 10:** *Penicillium* sp. + sem tinta – Extração segundo Cenis; **canaleta 11:** *Cladosporium* sp. + sem tinta – Extração segundo Cenis; **canaleta 12:** *Acremonium* sp. + sem tinta – Extração segundo Cenis.

Assim, após a corrida no gel, pode-se verificar visualmente a presença dos 2 microrganismos, o que inicialmente era impossível de se observar. Este método permite somente uma avaliação quantitativa dos microrganismos presentes na amostra. Todo o processo poderá ser realizado em um único dia, o que demonstra a rapidez desta técnica.

Na Figura 9 tem-se DGGE aplicado a fungos contaminadores de superfícies pintadas.

Na Figura 10 apresenta-se o DGGE do DNA extraído e amplificado, aplicando-se dois métodos de extração de fungos contaminadores dos painéis pintados, com simulação realizada em laboratório para verificação da possibilidade do emprego da técnica em substrato pintado e ambientalmente exposto. Conforme se verifica, o resultado permite a identificação de diversos fungos contaminadores, sem interferência de nenhum componente da tinta no processo.

Na Figura 11 apresenta-se o emprego desta técnica para DNA extraído e amplificado de fungos contaminadores dos painéis pintados e expostos ao ambiente. Os painéis, pintados com tinta base água com dois tipos diferentes de biocidas, demonstravam a possibilidade de emprego destas técnicas moleculares para avaliação da contaminação em superfícies pintadas, mesmo quando a contaminação visual ainda não era detectada.

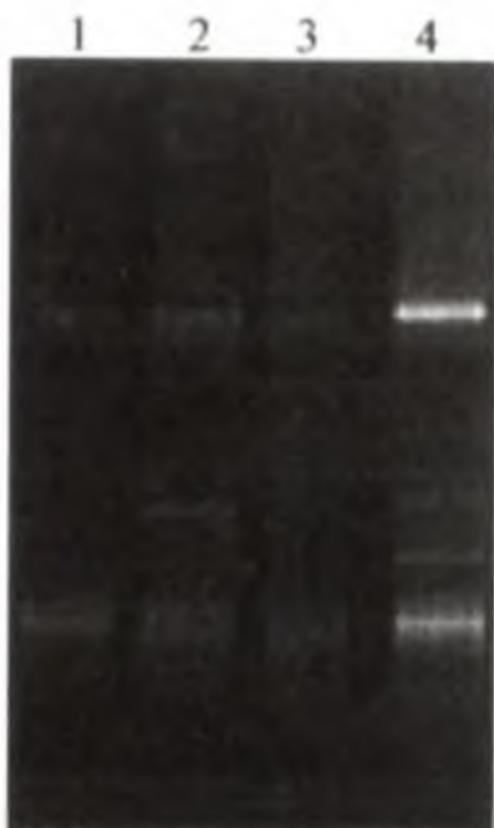


FIGURA 11. DGGE painéis ambientais expostos por 30 dias (foto do autor). **Canaleta 1:** tinta com 1,5% Diuron exposição por 30 dias. **canaleta 2:** tinta com 1,0% Carbendazin exposição por 30 dias. **canaleta 3:** tinta com 0,5% Carbendazin exposição por 30 dias, **canaleta 4:** tinta sem biocida exposição por 30 dias.

Outros métodos baseados em marcadores bioquímicos, como ergosterol e ácido graxo 3-hidróxi permitem, respectivamente, a quantificação de biomassa de fungos e bactérias na superfície. Estes métodos têm sido usados em madeira, placas de gesso, lã de vidro e películas de tinta (Figura 13).

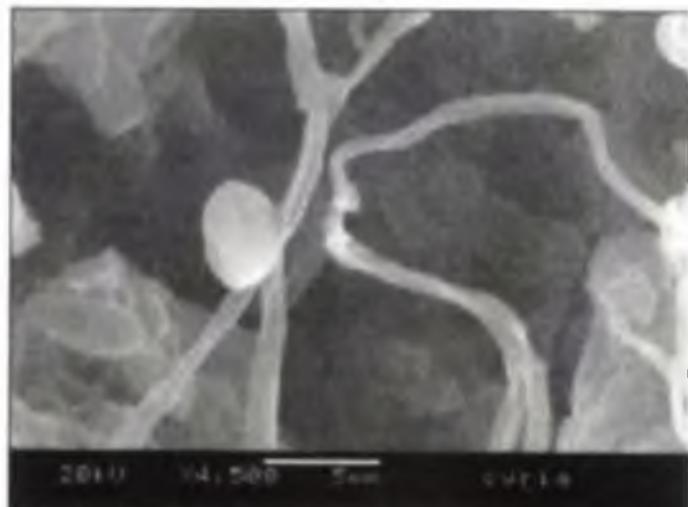


FIGURA 12. Microscopia eletrônica de varredura de substrato pintado (observe a presença de hifas e esporo fúngico).

5. Outras técnicas empregadas para estudo de superfícies pintadas

Diferentes técnicas de microscopia, tais como microscopia de força atômica (MFA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEVA), microscopia de varredura a laser confocal (SLM) e microscopia de varredura com sonda (SPM) têm sido usadas extensivamente para entender as dimensões e arranjos espaciais dos biofilmes. Estas técnicas fornecem informações sobre a morfologia das células, material polimérico extracelular e a presença de produtos inorgânicos no biofilme (Figura 12). Além disso, são importantes para a melhor compreensão dos danos causados na superfície por microrganismos e para avaliar seu comportamento na presença de biocidas.

Algumas técnicas analíticas também são empregadas para estudar o impacto microbiano em superfícies tais como cromatografia de troca iônica, análise térmica diferencial, análise química convencional, análise de energia de dispersão de raio-X, raio-X fluorescente, fotoespectroscopia de raio-X, espectroscopia de absorção atômica e análise difração de raio-x.

Outros métodos baseados em marcadores

bioquímicos, como ergosterol e ácido graxo 3-hidróxi permitem, respectivamente, a quantificação de

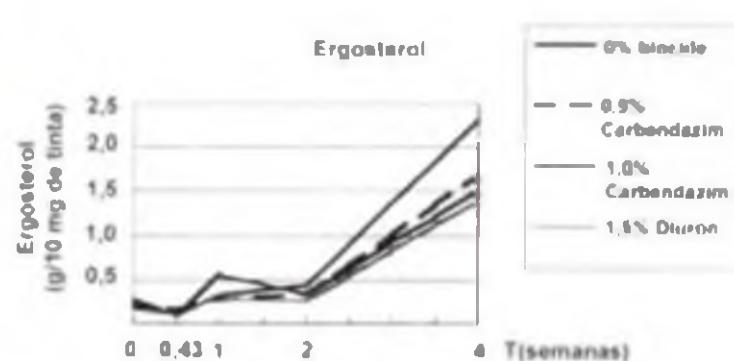


FIGURA 13. Quantificação da biomassa fúngica empregando ergosterol em tinta com e sem biocida (Saad *et al.*, 2003).

Além das técnicas atuais utilizadas para estudo de biofilmes em superfícies pintadas, outras técnicas poderão ser utilizadas, tais como polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de DNA (RFLD), polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA amplificados (AFLP) hibridização por fluorescência *in situ* (FISH), transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), entre outras, as quais são empregadas em biologia molecular. Estas técnicas podem auxiliar a detectar microrganismos que não são cultiváveis em meios laboratoriais e melhor avaliar os danos causados por estes ao sistema, permitindo assim um maior controle do processo.

6. Considerações finais

O desenvolvimento de tintas menos agressivas ao meio ambiente favoreceu a redução do desempenho do material frente à ação de microrganismos, tais como bactérias, cianobactérias, fungos e algas, devido à substituição dos solventes orgânicos por água. Este problema tem causado um aumento no custo e na manutenção.

Em edificações, engenheiros e arquitetos são responsáveis pela escolha dos materiais a serem empregados, sendo que estes profissionais apresentam deficiência na sua formação com relação ao tópico de biodeterioração, por não ser este assunto objeto de estudo nas escolas.

Este capítulo demonstra que diversas técnicas empregadas em outras áreas, tais como PCR, DGGE, microscopia, bem como marcadores bioquímicos, podem ser utilizados para uma análise da contaminação microbiana em superfícies pintadas, mesmo em períodos iniciais, enquanto a visualização não está evidenciada.

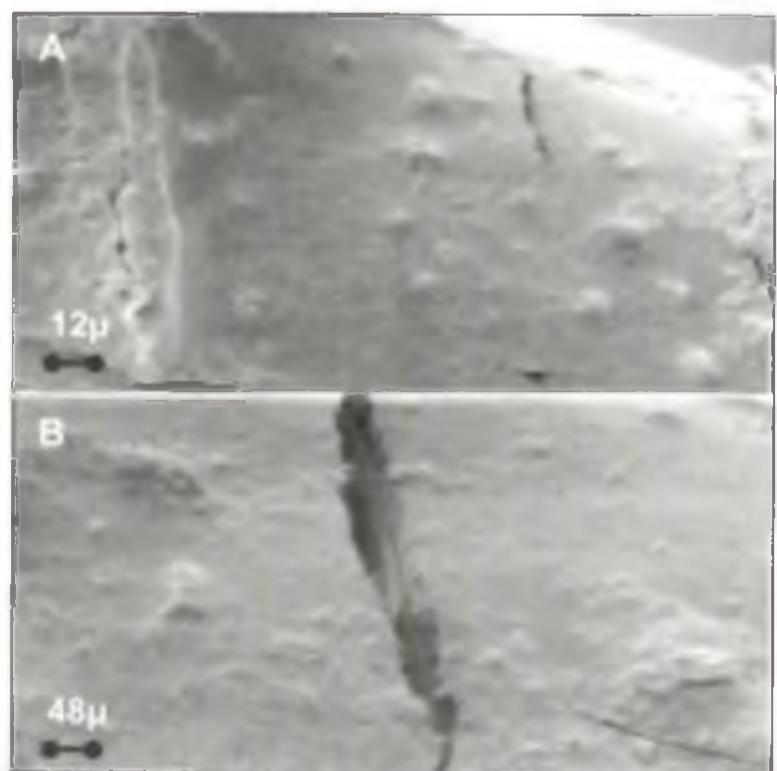
Estas técnicas fornecem informações mais precisas para uma melhor compreensão do comportamento do sistema, mostrando-se como técnicas promissoras, propiciando uma avaliação da bioreceptividade e biodeterioração do material analisado, antes de seu emprego.

Referências

- CRISPIM, C.A. Identificação de cianobactérias em superfícies externas de prédios históricos: análise morfológica e molecular. 90 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, 2003.
- RÖLLEKE, S.; WITTE, A.; WANNER, G.; LUBITZ, W. Medieval wall paintings-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.41, p.85-92, 1998.
- SAAD, D.S. *Métodos Bioquímicos e Moleculares para Avaliação da Biodeterioração em Tintas Residenciais*. 2002. 141 p. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS.
- SAAD, D.S.; SAAD, D.; KINSEY, G.C.; PATERSON, R.; GAYLARDE, C.C. Ergosterol analysis for the quantification of fungal growth on paint films. Proposal for standard method. *Surface Coating International*, v.86, p.131-134, 2003.

Biodegradação de Polímeros Sintéticos

**Sandra Mara Martins Franchetti, José Carlos Marconato e
Adriana de Campos**



I. Introdução

Os plásticos sintéticos adquiriram um papel de destaque no mundo todo pelas suas propriedades, versatilidade de uso, preço e durabilidade (HUANG, 1995). O nosso dia a dia é sustentado por uma imensa quantidade de plásticos, que movimenta de maneira significativa os setores industrial e comercial e gera muitos empregos (WAN *et al.*, 2001).

Os plásticos são materiais formados por polímeros (poli=muitas, meros= partes, monômeros), isto é, macromoléculas produzidas através de reações químicas entre unidades menores, os monômeros, que se juntam como elos de uma corrente, para formar o polímero (CANTO, 1999). Este material pode ser um plástico, isto é, pode ser moldado e remodelado várias vezes, a quente (termoplástico), assumindo muitas formas, dependendo da finalidade a que se destina. Alguns polímeros não podem ser moldados a quente pela segunda vez, isto é, podem ser moldados somente uma vez durante o seu processamento, são os termofixos, tais como a resina fenol-formaldeído empregada na fabricação de cabos pretos de panelas e tomadas escuras (MANO, 1985, CANTO, 1999).

O volume de plásticos descartados nos lixões é muito grande, bem como a quantidade de lixo em geral: o Brasil descarta cerca de 240.000 toneladas de lixo por dia, a Alemanha, 85.000 toneladas/dia, a Suécia 10.400 toneladas/dia e os EUA muito mais, 607.000 toneladas/dia (VILPOUX & AVEROUS, 2003). No caso dos plásticos, o consumo per capita no mundo é de 19 kg em média (SHRIVAM, 2001), sendo 80 kg nos EUA, 60 kg na Europa, 2 kg na Índia e 10 kg no Brasil (KALIA *et al.*, 2000; Canto, 2002). Os mais consumidos no dia a dia são os plásticos de embalagens (termoplásticos): polietileno (PE), polipropileno (PP), poli (tereftalato de etileno) (PET), poli (cloreto de vinila) (PVC), poliestireno (PS) (AMASS *et al.*, 1998). Isto acarreta dois sérios problemas: o uso de derivados de petróleo (fonte não-renovável) como matéria-prima e a grande quantidade de resíduos acumulada no meio ambiente (AMASS *et al.*, 1998). Além disso, é sabido que muitos destes plásticos exigem mais de 100 anos para a sua degradação total, tendo em vista que sua alta massa molar média e hidrofobicidade dificultam a ação dos microrganismos e de suas enzimas na superfície do polímero (ABOU-ZEID, 2001; ROSA, 2004).

A composição do lixo plástico varia conforme a região, mas pode-se considerar a seguinte distribuição, em média (Figura 1).

Para minimizar o efeito do grande volume de resíduos descartados têm sido

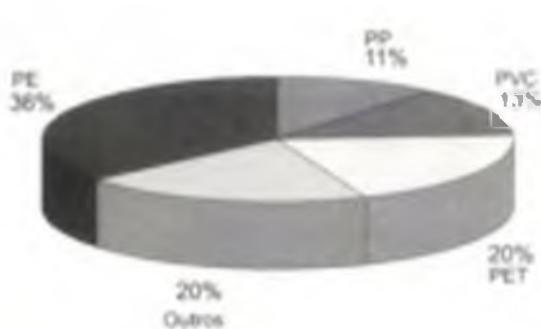


FIGURA 1. Composição percentual de plásticos presentes no sólido urbano do lixão. (Anon, 1997).

empregados 4 métodos principais, descritos em Martins-Franchetti & Marconato, (2005):

Aterros sanitários - São locais afastados da cidade e preparados para acondicionar o grande volume de matéria plástica, que ficará muito tempo exposta ou será utilizada para a queima e geração de energia (reciclagem térmica) (AMASS *et al.*, 1998). Cerca de 14 milhões de toneladas de resíduos plásticos/ano são descartadas em aterros sanitários e mais de 100.000 toneladas/ano são descartadas no mar (REDDY *et al.*, 2003).

Incineração - Este processo apresenta a vantagem de diminuir rapidamente o volume de material descartado, em cerca de 80%. Apesar disto, a incineração não é um método recomendável, devido ao alto custo dos fornos de aquecimento e da poluição produzida pela liberação de produtos tóxicos. No caso do PVC, em particular, quando incinerado lança para a atmosfera, entre outras substâncias tóxicas, o HCl, que acumulado na atmosfera úmida, pode cair como chuva ácida (KARLSSON *et al.*, 1998; PACI & LA MANTIA, 1999).

Reciclagem - É um método viável de reaproveitamento de resíduos plásticos, por fusão e transformação destes resíduos em outros materiais utilizáveis comercialmente. Este método apresenta como vantagens a redução da quantidade de resíduos sólidos, a economia de matéria prima e energia, o aumento da vida útil dos lixões e um alto rendimento do processo (VARMA, 1999). A reciclagem de plásticos envolve um grande trabalho prévio de separação, identificação e limpeza dos recipientes plásticos, o que demanda uma grande quantidade de água. Ainda assim, o material reciclado é cerca de 50% mais barato que o polímero virgem. No mundo, cerca de 20% dos plásticos é reciclado (SHRIVAM, 2001). No Brasil, a reciclagem vem crescendo em volume e aumentando a diversidade e qualidade dos produtos reciclados (SPINACÉ & De PAOLI, 2005).

Biodegradação - É um processo que consiste na modificação física ou química de um material, causada pela ação de microrganismos, sob certas condições de calor, umidade, luz, oxigênio e nutrientes orgânicos e minerais adequados (AMASS *et al.*, 1998). Outra definição geral de biodegradação é: um processo no qual bactérias, fungos, leveduras e suas enzimas consomem uma substância como fonte de alimento, transformando-a em outros metabólitos ou chegando à degradação total e produção de CO₂ e H₂O (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Outra maneira de ajudar a diminuir a quantidade de resíduos plásticos persistentes no meio ambiente, tem sido o emprego de polímeros biodegradáveis, que podem ser usados em determinadas aplicações, restritas ainda pelas suas propriedades mecânicas e alto custo de fabricação:

Polímeros Biodegradáveis - Estes polímeros são materiais degradáveis, em que a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, gerando CO₂, CH₄, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela American

Standard for Testing and Methods (ASTM-D-833) (RAGHAVAN, 1995). Ou de outro modo, são materiais que se degradam em dióxido de carbono, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas (ROSA *et al.*, 2004).

Descobertos há cerca de dez anos, os plásticos biodegradáveis, também denominados plásticos biológicos ou bioplásticos (REDDY *et al.*, 2003), hoje ainda têm uma participação mínima no mercado internacional (KORNER *et al.*, 2005). Apesar da vantagem de sua aplicação, quanto à preservação do meio ambiente, os plásticos biológicos são mais caros, e têm aplicações mais limitadas que os sintéticos, por serem menos flexíveis (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Em meados da década de 1990, iniciou-se no Brasil o desenvolvimento de uma tecnologia para a produção de plásticos biodegradáveis empregando como matéria-prima derivados da cana de açúcar, a partir de um projeto cooperativo desenvolvido pelo IPT, Copersucar e Universidade de São Paulo. Desta parceria, iniciou-se um estudo, com os polímeros da família dos poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), que podem ser produzidos por bactérias em biorreatores a partir de açúcares. Tais polímeros possuem propriedades semelhantes às dos plásticos petroquímicos, com a vantagem de poderem ser biodegradados por microrganismos presentes no meio ambiente, em curto espaço de tempo, após o descarte (CHANDRA & RUSTGI, 1998). O principal representante dos PHAs é o poli(β -hidroxibutirato) (PHB), semelhante ao polímero sintético, polipropileno (PP), em propriedades físicas e mecânicas (CHANDRA & RUSTGI, 1998; LEE *et al.*, 2005).

O interesse por estes polímeros tem crescido muito nos últimos tempos no mundo todo. Apesar disto, o alto custo de sua produção ainda é uma grande desvantagem em relação aos polímeros convencionais, basta comparar o custo de produção do PHB estimado em US\$ 2.65/kg para uma planta de 100.000 toneladas/ano, com o uso de sacarose como substrato, com o valor do polipropileno de US\$ 1.00/kg (NONATO *et al.*, 2001). Não existem dados precisos sobre o consumo de plásticos biodegradáveis na Europa, mas sabe-se que a Alemanha é de longe o maior consumidor destes (VILPOUX & AVEROUS, 2003). Existem algumas estimativas do consumo na Europa em 1999, tais como: sacos para compostagem - 5500 toneladas; embalagens alimentícias - 800 toneladas; camadas sobre papel - 1000 toneladas (VILPOUX & AVEROUS, 2003). Como este material é muito caro em relação aos plásticos sintéticos, seu uso não é competitivo e a indústria de plásticos comuns ainda continua crescendo muito nos dias de hoje. Sendo assim, é importante que se cuide do grande volume de plástico descartado no meio ambiente.

O objetivo deste capítulo é investigar a biodegradação de alguns dos polímeros sintéticos mais usados no dia a dia, cujo acúmulo crescente de resíduos no meio ambiente é um fator bastante preocupante. O enfoque principal será sobre o PVC, tanto pela sua importância tecnológica (o quinto mais utilizado no mundo) quanto por ser este o polímero principal do nosso estudo. Os outros polímeros serão polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliacrilatos, poli(vinil álcool) (PVA) e poli(éster-imida) (PEI).

2. Biodegradação ou Biotransformação

Biodegradação ou biotransformação de um material pode ser definida como um processo de modificação física ou química causada por atividade biológica, sob certas condições de calor, umidade, luz, pH e nutrientes minerais e orgânicos adequados (AMASS, 1998). Também é definida como um processo de conversão de um material, por microrganismos, a dióxido de carbono, água e biomassa, sob condições aeróbias ou a metano; dióxido de carbono e biomassa, sob condições anaeróbias (KRUPP & JEWELL, 1992; SWIFT, 1993). Se após o processo biodegradativo existir carbono residual considera-se que houve biodegradação parcial ou biotransformação, caso contrário, considera-se que houve mineralização do material (SWIFT, 1993).

Tratando-se de polímeros, foi sugerida a existência de três fatores principais envolvidos na ação microbiana (MADDEVER & CHAPMAN, 1989):

- *Efeito biofísico*, no qual o crescimento celular causa danos ao polímero.
- *Efeito bioquímico*, no qual as substâncias produzidas (polissacarídeos) pelos microrganismos agem sobre o polímero, e;
- *Efeito enzimático direto*, no qual as enzimas microbianas atacam os componentes do plástico, provocando quebras oxidativas da cadeia polimérica.

Destes, o efeito mais comum do microrganismo sobre o material polimérico é o biofísico, isto é, a ação biológica provocando mudanças nas propriedades físicas e mecânicas do polímero (YABANNAVAR & BARTHA, 1994).

A biodegradação de polímeros ocorre basicamente por dois mecanismos distintos, dependendo da natureza do polímero e do meio (SCOTT, 2000):

Hidrólise biológica - hidrólise catalisada por enzimas hidrolases. Certas enzimas proteolíticas (proteases) catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e outras catalisam a hidrólise de ligações éster (CHANDRA & RUSTGI, 1998). Este mecanismo é seguido pela oxidação biológica das cadeias poliméricas (catalisada pelas oxigenases), quebra das mesmas, gerando cadeias menores e bioassimilação destas pelos microrganismos. Este processo ocorre em polímeros contendo hetero-cadeias, tais como a celulose, o amido e os poliésteres alifáticos, dos quais os PHAs são típicos (SCOTT, 2000). Os grupos ésteres, destes polímeros, são facilmente hidrolisáveis pela ação enzimática das esterase de fungos (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Oxidação biológica – reação de oxidação na presença de oxigênio, com introdução de grupos peróxidos nas cadeias carbônicas, por ação das monooxigenases e dioxigenases, quebra das cadeias, seguida por bioassimilação de produtos de baixa massa molar, como ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas. Este mecanismo se aplica essencialmente à polímeros de cadeias carbônicas. Esta degradação pode ser controlada pelo uso apropriado de antioxidantes. Bioassimilação começa tão logo forem formados produtos de baixa massa molar no processo de peroxidação (CHANDRA & RUSTGI, 1998; SCOTT, 2000).

Em geral, a velocidade de hidrólise dos polímeros é controlada por várias propriedades incluindo estrutura, área superficial e morfologia. A susceptibilidade de polímeros à degradação enzimática é determinada pela relação entre propriedades e estrutura. Microrganismos secretam enzimas que promovem a cisão da cadeia polimérica em blocos moleculares menores, hidroxiácidos, que são utilizados como fonte de carbono para o crescimento destes microrganismos.

A biodegradação pode ser facilitada por aplicação de processos prévios de luz (UV) e/ou calor na matriz polimérica (XU & GUO, 1995). A presença de ligações hidrolisáveis ou oxidáveis na cadeia, uma estereoconfiguração correta, um balanço entre hidrofobicidade e hidrofilicidade e uma certa flexibilidade conformacional, são fatores que contribuem para a biodegradação do polímero (HUANG & EDELMAN, 1995).

Segundo Flemming (1998), que não utiliza o termo biodegradação e sim biodeterioração de materiais poliméricos, esta é causada por microrganismos que colonizam sua superfície, formando biofilmes, que em contato com os polímeros, causam mudanças estruturais e/ou morfológicas. Segundo Guo (2003), todas as superfícies, sob condições naturais ou artificiais, podem ser colonizadas por microrganismos, com formação de biofilme e deposição de material celular na superfície (“microfouling”). Polímeros orgânicos são suscetíveis à formação de biofilmes microbianos, sob condições úmidas, particularmente em climas tropicais (GUO, 2003).

A biodeterioração é um processo interfacial, em que os microrganismos atacam e colonizam as superfícies poliméricas na forma de biofilmes, os quais são uma mistura de microrganismos, água, polissacarídeos e proteínas, que em contato com o polímero sintético causam algumas modificações, entre elas (FLEMMING, 1998):

- Cobertura da superfície, mascarando suas propriedades superficiais e contaminando o meio adjacente;
- Aumento da dessorção de aditivos e monômeros para fora da matriz;
- Ataque ao polímero por enzimas;
- Acúmulo de água e penetração na matriz com filamentos microbianos, causando entumescimento e aumento de condutividade, e;
- Excreção de pigmentos microbianos lipofílicos que colorem o polímero.

A biodeterioração é então um processo muito complexo, que depende das condições do meio, dos tipos de microrganismos e da estrutura do polímero propriamente dito. Se o polímero for potencialmente biodegradável, isto é, com estrutura de cadeias alifáticas e grupos funcionais hidrolisáveis, o processo pode ocorrer sob certas condições do meio (pH, umidade, oxigênio etc.), de maneira mais direta por ação de enzimas: hidrólise e subsequente oxidação (AMASS & AMASS, 1998). Se o polímero não tiver grupos funcionais (apenas cadeias carbônicas) pode haver deterioração, mas não chegando à mineralização do polímero até os produtos finais: água e dióxido de carbono ou metano. A superfície polimérica pode, ainda, ser inerte

ao ataque microbiano, sendo apenas um suporte para o crescimento bacteriano (FLEMMING, 1998; GU, 2003).

Os microrganismos podem, então, agir de diferentes maneiras sobre a superfície polimérica: por *deposição de material extracelular*, excretado por eles (*fouling*); por *degradação de compostos extraídos (lixiviados)* do polímero, tais como, aditivos e monômeros, os quais servem de alimento e manutenção para o biofilme, como exemplo, podemos citar as cortinas de PVC usadas em boxes de banheiros, que perdem a flexibilidade pela perda de aditivos; por *corrosão*, isto é, pela ação do biofilme e de seu gradiente de pH e potencial de óxido-redução, que ajudam na deterioração do polímero. Corrosão deste tipo ocorreu em isolantes elétricos, poliuretanas, usados em vários equipamentos do aeroporto de Zurique, entre 1967 e 1969, completamente deteriorados pela colonização e penetração de fungos nos equipamentos (FLEMMING, 1998); por *hidratação e penetração*, devido a composição do biofilme (95% de água), ele se constitui um eletrólito e aumenta a condutividade na superfície do polímero e isto leva à falhas no funcionamento de equipamentos elétricos, por exemplo, crescimento de fungos em circuitos impressos, o que pode afetar a condutividade e causar curto-circuito. As hifas de fungos podem penetrar no material polimérico e provocar diminuição de sua estabilidade mecânica; podem colorir o filme polimérico, isto é, o biofilme pode conter microrganismos que produzem pigmentos lipofílicos que difundem na superfície da matriz polimérica (FLEMMING, 1998).

Para quantificar a biodegradação/biodeterioração têm sido empregados vários métodos físico-químicos, que ainda não são totalmente padronizados, pois tratando-se de interações entre microrganismos e superfícies poliméricas, que são processos complexos, é difícil a padronização dos métodos (PACI & La MANTIA, 1999).

2.1 Métodos usuais para avaliar a biodegradação/biotransformação

2.1.1 Plaqueamento em ágar

consiste de inoculação de espécies de microrganismos, na presença do polímero, sob condições favoráveis de crescimento. Remoção das espécies e testes para verificação de mudanças nas propriedades físicas ou químicas do material polimérico, isto é, após remover os microrganismos efetuam-se medidas de ensaios mecânicos, absorção na região do infravermelho e do UV-Visível, e análise de massa molar (Cromatografia por Exclusão de Tamanho- GPC) para verificar as possíveis alterações ocorridas no polímero (KUMAR *et al.*, 1992).

2.1.2 Utilização de regentes marcados com ^{14}C

Método que distingue o CO_2 produzido no metabolismo do polímero marcando com C^{14} do CO_2 gerado por outras fontes de carbono, como as do solo (se o polímero

estiver em coluna de solo) ou as do meio de cultura (se o polímero estiver incubado em meio de cultura e microrganismos) (KUMAR *et al.*, 1992).

2.1.3 Enriquecimento do solo

Este método isola espécies que crescem sobre o polímero, ou seja, utiliza a incubação do filme polimérico em solo, durante um certo tempo e depois separa os microrganismos que se desenvolveram na presença do filme. Estes são então incubados em meio de cultura apropriada e com o filme, durante um tempo, para que ocorra a interação. Após isto o filme é retirado e são analisadas suas propriedades mecânicas e físico-químicas (KUMAR *et al.*, 1992).

2.1.4 Teste “*in vitro*”

Envolve dois métodos biológicos quantitativos: a respirometria, em que a atividade do microrganismo é medida por meio da absorção de O₂ ou liberação de CO₂, captado sobre KOH ou sobre Ba(OH)₂ (método de Sturm) (LEHNINGER *et al.*, 1993); e a perda de massa da amostra, em que mede-se a massa do polímero antes e após o tratamento microbiano (KUMAR *et al.*, 1992, ROSA & PÂNTANO-FILHO, 2003).

Além das medidas de ensaios mecânicos para se testar o polímero tratado microbiologicamente, empregam-se ainda medidas do conteúdo de plastificante de certos polímeros após o tratamento microbiano, para avaliar as mudanças nas suas propriedades do polímero (YABANNAVAR & BARTHA, 1994).

Na avaliação da biodegradabilidade de plásticos, também se utiliza o **teste de zona clara** em meio ágar sólido (AUGUSTA *et al.*, 1993). O meio sólido contém partículas de polímeros suspensos, ou um pedaço do filme polimérico, e o inóculo de uma espécie de bactéria ou fungo sobre o polímero. A formação de uma zona clara, distinta, de área circular, indica a degradação do polímero em moléculas menores e solúveis ao redor da colônia. Este processo depende da excreção de enzimas extracelulares, da sua difusão através do meio e da interação entre as enzimas e o polímero (AUGUSTA *et al.*, 1993). Esta interação não só está relacionada a fenômenos superficiais, tais como a adesão, e à conversão química propriamente dita (Augusta *et al.*, 1993). A adesão da bactéria a superfícies (PVC, TEFLON) torna-se um fator de proteção da bactéria aderida, que contrabalança o efeito esperado pela ação de certos bactericidas (VESS *et al.*, 1993). A interação de microrganismos com materiais de embalagens de PVC deve-se à sua hidrofobicidade, atividade lipolítica e à capacidade de adesão, o que pode ser a causa do mau cheiro de certas garrafas de água mineral (GUERZONI *et al.*, 1994).

Uma vez que a interação entre microrganismos e polímeros inicia-se pela superfície, são empregadas técnicas específicas e usuais para investigar alterações na superfície polimérica, dentre elas destacam-se: a espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), a microscopia eletrônica de varredura (MEV), o ângulo de contato e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e com refletância atenuada (RATNER *et al.*, 1993).

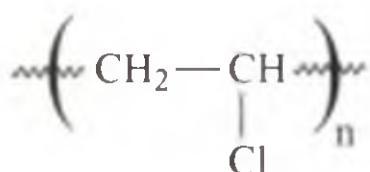
Os polímeros sintéticos, isto é, obtidos através de reações químicas de polimerização (adição ou condensação) em laboratório, são muito comumente empregados como artigos de embalagens, brinquedos, bandejas, copos, canos, vasos, pratos, utensílios domésticos, cds, tintas, cobertores, mangueiras, fios, e uma variedade de artigos para carros, computadores, construções, entre outros (ANON, 1997, WAN *et al.*, 2001). Alguns dos polímeros a serem destacados aqui, pelo seu grande consumo, e dos quais vamos investigar as possibilidades de transformação sob ação de microrganismos serão comentados nos itens a seguir, sendo dada ênfase ao PVC, objeto principal de nosso estudo.

2.2 Biodegradação de polímeros sintéticos

2.2.1 Poli(cloreto de vinila) (PVC)

O PVC ocupa um lugar de destaque na indústria mundial de plástico, sendo que o Japão e os Estados Unidos utilizam preferencialmente o polietileno (MESSADI & GHEID, 1994; SENOUNE & VERGNAUD, 1993). Tecnologicamente, é um polímero muito importante devido a sua ampla utilização na obtenção de canos de tubulações, brinquedos, conduites, recipientes e filmes plásticos (KÜSTER, 1979).

Sua fórmula estrutural é:



Geralmente, o PVC comercial contém plastificantes para melhorar sua flexibilidade e sua utilização (DANIELS, 1989). Seu descarte é problemático, pois a incineração comum leva à produção de cloreto de hidrogênio, entre outras substâncias tóxicas (CARLSSON *et al.*, 1998). Ao lado disso, os aterros sanitários têm disponibilidade limitada (TORIKAI & HASEGAWA, 1999). Além da incineração de resíduos plásticos, são utilizados dois outros métodos de tratamento: a reciclagem e a biodegradação, sendo a reciclagem de emprego limitada, devido à degradação do material durante o processo e à biodegradação, um método de difícil controle (PACI & MANTIA, 1999).

Polímeros não-hidrolizáveis, como o polietileno (PE) e o PVC, quando degradados, produzem diferentes quantidades de centenas de produtos, o que dificulta a análise posterior (KARLSSON & ALBERTSSON, 1995). A fotodegradação do PVC pode facilitar sua interação com microrganismos, pela formação de grupos carbonílicos e polienos na matriz polimérica (VERONEILLI *et al.*, 1999).

Trabalhos anteriores mostraram que filmes de PVC, plastificado, sofreram biodeterioração de até 27% da cadeia carbônica, com produção de CO₂ (YABANNAVAR & BARTHA, 1993). PVC plastificado com sebacato de di-isso-

octil perdeu até 20% de sua massa quando tratado com *Pseudomonas* e *Brevibacterium*, durante 2 semanas em laboratório (BOOTH *et al.*, 1968).

Um estudo de filmes de PVC, tratados com fungos da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus versicolor* e *Pleurotus sajor caju*, em meio líquido, aerado, concluiu que o oxigênio tem um efeito significativo no decréscimo de ligações C-H da cadeia de PVC. Um aumento das ligações C-Cl da macromolécula foi observado na ausência e presença de oxigênio (KIRBAS *et al.*, 1999). Este aumento foi atribuído ao acoplamento de átomos de cloro ao conteúdo do meio, ao invés de cadeias de C-H quebradas pelo processo da biodegradação (KIRBAS *et al.*, 1999).

Filmes finos de PVC, sem plastificantes, tratados com suspensão dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trogia buccinalis*, a 28°C, durante 60 dias, apresentaram mudanças na aparência (mais opaco e mais rígido), de morfologia (aparecimento de bolhas e crateras na superfície) verificadas por MEV e mudanças estruturais (presença de grupos carbonílicos, a 1730 cm⁻¹ e polienos, a 1580 cm⁻¹) verificadas por medidas de infravermelho dispersivo (Figura 2 e 3, respectivamente). Estas alterações foram atribuídas à saída de HCl (desidrocloração) da macromolécula e oxidação das cadeias (NICOLETI, 2002; FRANCHETTI & NICOLETI, 1999).

Filmes de PVC de 40 µm de espessura, foram tratados com chorume, líquido escuro, rico em microrganismos (extraído de lixões municipais) e apresentaram

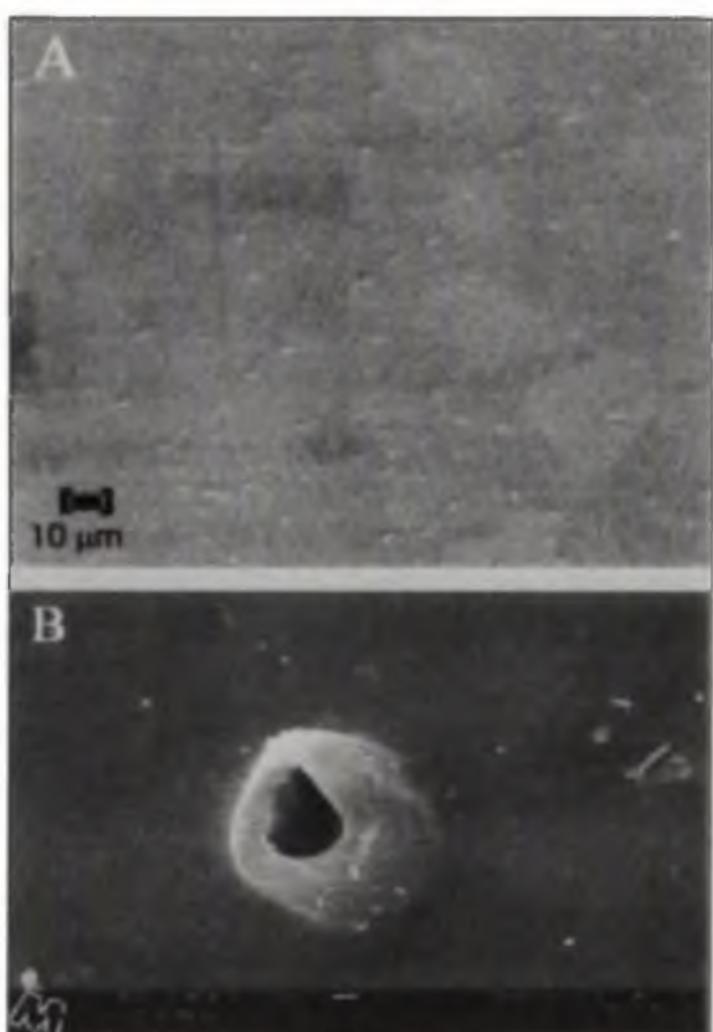


FIGURA 2. MEV de filmes de PVC. A) original. B) biotratado com *P. chrysosporium* (28°C, 60 dias) (5000X).

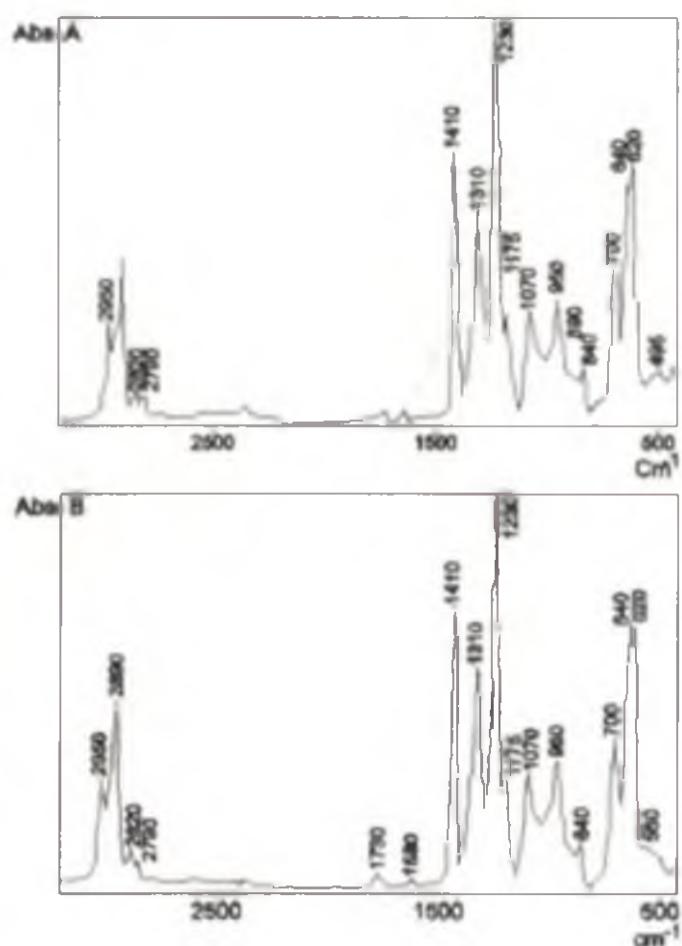


FIGURA 3. FTIR de filmes de PVC. A)original. B) biotratado com *P. chrysosporium* (28°C, 60 dias).

modificações morfológicas e estruturais importantes (MARTINS-FRANCHETTI *et al.*, 1999; MARTINS-FRANCHETTI & MUNIZ, 2002). Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram observadas alterações na superfície do PVC, isto é, aparecimento de bolhas indicativas do processo biodegradativo (perda de HCl da matriz de PVC) (Figura 4). Medidas de infravermelho (FTIR) mostraram mudanças nos espectros dos filmes: original e biotratado com chorume em meio líquido, enriquecido com peptona a 1%, com deslocamentos de algumas bandas principais, tais como: de 640 para 655 cm⁻¹, 640 para 630 cm⁻¹, que se relacionam à vibração de grupos C-Cl, na cadeia de PVC (Figura 5) (MARTINS-FRANCHETTI *et al.*, 1999).

Filmes de PVC (40 µm) previamente tratados com luz (UV – 10 h) ou calor (estufa a 130°C, por 1,30 h) e depois com microrganismos do solo (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus fumigatus*), mostraram alterações nos espectros de absorção na faixa do UV-Visível (UV-Vis) (Figura 6) (CAMPOS, 2004, CAMPOS & MARTINS-FRANCHETTI, 2005).

Quando os filmes de PVC foram foto e termotratados, separadamente, observou-se mudanças espectrais, isto é, aparecimento de banda de carbonila a 280 nm (Figura 6-A) e aparecimento da banda larga de polienos, na faixa de 400 a 700 nm (Figura 6-B). Quando o filme de PVC foi submetido somente ao biotratamento, não se observou alterações espectrais significativas. Entretanto, quando os filmes

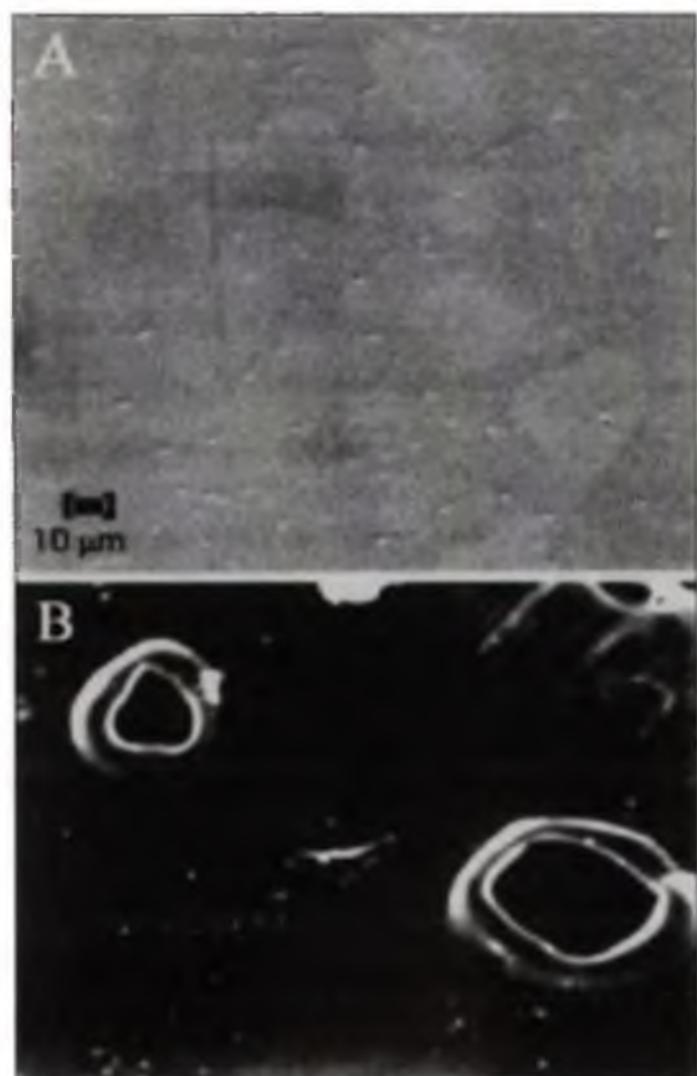


FIGURA 4. MEV de filmes de PVC. A) filme original. B) filme biotratado com chorume (32°C, 20 dias).

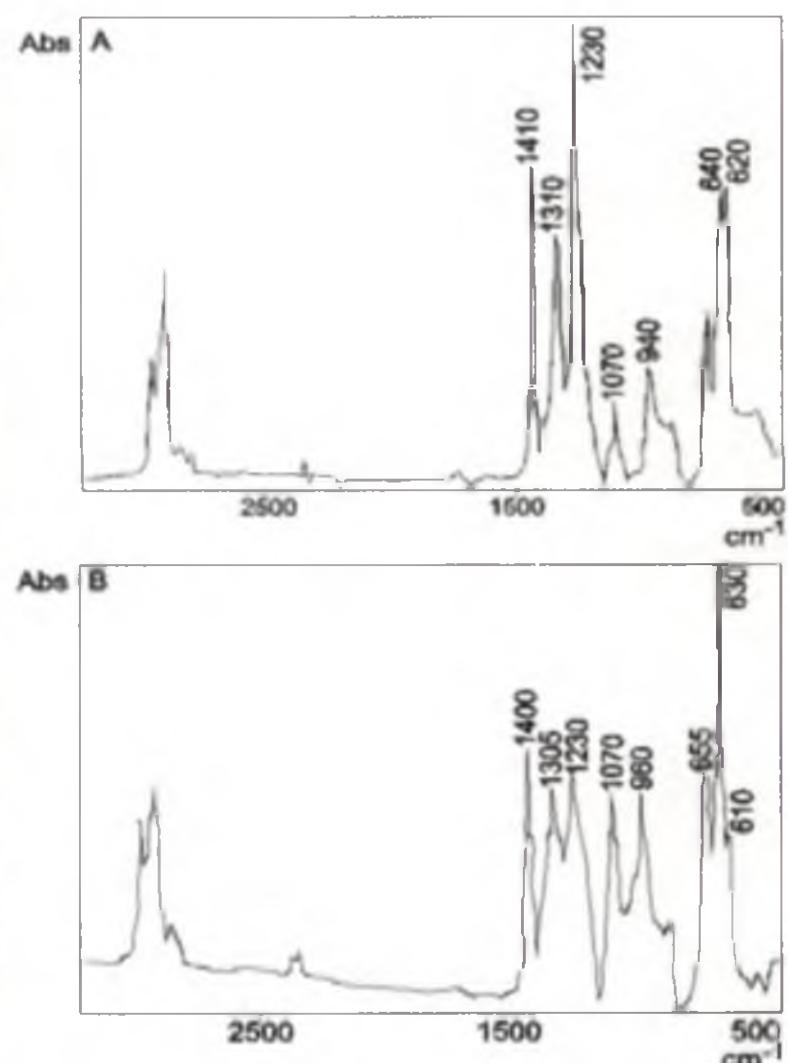


FIGURA 5. FTIR de filmes de PVC. A) filme original. B) filme biotratado com chorume (32°C, 20 dias).

foto e termotratados foram submetidos ao tratamento biológico, ocorreram mudanças espectrais mais efetivas que as produzidas pelo tratamento microbiano apenas (CAMPOS, 2004; CAMPOS & MARTINS-FRANCHETTI, 2005).

Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de PVC foto, termo e biotratados são apresentadas na Figura 7 (CAMPOS, 2004; CAMPOS *et al.*, 2004).

Da análise destes resultados fica evidente a presença de alterações significativas na morfologia dos filmes de PVC, submetidos a diferentes tratamentos e a pré-tratamentos: calor e luz e subsequente biotratamento. Há formação de bolhas e relevos nos filmes foto, termo e bio-tratados, destacando-se uma formação peculiar na superfície do filme termo-biotratado, semelhante à hifas microbianas (Figura 7-E). Esta adesão parece ser favorecida pelo pré-tratamento com calor, que altera a estrutura do PVC, com a perda de HCl e formação de polienos na matriz de PVC (aparecimento de banda larga no visível, Figura 6-B).

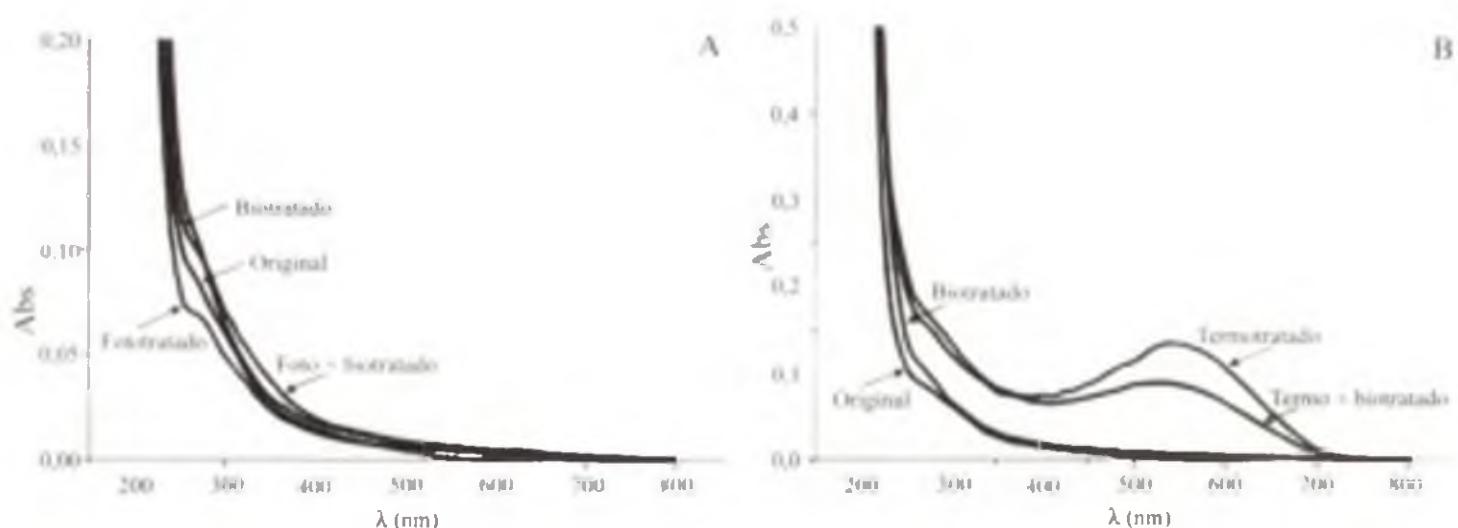


FIGURA 6. UV-Vis de filmes de PVC. A) filme fototratado (UV 10h) e biotratado (32°C, 4 meses). B) filme termotratado (130°C, 1,30h) e biotratado (32°C, 4 meses).

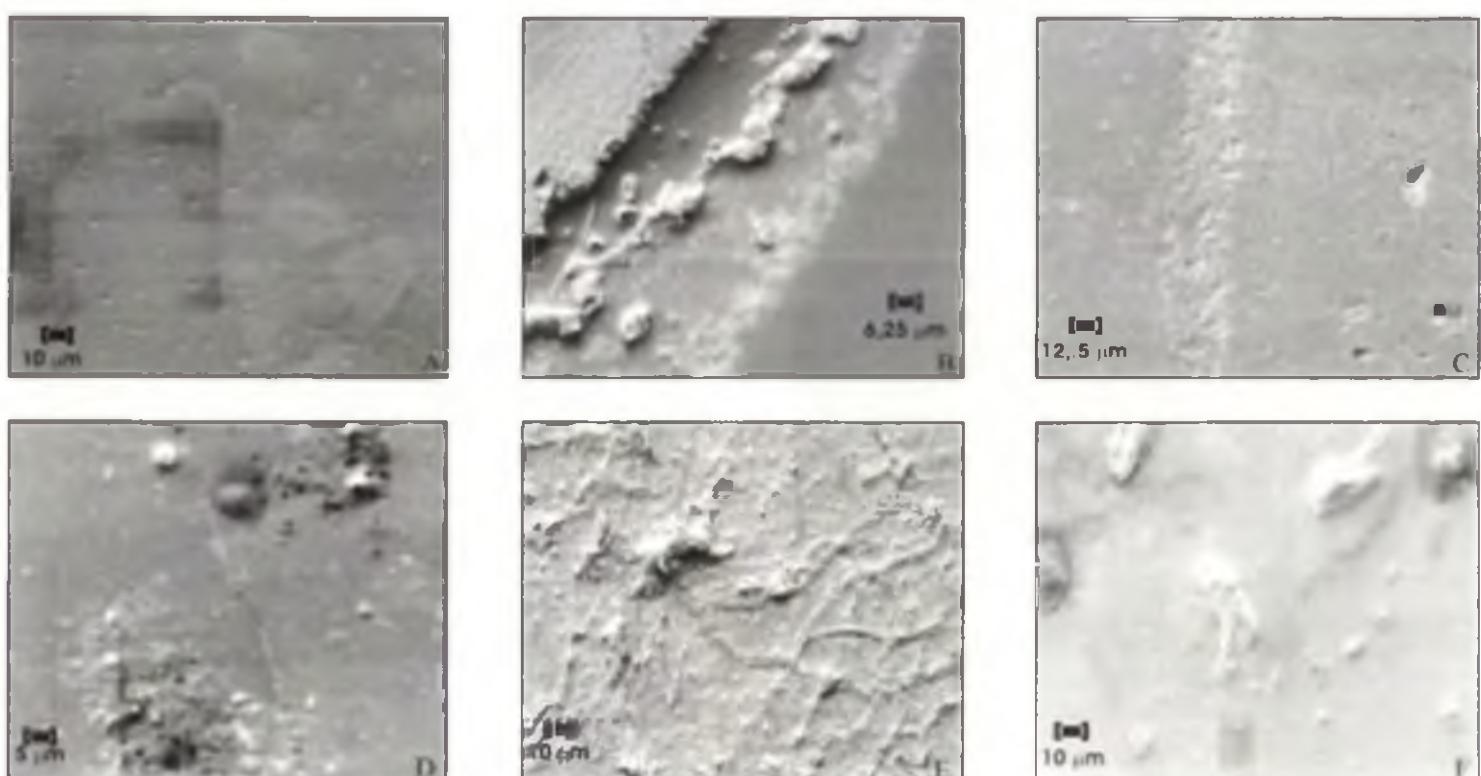


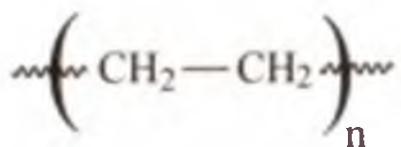
FIGURA 7. MEV de filmes de PVC: A) original (500 X). B) fototratado (UV 10h) (800 X). C) biotratado (32°C, 4 meses) (400 X). D) termotratado (130°C, 1,30h) (1000 X). E) termo/biotratado (500 X). F) foto/biotratado (500 X).

O PVC, na forma de filmes finos, é um polímero suscetível à ação microbiana, por certos fungos, sendo esta ação (adesão e modificação estrutural) melhorada por pré-tratamentos com calor e UV.

2.2.2 Polietileno (PE)

É um dos polímeros mais consumidos pela indústria de embalagens de sucos de fruta, leite, água, materiais hospitalares, brinquedos etc. Este material apresenta grande durabilidade (AGUIAR, 1999) e resistência à biodegradação, devido à suas características hidrofóbicas, o que impede a ação de enzimas microbianas, que necessitam do meio hidrofílico (OHTAKE *et al.*, 1998a).

Sua fórmula estrutural é:



Em estudos de fragmentos de filmes poliméricos de PE de baixa densidade, previamente termodegradados, e posteriormente incubados em amostras de solo e de lodo ativado, durante 70 dias, foi observada oxidação significativa em ambos os meios, através da diminuição da massa molecular (JONES *et al.*, 1974).

Estudos realizados com amostras (frascos de maionese) de polietileno de baixa densidade (LDPE), enterradas em solo bioativo, durante 32 a 37 anos, mostraram características de biodegradação, isto é, degradação oxidativa (material bastante opaco) e mudança na massa molar do polímero, quando foram analisados espectros de infravermelho da superfície da amostra (FTIR) e resultados de cromatografia de exclusão por tamanho (GPC) (OHTAKE *et al.*, 1995; 1998a). Filmes de embalagens (Yakult) de LDPE, deixados por um longo tempo no sol e enterrados em solo, durante 3 a 5 anos, apresentaram sinais de biodegradação, verificadas por FTIR. Esta degradação por microrganismos do solo foi influenciada pela fotodegradação anterior, que tornou a superfície do filme hidrofílica e mais apta à ação microbiana (OHTAKE *et al.*, 1998b).

Este polímero de difícil biodegradação tem sido misturado, usualmente, com amido de milho para melhorar sua interação com os microrganismos presentes na natureza (em rios e solo) (ARÉVALO-NINO *et al.*, 1996; COLE & LEONAS, 1991). A biodegradação do PE-amido inicia pelo ataque ao amido que, consequentemente, acelera a oxidação química do PE (KLEMCHUCK, 1990; ARÉVALO-NINO *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1991).

Filmes de PE de baixa massa molar, de 80 µm de espessura, contendo amido e submetidos a pré-tratamentos térmicos e fotooxidativos apresentaram melhor degradação pelos microrganismos do meio ambiente do que filmes não pré-tratados. Isto sugere que luz do sol, calor, oxigênio favorecem a formação de radicais livres na matriz polimérica que atacam a estrutura molecular do PE, reduzindo sua massa molar e facilitando o ataque microbiano ao polímero modificado (ALBERTSSON *et al.*, 1992).

Amostras de PE-amido foram tratadas com uma mistura de fungos de solo, sendo que 4 comunidades aerófilas de fungos conseguiram crescer neste tipo de plástico, na ausência de outra fonte de carbono (CACCIARI *et al.*, 1993).

Filmes de PE-amido (de arroz e batata) apresentaram sinais de biodegradação, com conteúdo de amido de mais de 30%, apesar do efeito adverso de suas propriedades mecânicas (ARVANITOYANNIS *et al.*, 1998).

Amostras de LDPE, termotratadas e depois biotratadas com os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium pinophilum*, durante 31 meses, em meio de cultura líquido, sofreram significativas mudanças morfológicas e estruturais (VOLKE-SEPÚLVEDA *et al.*, 2002).

Filmes de LDPE biotratados com a bactéria *Brevibacillus borstelensis*, em meio de cultura líquido, a 50°C, durante 30 dias, apresentaram redução nas suas massas gravimétricas e molares por 11 e 30%, respectivamente. Esta bactéria também degradou LDPE na presença de manitol (HADAD *et al.*, 2005).

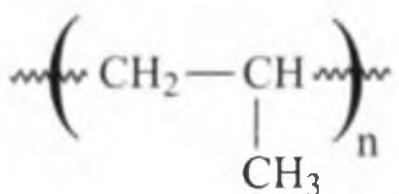
Sabe-se que o número de filmes de polietileno biodegradável (com aditivos suscetíveis à oxidação: amido, açúcares, anidridos) está crescendo no mercado, mas sua degradação depende do sistema pró-oxidante incorporado à cadeia. Apesar destes filmes de polietileno serem denominados de biodegradáveis, fica difícil classificá-los em biodegradáveis e quantificar seu estado de degradação, uma vez que dependem do aditivo incorporado à cadeia polimérica e das condições do processo biodegradativo (BURMAN & ALBERTSSON, 2005).

O PE é de difícil biodegradação, a não ser que misturado à espécies hidrolizáveis (pró-oxidantes), que sofrendo pré-tratamentos térmicos ou fotoquímicos, tornam a matriz polimérica mais apta à ação microbiana (oxidação da cadeia).

2.2.3 Polipropileno (PP)

Este polímero se assemelha ao polietileno quanto às propriedades químicas e físicas: fácil moldagem, elevada resistência química, baixo custo, boa resistência ao impacto e boa estabilidade térmica. É muito utilizado na fabricação de embalagens, brinquedos, produtos farmacêuticos, produtos médicos e cosméticos, peças automotivas; partes de máquinas de lavar etc. Também é de difícil biodegradação quando descartado no meio ambiente.

Sua fórmula estrutural é:



Fragmentos de filmes de PP, inicialmente fototratados e depois incubados em solos e em lodo ativado, durante 70 dias, apresentaram biodegradação, mas não eficiente como o PE. No caso do PP a presença de carbonos terciários dificulta a ação enzimática (JONES *et al.*, 1974).

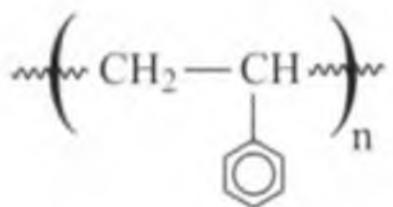
Fitas de PP puro foram incubadas em meio mineral líquido contendo lactato e glicose, durante 5 meses. Após este período observou-se redução das massas molares das amostras de PP analisadas por cromatografia líquida e gasosa e a presença de uma mistura de hidrocarbonetos de diferentes grupos funcionais, analisadas por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (CACCIARI *et al.*, 1993).

O PP é um polímero resistente à ação microbiana devido à presença de carbonos terciários em sua estrutura, mesmo sofrendo pré-tratamento por UV.

2.2.4 Poliestireno (PS)

O poliestireno, outro plástico de embalagens, também utilizado como isolante em frigoríficos, videocassetes e dominante na sociedade, tem sido preparado com adição de amido (copolimerização) ou de grupos funcionais na cadeia para facilitar sua degradabilidade.

Sua fórmula estrutural é:



Fragmentos de PS inicialmente fotoirradiados e depois incubados em solo e lodo ativado, por 70 dias, apresentaram resistência à biodegradação; sua estrutura aromática dificulta a quebra enzimática e, portanto sua biodegradação (JONES *et al.*, 1974). Outro fator que dificulta a biodegradação deste polímero e de outros sintéticos em solos é a adsorção das substâncias excretadas pelos microrganismos no solo, ou melhor, é a inativação parcial de enzimas nas argilas, alterando sua atividade e a baixa concentração de nitrogênio e fósforo, nutrientes importantes aos microrganismos (JONES *et al.*, 1974).

PS tratado com 17 espécies de fungos, em culturas axênicas, não apresentou biodegradação, quando monitorada pelo desenvolvimento de $^{14}\text{CO}_2$ (KAPLAN *et al.*, 1979).

Copolímeros de Poliestireno-lignina (lignopoliestireno ou LPS) foram submetidos a biotratamento com fungos basidiomicetos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus*, em meio líquido, a 25°C, durante 68 dias e analisados por perda de massa e por MEV. Nestas condições não houve biodegradação das amostras de PS, entretanto, houve deterioração das amostras de LPS. Estas sofreram degradação mais eficiente em suspensão do fungo *P. chrysosporium*, sendo maior a eficiência em amostras com 32 e 50 % de lignina e destas a maior degradação foi com a mais concentrada em lignina (MILSTEIN *et al.*, 1992).

Outro trabalho mostrou que amostras de PS enterradas em solo e expostas em placas de propagandas (“outdoors”), durante 6 meses, não apresentaram sinais

de degradação. Entretanto, nas amostras de PS-amido, enterradas em solo, houve deterioração das áreas contendo amido, detectadas através de microscopia eletrônica de varredura (KIATKAMJORNWONG *et al.*, 1999). As amostras de PS-amido expostas em “outdoor” deterioraram rapidamente. As amostras de PS (sem amido) demoram muito para degradar no solo e em exposições à luz e ar (KIATKAMJORNWONG *et al.*, 1999). Como os microrganismos consomem o amido, o material perde a sua integridade estrutural, possibilitando outros mecanismos de degradação e consequentemente deterioração das propriedades mecânicas do polímero (KIATKAMJORNWONG *et al.*, 1999).

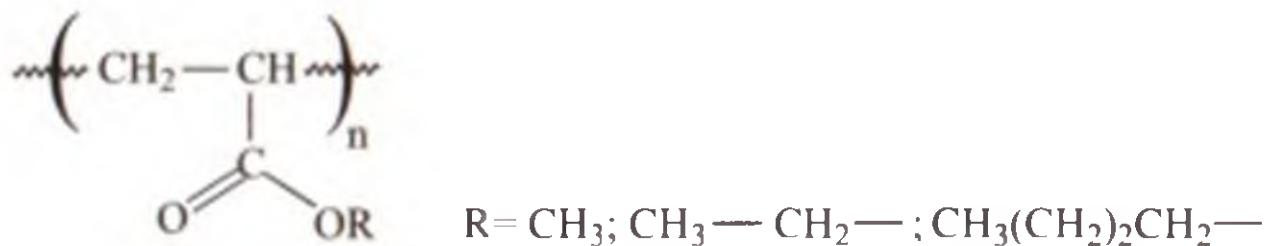
Em outro estudo, amostras do copolímero de PS com anidrido maleico: poli (estireno-co-anidrido maleico) - ligados com pequenas quantidades de glicose, lactose ou sacarose, sofreram biotransformações, monitoradas por redução de massa molar (GPC) e por infravermelho (FTIR) (GALGALI *et al.*, 2002).

Este polímero é de difícil degradação por microrganismos devido à sua estrutura aromática, que inibe a ação enzimática dos microrganismos; entretanto, pode sofrer biotransformações quando ligado à espécies moleculares, tais como: amido, anidrido maleico, lignina, passíveis de sofrerem a ação enzimática.

2.2.5 Polímeros acrílicos

Estes polímeros são muito usados em lentes de óculos e na proteção de peças de museus. São mais transparentes que o vidro, transmitem cerca de 92 % de luz. Os principais acrílicos são: poli(metacrilato de metila) (PMMA), poliacrilatos superabsorventes (PAS), poli(acrilamida) (PAAm), poli(acrilonitrila) (PAN) etc.

Sua fórmula estrutural é:



Poli (metacrilato de metila) tratado com *A. pullulans* sofreu degradação de 0,1% em 35 dias, monitorada por medidas da quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ (KAPLAN *et al.*, 1979).

Amostras de mármore, carrara e travertino (Itália), foram tratadas com polímeros acrílicos, como protetores contra o ataque de cianobactérias e algas. Medidas de MEV e ângulo de contato mostraram que estes materiais submersos em água sofreram degradação rápida, não tendo um efeito protetor a longo prazo (NUGARI & PIETRINI, 1997).

Os polímeros acrílicos reticulados, superabsorventes são utilizados, atualmente, na confecção de fraldas descartáveis e absorventes higiênicos, pois têm grande capacidade de absorver líquidos e formar géis. Estes polímeros sintéticos foram tratados com culturas de fungos da podridão branca, durante 15-18 dias, sendo mineralizados a CO_2 , e metabólitos solúveis em água e atóxicos para o fungo A biodegradação dos

polímeros foi observada apenas em culturas pobres em nitrogênio (SUTHERLAND *et al.*, 1997). Estudos de biodegradação deste tipo de polímeros foi realizado em solo, com o fungo *P. chrysosporium* por Stahl *et al.* (2000), que concluíram que os microrganismos de solo não solubilizam os polímeros, e sim, cooperam com o *P. chrysosporium*, isto é, este solubiliza o polímero, e os fungos do solo estimulam sua mineralização.

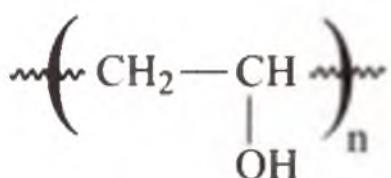
Vários polímeros de acrilamida (AAm) e ácido acrílico (AA) e copolímeros contendo sítios de grupos fenólicos (guaicol, sulfonato de lignina-SL e ácido dihidroxibenzóico-ADHB) foram investigados quanto à biodegradação com fungos da podridão branca: *P. ostreatus* foi mais eficiente que *P. chrysosporium* na degradação (diminuição da massa molar média- M_w) dos polímeros e copolímeros, sem grupos fenólicos. *P. chrysosporium* é capaz de reduzir a M_w de poli (SL/AA). *P. ostreatus* e *Trametes versicolor* não são eficientes na degradação de copolímeros de AAm e AA e terpolímeros de AAm, AA e grupos fenólicos (MAI *et al.*, 2004).

Os poliacrílicos sofrem adesão e biodegradação por fungos de solo, principalmente os fungos de podridão branca, e também são biodegradados em água, pela ação de cianobactérias e algas.

2.2.6 Poli (vinil álcool) (PVA)

O PVA é um polímero hidrofílico e biodegradável, muito empregado na indústria de cosméticos, desinfetantes, adesivos à prova d'água, fibras têxteis, cosméticos e embalagens hidrossolúveis.

Sua fórmula estrutural é:



Estudos detalhados da degradação do PVA, que começaram na década de 70 por Watanabe *et al.* (1975, 1976) e Sakai *et al.* (1986), identificaram uma enzima extra-celular como oxidase de álcool secundário (OAS), tendo como base o consumo de O_2 e produção de H_2O_2 . Outro estudo sugere que AOS quebra PVA oxidado em meio de cultura de espécies de *Pseudomonas* (MORITA & WATANABE, 1977). Enzimas isoladas da degradação de PVA oxidado de meios de cultura de três diferentes bactérias de solo, incluindo *Pseudomonas* e *Brevibacterium incertum*, confirmaram a participação ativa de hidrolases na biodegradação do PVA (SAKAI *et al.*, 1981). A hidrólise de PVA oxidado não exige O_2 e induz à redução da viscosidade da solução, com diminuição do pH e aumento do conteúdo de compostos de ácidos carboxílicos (SAKAI *et al.*, 1981).

Shimao *et al.* (1983) e Sakazawa *et al.* (1981) observaram a ação simbiótica de dois tipos de bactérias: *Pseudomonas putida* V15A e *P. sp.* VM 15C, coletadas em lodo ativado de efluentes têxteis e de indústrias de corantes. Uma destas linhagens fornece um fator de crescimento para que a outra metabolize o PVA. Nesta

degradação, duas enzimas são envolvidas: as oxidases e as hidrolases. Os grupos OH do PVA são desidrogenados pelas oxidases para formar β -hidroxicetonas e β -dicetonas, que são prontamente hidrolisados pelas hidrolases (MORI *et al.*, 1996).

Pseudomonas vesicularis metaboliza PVA pela oxidação de grupos hidroxilas por OAS, seguida pela hidrólise de dicetonas formadas por hidrolases específicas (SAKAI *et al.*, 1998).

Matsumara *et al.* (1999) isolaram uma enzima degradadora de PVA, PVA-desidrogenase (PVADH) da degradação de PVA por *Alcaligenses faecalis* (KK314)

PVA também foi degradado por duas bactérias simbiontes: *Cardiobacterium* sp. (SB68) e outra não identificada (LEE & KIM, 2003). *Achromobacter cholinophagum* SB98 (SB98) degradou PVA, em 46 dias, mineralizando 75% de PVA, cuja concentração inicial era de 0,01%, sendo que esta degradação foi medida pelo método de Sturm modificado (LEE & KIM, 2003).

PVA também foi degradado por fungos, sendo um deles o *Phanerochaete chrysosporium*, que promove a biodegradação do PVA pela ação da peroxidase lignina (PLi), sendo que o primeiro estágio de sua degradação ocorre principalmente na fase amorfa do PVA, com formação de grupos carbonílicos e insaturações nas cadeias, bem como decréscimo na massa molar média do PVA em 80% (MEJÍA, *et al.*, 1999). Parece que a degradação enzimática por PLi ocorre por formação inicial de um cátion radical, envolvendo reações de óxido-redução e espécies como álcool veratrílico, H_2O_2 e enzima férrica como co-substratos (MEJÍA *et al.*, 1999).

PVA, 88% hidrolizado, foi assimilado por leveduras tais como: *Sacharomyces*, *Lipomyces* e *Rhodotorula* spp., em meio de cultura na presença e ausência de ácidacético e seus sais e ésteres (NISHIKAWA & HASEGAWA, 1977a,b). Outro fungo, *Geotrichum fermentans* em associação com a bactéria *Bacillus megaterium* agiram sinergisticamente para degradar PVA a oligômeros. Neste trabalho foi sugerido que as oxidases da bactéria iniciam a degradação que continua com as reações catalizadas pela álcool desidrogenase produzida pelo fungo (MORI *et al.*, 1996).

Outros materiais de PVA com amido, na presença de uréia e glicerina (plastificantes), sofrem perda de massa, de 38 a 73%, em 18 dias, quando no meio de microrganismos, bem como diminuição das propriedades mecânicas. Medidas de microscopia eletrônica de varredura mostraram a presença de buracos esféricos na superfície das amostras. Durante a biodegradação os plastificantes e o amido são consumidos com as estruturas amorfas do PVA (TUDORACHI *et al.*, 2000).

Chiellini *et al.* (2003), investigaram a biodegradação de várias amostras de PVA, com diferentes graus de saponificação (grupos acetil presentes), concluindo que este fator não influencia o processo biodegradativo do PVA.

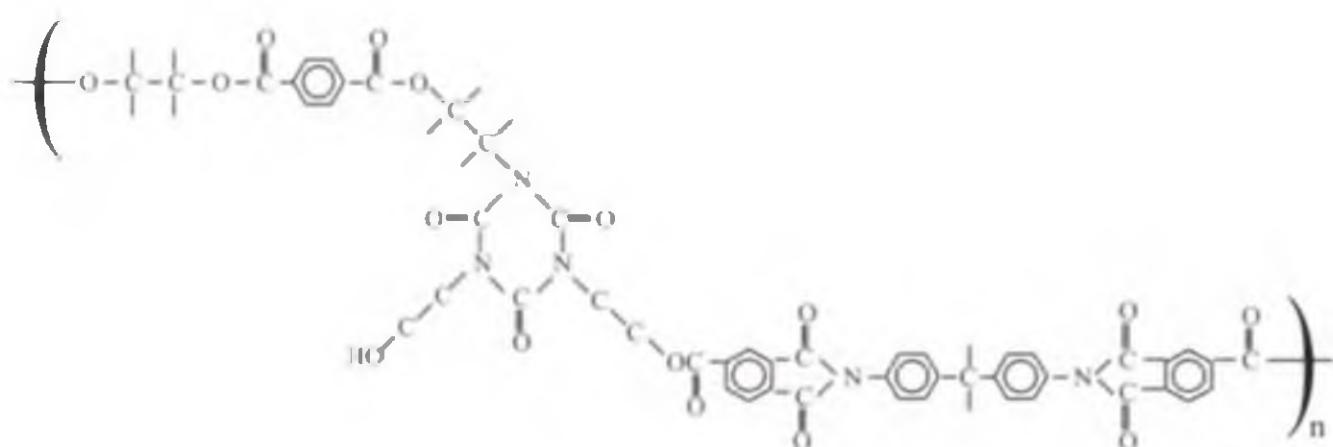
Existem muitos trabalhos que enfocam o PVA modificado por outras substâncias, tais como, ácido oxálico, anidrido ftálico, amido, colágeno, que sofre ação biodegradativa através destas substâncias hidrolizáveis (ZENI *et al.*, 2004; OZAKI *et al.*, 2005; GUOHUA *et al.*, 2005; LESINSKY *et al.*, 2005).

O PVA, dentre os polímeros sintéticos aqui descritos, é o que apresenta maior potencial de biodegradação na presença de fungos e bactérias.

2.2.7 Poli(éster-imida) (PEI)

O PEI é um poliéster muito utilizado como revestimento de fios de cobre (isolante elétrico), sendo utilizado em testes de biodegradação pelo nosso grupo, por ser um polímero muito resistente, com grande capacidade de formar filmes protetores sobre superfícies, mas pouco investigado na área de biodegradação.

Sua fórmula estrutural é:



Tratamentos de filmes de poliéster-imida (PEI), um polímero usado para recobrir fios de cobre (em várias camadas), possibilita a observação da ação de microrganismos do solo sobre o polímero, e, portanto, mudanças em suas propriedades elétricas e térmicas (GIANCARLO, 2004). Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) (Figura 8) ilustram a adesão de hifas dos fungos *Paecilomyces* sp nos filmes de revestimento PEI, dos fios de cobre, tal como o efeito físico discutido por Maddever & Chapman (1989) e a adesão discutida por Flemming (1998) (SONCINI, et al., 2003; SONCINI, 2004). A Figura 9 mostra as camadas de PEI rompidas e separadas e exposição do metal, após o biotratamento com um basidiomiceto desconhecido, a 30°C, por 90 dias (SONCINI, 2004).



FIGURA 8. MEV de filmes de PEI biotratados em meio sólido de Sabouraud e Extrato de malte. A) *Paecilomyces* sp (30°C, 3 meses) (125 X). B) *Paecilomyces* sp (30°C, 3 meses) (500 X).

Este polímero sofreu extensa adesão de fungos específicos, que modificaram sua morfologia (MEV) e propriedades elétricas (medidas elétricas segundo a norma-NBR 13936) (ABNT, 1997). Através de medidas de FTIR, dos filmes de PEI, antes e após o tratamento microbiano, parece não ter sofrido biodegradação, isto é, cisão de cadeias e formação de novos grupos funcionais, cuja presença poderia ser detectada por FTIR (SONCINI et al., 2003). É possível ainda que outra metodologia possa medir a mudança que

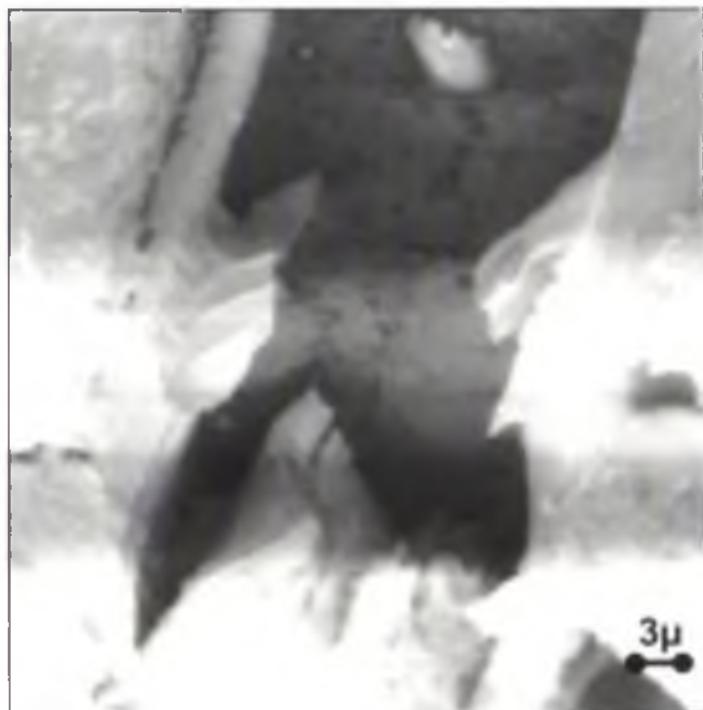


FIGURA 9. MEV do filme de PEI biotratado com basidiomiceto não identificado, em meio sólido de Sabouraud e Extrato de malte, a 30°C, por 3 meses (2000X) *OBS:* Aparecimento de diversas camadas de PEI, separadas, expondo a superfície do metal.

ocorreu na cadeia polimérica, ou seja, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), que é sensível para monitorar a constante dielétrica de polímeros. Esta medida pode apresentar diminuição da constante dielétrica do polímero, indicando falha na resistividade (Gu, 3003). Esta falha, neste caso, está relacionada à deterioração do polímero devido à adesão do biofilme em sua superfície (GU, 2003).

3. Considerações finais

Os polímeros sintéticos focados neste estudo (polietileno, polipropileno, poliestireno, poliéster-imida) apresentam uma grande resistência à ação microbiana; outros como os poliacrílicos e o PVC sofrem extensa adesão de microrganismos em sua superfície, sendo que o primeiro deles sofre biodegradação significativa. O PEI sofre adesão de hifas microbianas e rompimento de camadas de polímeros. Por outro lado, o poli(vinil álcool), entre os polímeros sintéticos, é considerado biodegradável, pois sofre significativa ação enzimática e mineralização (cisão da cadeia e transformação em CO₂ e H₂O).

A mistura destes polímeros não biodegradáveis, com substâncias degradáveis pela ação microbiana, também denominadas pró-oxidantes (amido, lignina, anidrido maleico, sacarose), pode levar a uma biotransformação, devido mais à hidrólise e oxidação destas moléculas ligadas ao polímero, pela ação das enzimas, do que propriamente à cisão da cadeia polimérica. Este caminho tem sido muito utilizado para modificar estes polímeros de difícil acesso aos microrganismos, e que, descartados no meio ambiente, têm prolongada duração. Outro caminho cada vez mais empregado tem sido a utilização de polímeros biodegradáveis bacterianos, tais como os polihidroxialcanos e seus copolímeros, bem como a utilização dos biodegradáveis sintéticos, tais como: poli (caprolactona), poli (ácido lático), poli (ácido glicólico). Estes polímeros, cuja produção é muito cara, por enquanto não são competitivos no mercado com os polímeros sintéticos, produzidos a partir do petróleo, que além do baixo preço de produção, possuem ótimas propriedades mecânicas e grande versatilidade de uso.

Ainda é muito grande o volume de plásticos sintéticos descartados no meio ambiente, cuja redução depende cada vez mais, não só de sua reciclagem, mas também da aplicação de métodos de biodegradação ou biotransformação destes materiais. Estes métodos são de difícil padronização, pois são dependentes dos tipos de microrganismos empregados, da natureza da matriz polimérica (massa molar, morfologia, estrutura, espessura), das condições do meio (pH, umidade, luz, oxigênio) e do substrato onde ocorre o processo de biodegradação e biodegradaçais.transformação (solo, lodo ativado, meio de cultura líquido ou sólido, água doce ou água salgada).

E importante, portanto, que o campo de biodegradação, ou das interações entre microrganismos e polímeros cresça cada vez mais, abrindo maiores e novas possibilidades de tratamentos do grande volume de resíduos plásticos.

Referências

- ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR 13936, 1997.
- ABOU-ZEID, D.-M.; MULLER, R.J.; DECKEWER, W.-D. Degradation of natural and synthetic polyester under anaerobic conditions. *Journal of Biotechnology*, v.86, p.113-126, 2001.
- AGUIAR, J. B. Durability of polymeric pipes in contact with domestic products. *Construction and Building Materials*, v.13, p.155-157, 1999.
- ALBERTSSON, A.C.; BARENSTEDT, C.; KARLSSON, S. Susceptibility of enhanced environmentally degradable polyethylene to thermal and photo-oxidation. *Polymer Degradation and Stability*, v.37, p.163-171, 1992.
- AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current, developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyester, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, v.47, p.89-144, 1998.
- ANON, M.C. Curso básico intensivo de plástico (CBIP). *Jornal de Plásticos*, Niterói, 1997.
- ARÉVALO-NINO, K.; SANDOVAL, C.F.; GALAN, L.J.; IMAM, S.H.; GORDON, S.H.; GREENE, R.V. Starch-based extruded plastic films and evaluation of their biodegradable properties. *Biodegradation*, v.7, p.231-237, 1996.
- ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C.G.; OGAWA, H.; KAWASAKI, N. Biodegradable films made from low-density polyethylene (LDPE), rice starch and potato starch for food packaging applications: part 1. *Carbohydrate Polymers*, v.36, p.89-104, 1998.
- AUGUSTA, J.; MULLER, R.J.; WIDDECKE, H.A. A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.39, p.673- 678, 1993.
- BOOTH, G.H.; COOPER, A.W.; ROOB, J.A. Bacterial degradation of plasticed PVC. *Journal Applied Bacteriology*, v.31, p.305-310, 1968.
- BURMAN, L.; ALBERTSSON, A.-C. Chromatographic fingerprinting-a tool for classification and for predicting the degradation state of degradable polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, v.89, p.50-63, 2005.
- CACCIARI, I.; QUATRINI, P.; ZIRLETTA, G.; MINCIONE, E.; VINCIGUERRA, V.; LUPATTELLI, P.; SERMANNI, G.G. Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: physicochemical characterization of metabolites produced. *Applied Environmental Microbiology*, v.59, n.11, p.3695-3700, 1993.
- CAMPOS, A. *Blendas de PVC/PCL foto/termo e biotratadas com fungos de solo*. 2004. Dissertação de Mestrado, UNESP, Rio Claro, p.1-114.
- CAMPOS, A.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Biotreatment effects in films and blends of PVC/ PCL previously treated with heat. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, n.2, p.235-243, 2005.
- CAMPOS, A.; MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; MUNIZ, D.K. Biotransformaçao da blenda PVC/ PCL 3:1 com fungos de solo (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus* sp.). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.71, n.296, p.670-673, 2004.
- CANTO, E.L. *Plástico: bem supérfluo ou mal necessário?* Coleção Polêmica, Ed. Moderna, São Paulo, 1999.
- CARLSSON, D.J.; KRZYMIEN, M.; PLEIZIER, G.; WORSFOLD, D.J.; DAY, M. Volatiles release from photodegrading, pigmented PVC: kinetic changes. *Polymer Degradation and Stability*, v.62, p.413-419, 1998.

- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science.** v.23, p.1273-1335, 1998.
- CHIELLINI, E.; CORTI, A.; D'ANTONE, S.; SOLARO, R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. **Progress in Polymer Science,** v.28, p.963-1014, 2003.
- COLE, M. A.; LEONAS K. K. Degradability of yard waste collection bags. **Biocycle.** 1991, p.56-63.
- DANIELS, C. A. **Polymers: Structure and properties.** Technomic Publishing CO, Inc., Lancaster, v.1, 1989, p.21-27.
- FLEMMING, H.C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation Stability.** v.59, p.309-315, 1998.
- GALGALI, P.; VARMA, A.J.; PUNTAMBEKAR, U.S.; GOKHALE, D.V. Towards biodegradable polyolefins: strategy of anchoring minute quantities of monosaccharides and disaccharides onto functionalized polystyrene, and their effect on facility polymer biodegradation. **Chemical Communication.** p.2884-2885, 2002.
- GU, J.D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration and Biodegradation.** v.52, p.69-91, 2003.
- GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; SINGAGLIA, I. Analysis of the interaction between autochthonous bacteria and packaging material in PVC bottled mineral water. **Microbiological Research.** v.149, n.2, p.115-122, 1994.
- GUOHUA, Z.; YA, L.; CUILAN, F.; MIN, Z.; CAIQIONG, Z.; ZONGDAO, C. Water resistance, mechanical properties and biodegradability of methylated-cornstarch/poly(vinyl alcohol) blend film. **Polymer Degradation and Stability.** 2005, In Press.
- HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. **Journal of Applied Microbiology.** v.98, p.1093-1100, 2005.
- HUANG, S.J. Polymer waste management-biodegradation, incineration and recycling **Journal of Material Science – Pure and Applied Chemistry.** v.32, n.4, p.593-597, 1995.
- HUANG, S.J.; EDELMAN, P.G. An overview of biodegradable polymers and biodegradation of polymer. In: Scott and Gilead (ed.) **Degradable Polymers: Principles and Applications.** Chapman & Hall, London, cap.2, 1995, p.18-28.
- JONES, P.H.; PRASAD, D.; HESKINS, M.; MORGAN, M.H.; GUILLET, J.E. Biodegradability of Photodegraded Polymers. **Environmental Science & Technology.** v.8, p.919-923, 1974.
- KALIA, V.C.; RAIZADA, N.; SONAKYA, V. Bioplastics. **Journal of Scientific & Industrial Research.** v.59, n.6, p.433-445, 2000.
- KAPLAN, D.L.; HARNSTEIN, R.; SUTTER, J. Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and Phenol Formaldehyde. **Applied Environmental Microbiology.** v.38, n.3, p.551-553, 1979.
- KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A.C. Techniques and mechanisms of polymer degradation. In: Scott, G & Gilead, D (ed). **Degradable Polymers-Principles & Applications.** Chapman & Hall, London, 1995, p.29-36.
- KARLSSON, S.; LJUNGQIUST, O.; ALBERTSSON, A. Biodegradation of polyethylene and the influence of surfactants. **Polymer Degradation and Stability.** v.21, p.237-250, 1998.
- KIATKAMJORNWONG, S.; SONSUK, M.; SAOWALUCK, W.; PRASASSARAKICH, P.; VEJJANUKROH, P. C. Degradation of styrene-g-cassava starch filled polystyrene plastics. **Polymer Degradation and Stability.** v.66, p.323-335, 1999.
- KIM, M-N.; LEE, AE-RJ; YOON, J-S.; CHIN, I-J. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green and Mater-Bi by fungi isolated from soils. **European Polymer Journal.** v.36, p.1677-1685, 2000.
- KIRBAS, Z.; KESKIN, N.; GUNER, A. Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** v.63, 335-342, 1999.
- KLEMCHUCK, P. P. Degradable plastics. **Polymer Degradation and Stability.** v.27, p.183-202, 1990.
- KORNER, I.; REDEMANN, K.; STEGMANN, R. Behaviour of biodegradable plastics in composting facilities. **Waste Management.** v.25, p.409-415, 2005.
- KRUPP, L.R.; JEWELL, W.J. Biodegradability of modified plastic films in plasticized PVC. **Journal of Applied Bacteriology.** v.31, p.305-310, 1992.
- KUMAR, S.G.; KALPAGAM, V.; NANDI, U.S. Biodegradable polymers: prospects, problems and progress. **Journal of Material Science-Review Macromolecular. Chemical Physics.** v.22 (2), p.193-198, 1992.
- KUSTER, E. Biological degradation of synthetic polymers. **Journal Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium.** v.35, p.395-404, 1979.
- LEE J.A.; KIM, M.N. Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)-degrading strains and their activity. **Polymer Degradation and Stability.** v.81, p.303-308, 2003.

- LEE, B.; POMETTO III, A.L.; FRATZE, A.; BAILEY-JR, T.B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, n.3, p.678-685, 1991.
- LEE, K.-M.; GIMORE, D.F.; HUSS, M.J. Fungal degradation of the bioplastic PHB (Poly-3-hydroxy-butyric acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v.13, n.3, p.213-219, 2005.
- LENHINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed.. Ed. Sarvier, S.P., 2000.
- LESINSKY, D.; FRITZ, J.; BRAUN, R. Biological degradation of PVA/CH blends in terrestrial and aquatic conditions. **Bioresource Technology**, v.96, p.197-201, 2005.
- MADDEVER, W.J.; CHAPMAN, G.M. Modified starch-based biodegradable plastics. **Plastics Engineering**, p.31-34, 1989.
- MAI, C.; SCHORMANN, W.; MAJCHERCZYK, A.; HUTTERMANN, A. Degradation of acrylic copolymers by white-rot fungi. **Environmental Biotechnology**, v.65, p.479-487, 2004.
- MANO, H. **Introdução a polímeros**. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1985, 111 p.
- MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, 2005, In Press.
- MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; NICOLETI, J.L. Biotratamento de filmes de PVC com suspensão do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (CCB478). In: **Resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 1999, n.243, MI-051.
- MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; SILVA, E.R.; TROMBINI, R.C. Biotransformation of PVC films by liquid waste from landfill. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.66, p.133-136, 1999.
- MATSUMURA, S.; TOMIZAWA, N.; TOKI, A.; NISHIKAWA, K.; TOSHIMA, K. Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. **Macromolecules**, v.32, p.7753-7761, 1999.
- MEJÍA, I.A.G.; LÓPEZ, L.B.O.; MULET A.P. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) with enzymatic extracts of *Phanerochaete chrysosporium*. **Macromolecular Symposium**, v.148, p.131-147, 1999.
- MESSADI, D.; GHEID, A.E.H. Etude des transferts de matière entre un plastifiant dispersé dans un disque de PVC et des liquides alimentaires. **European Polymer Journal**, v.30, n.2, p.163-173, 1994.
- MILSTEIN, O.; GERSONDE, R.; HUTTERMANN, A.; CHEN, M.-J.; MEISTER, J.J. Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.10, p.3225-3232, 1992.
- MORI, T.; SAKIMOTO, M.; KAGI, T.; SAKAI, T. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.60, p.330-332, 1996.
- MORITA, M.; WATANABE, Y. A secondary alcohol oxidase: a component of a polyvinyl alcohol degrading enzyme preparation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.41, p.1535-1537, 1977.
- NICOLETI, J.L. **Biotransformação de Filmes de PVC submetidos a diferentes tratamentos microbianos**. 2002, Dissertação de Mestrado, UNESP, Rio Claro, SP.
- NISHIKAWA, H.; HASEGAWA, M. Assimilation of poly(vinyl alcohol) resin.
- NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSELL, E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, n.1, p.1-5, 2001.
- NUGARI, N.P.; PIETRINI, A.M. Trevi fountain: an evaluation of inhibition effect of water-repellents on cyanobacteria and algae. **International Biodegradation and Biodegradation**, v.40, n.2-4, p.247-252, 1997.
- OHTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASABE, H.; MURAKAMI, N. Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride and urea formaldehyde resin buried under soil over 32 years. **Journal Applied and Polymer Science**, v.56, p.1789-1796, 1995.
- OHTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASABE, H.; MURAKAMI, N. Oxidative degradation and molecular weight change of LDPE buried under bioactive soil for 32-37 years. **Journal Applied and Polymer Science**, v.70, p.1643-1659, 1998(a).
- OHTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASABE, H.; MURAKAMI, N. Studies on biodegradation of LDPE-observation of LDPE films scattered in agricultural fields or in garden soil. **Polymer Degradation and Stability**, v.60, p.79-84, 1998(b).
- OZAKI, S.K.; MONTEIRO, M.B.B.; IMAMURA, Y.; SOUZA, M. F. Biodegradable composites from waste wood and poly(vinyl alcohol). **Polymer Degradation and Stability**, v.87, p.293-299, 2005.
- PACI, M.; LA MANTIA, F.P. Influence of small amounts of polyvinylchloride on the recycling of polyethylenephtalate. **Polymer Degradation and Stability**, v.63, p.441-445, 1999.
- RAGHAVAN, D. Characterization of biodegradable plastics. **Polymer Plastic Technology Engineering**, v.34, n.1, p.41-63, 1995.

- RATNER, B.D.; LLACH-SCAMPANIA D.; CASTNER, D.G. ESCA surface characterization of four IUPAC reference polymers. *Biomaterials*, v.14, n.2, 148-152, 1993.
- REDDY, C.S.K.; GHAI, R; RASHMI; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Biosource Technology*, v.87, p.137-146, 2003.
- ROSA, D.S.; LOTTO, N.T.; GUEDES, C.G.F. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate and poly- β -(hidroxybutyrate-co- α -valerate). *Polymer Testing*, v.23, p.3-8, 2004.
- ROSA, D.S.; PÂNTANO-FILHO, R. *Biodegradação - um ensaio com polímeros*. Ed Moara, Itatiba, SP, 2003.
- SAKAI, K.; FUKUDA, M.; HASUI, Y.; MORIOSHI K.; FUJITA, T.; OHE T. Purification and characterization of an esterase involved in poly(vinyl alcohol) degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.62, p.2000-2007, 1998.
- SAKAI, K.; MORITA, M.; HAMADA, N.; WATANABE, Y. Studies on the poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. Part III. Purification and properties of oxidized poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.45, p.63-71, 1981.
- SAKAI, K.; WATANABE, Y. Studies on the poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. Part VI. Degradation mechanism of poly (vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and α -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.50, p.989-96, 1986.
- SAKAZAWA, C.; SHIMAO, M.; TANIGUCHI, Y.; KATO, N. Symbiotic utilization of poly(vinyl alcohol) by mixed cultures. *Applied Environmental Microbiology*, v.41, p.261-267, 1981.
- SCOTT, G. Green Polymers. *Polymer Degradation and Stability*, v.68, 2000, p.1-7.
- SENOUNE, A.; VERGNAUD, J. M. Plasticized PVC with low matter transfers in n-hexane by fixing a thin film of ethylene glycol on its surface. *European Polymer Journal*, v.29, n.5, p.679-683, 1993.
- SHIMAO M., SAIMOTO, H.; KATO, N.; SAKAZAWA, C. Properties and role of bacterial symbionts of poly(vinyl alcohol)- utilizing mixed cultures. *Applied Environmental Microbiology*, v.46, p.605-610, 1983.
- SHIVRAM, Dy. *International Symposium on Biodegradation Polymers*. 2001.
- SONCINI, G. Jr. *Interação de biofilmes fúngicos com superfícies poliméricas de poliéster-imida (PEI) aplicadas sobre fios de cobre*. 2004. Dissertação de Mestrado, UNESP, Rio Claro, SP, p.1-142.
- SONCINI, G.Jr.; MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; MARCONATO, J.C. Architecture and relevance of several strongly adhered biofilms over a polyester imide (PEI) surface. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, n.1, p.105-107, 2003.
- SPINACÉ, M.A.S.; DE-PAOLI, M.A. A tecnologia da reciclagem de polímeros. *Química Nova*, v.28, p.65-72, 2005.
- STAHL, J.D.; CAMERON, M.D.; HASELBACH, J.; AUST, S.D. Biodegradation of superabsorbent polymers in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v.2, p.83-88, 2000.
- SUTHERLAND, G.R.J.; HASELBACH, J.; AUST, S.D. Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. *Environmental Science and Pollution Research*, v.4, n.1, p.16-20, 1997.
- SWIFT, G. Directions for environmentally biodegradable polymer research. *Chemical Research*, v.26, p.105-110, 1993.
- TORIKAI, A.; HASEGAWA, H. Accelerated photodegradation of poly(vinyl chloride). *Polymer Degradation and Stability*, v.63, 441-445, 1999.
- TUDORACHI, N.; CASCAVAL, C.N.; RUSU, M.; PRUTEANU, M. Testing of poly(vinyl alcohol) and starch mixtures as biodegradable polymeric materials. *Polymer Testing*, v.19, p.785-799, 2000.
- VARMA, A.J. A comparative study of the thermal behavior of PVC, a series of synthetized chlorinated polyethylenes and HDPE. *Polymer Degradation and Stability*, v.63, p.1-3, 1999.
- VERONELLI, M.; MAURO, M.; BRESADOLA, S. Influence of thermal dehydrochlorination on the photooxidation kinetics of PVC samples. *Polymer Degradation and Stability*, v.66, p.349-357, 1999.
- VESS, R.W.; ANDERSON, R.L.; CARR, J.H.; BOND, W.W.; FAVERO, M.S.J. The colonization of solid PVC samples surfaces and the acquisition of Resistance of germicides by water microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, v.74, n.2, p.215-221, 1993.
- VILPOUX, O.; AVEROUS, L. Plásticos a base de amido. In: *Série de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*, v 3: Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino Americanas, Ed. M.P. CEREDA. O. FRANÇOIS Vipoux – Fundação Cargill, SP, cap.18, 2003, p.499-529.
- VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; GUTIÉRREZ- ROJAS, M.; MANZUR, A.; FAVELA-TORRES, E. Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Polymer Science*, v.83, p.305-314, 2002.

- WAN, E; GALEMBECK E.; GALEMBECK, F. Polímeros sintéticos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.2, p.5-8, 2001.
- WATANABE, Y.; MORITA, M.; HAMADA, N.; TSUJISAKA, Y. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.39, p.2447-8, 1975.
- WATANABE, Y; HAMADA, N.; TSUJISAKA., Y. Purification and properties of a poly(vinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of *Pseudomonas*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.174, p.575-81, 1976.
- XU, X.; GUO, S. A study on morphological structure of low molecular weight PVC prepared by vibromilling degradation. **Polymer Plastic Technology Engineering**, v.34, n.4, 621-632, 1995.
- YABANAVAR, A.V.; BARTHA, R. Biodegradability of some food packaging materials in soil. **Soil Biological and Biochemistry**, v.25, p.1469-1475, 1993.
- YABANAVAR, A.V.; BARTHA, R. Methods for assessment of biodegradability of plastic films in soil. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.3608-3614, 1994.
- ZENI, M.; RIVEROS, R.; RASERA, K. Avaliação da biodegradação de filmes de PVA por fungos e bactérias. **27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2004, Salvador, BA.

Biodegradação de Fungicidas

**Célia Maria Maganhotto de Souza Silva, Elisabeth Francisconi Fay e
Rosângela Blotta Abakerli**

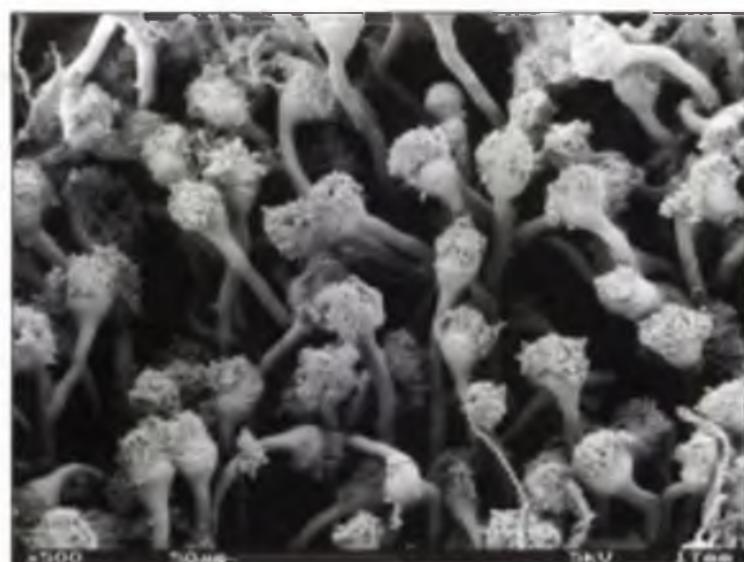


Foto: I.S. Melo

I. Introdução

A estimativa de aplicação de agrotóxicos em escala mundial é em torno de 2,5 milhões de toneladas ano⁻¹. Entre as classes de agrotóxicos, a dos fungicidas, responde por 15,2% do valor das vendas totais dos compostos usados na agricultura brasileira em 2000, sendo superado pelos herbicidas (52%) e pelos inseticidas incluindo os formicidas (27,6%), acaricidas (2,6%) e outros, que incluem antibrotantes, reguladores de crescimento, óleo mineral e espalhantes adesivos (2,5%), de acordo com os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) (FERREIRA *et al.*, 2002). No Brasil, as vendas de fungicidas, em valores correntes, aumentaram de U\$ 147 milhões em 1991 para U\$ 380,5 milhões em 2000 (FERREIRA *et al.*, 2002).

A Tabela 1 mostra os principais grupos de fungicidas usados no Brasil em 2001 (ANDEF, 2003). Os triazóis junto com os benzimidazóis mantêm a liderança seguidos dos alquilenobis(ditiocarbamatos) e das estrobirulinas.

A preocupação com o efeito adverso dos agrotóxicos no ambiente e na saúde humana iniciou-se na década de 1960 (CARSON, 1962). Eles geralmente causam efeitos ambientais não intencionais uma vez que não são totalmente seletivos para os organismos alvo. A quantidade de produto que entra em contato direto ou que é consumida pelas espécies alvo é extremamente baixa, em torno de 0,3% do que é aplicado, portanto, 99,7% vão para “algum lugar” no ambiente (PIMENTEL, 1995). Uma vez que o uso destes produtos na agricultura leva a exposição inevitável de organismos não-alvo (incluindo humanos), efeitos colaterais indesejáveis podem ocorrer em algumas espécies, comunidades ou no ecossistema como um todo (Van der WERF, 1996). Existe consenso de que o impacto ambiental de um agrotóxico depende do

TABELA 1. Principais classes de fungicidas utilizadas no Brasil em 2001.

Classes Fungicidas	Percentual de Uso
triazóis	28
benzimidazóis	23
ditiocarbamatos	11
estrobirulinas	9
ftalonitrilas	5
cobre	5
organoestânico	4
ftalimidas	3
fenilamidas	2
outros	10

Fonte: Andef, 2003.

grau de exposição (sua dispersão e consequente concentração no ambiente) e de suas propriedades toxicológicas (SEVERN & BALLARD, 1990; EMANS *et al.*, 1992).

E importante salientar que a classificação quanto à toxicidade dos ingredientes ativos (BRASIL, 1998) depende da formulação, estado físico, e toxicidade oral ou dérmica (Tabela 2). Os adjuvantes usados nas formulações de agrotóxicos podem modificar os efeitos agronômicos (efetividade e fitotoxicidade) do produto formulado. Também podem causar impactos ambientais, uma vez que a dispersão padrão pode ser alterada e o período de atividade funcional do ingrediente ativo pode ser prolongado ou sua biodegradação impedida ou retardada (LEVITAN *et al.*, 1995). Infelizmente, pouquíssima informação sobre o efeito e o destino dos adjuvantes está disponível na literatura científica e, portanto, o papel dos adjuvantes não será levado em consideração neste capítulo.

Devido às baixas doses aplicadas, os fungicidas usados hoje na agricultura não constituem um sério risco em relação aos problemas de toxicidade aguda para mamíferos, embora um produto com baixa toxicidade possa ser perigoso devido à concentração, alta volatilidade, descuidos na aplicação ou efeitos em longo prazo.

Após a verificação de que os fungicidas ou seus produtos de degradação possam ter um efeito tóxico obscuro ou retardado no homem ou em outros organismos, ou ainda entrar na cadeia alimentar, podendo bioconcentrar, tiveram início as preocupações sobre o destino destes compostos no ambiente, as quais hoje são consideráveis.

Além disso, hoje existe a preocupação relacionada com a possível interferência dos agrotóxicos com o funcionamento do sistema endócrino tanto em humanos como em animais, tanto que alguns deles estão sendo chamados de disruptores endócrinos ou disruptores xenoendócrinos (EDC's) (GRAY, 1998). Esses compostos podem ocasionar uma série de problemas no desenvolvimento, comportamento e reprodução. Embora os riscos associados aos disruptores endócrinos para a saúde humana e ambiente não sejam claros, estão sendo objeto de muita pesquisa, as quais visam reduzir ou mitigar os riscos dos mesmos (KOOKANA *et al.*, 1998). Entre os fungicidas podem-se citar os princípios ativos carbendazim, benomil, vinclozolina e procimidona como disruptores endócrinos propriamente ditos (OSTBY *et al.*, 1999; VIGGAARD *et al.*, 1999), enquanto penconazol, procloraz, propiconazol, tridemorf, epoxiconazol, e metiram são considerados potenciais disruptores pela Agência de Proteção Ambiental da Alemanha (ENDS, 1999).

TABELA 2. Classificação toxicológica de fungicidas e LD₅₀ (mg kg⁻¹).

Classe	LD ₅₀ para ratos (mg kg ⁻¹ peso corporal)			
	Oral		Dérmica	
	Sólidos ^a	Líquidos ^a	Sólidos ^a	Líquidos ^a
I Extremamente Tóxico	5 ou <	20 ou <	10 ou <	40 ou <
II Altamente Tóxico	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400
III Medianamente Tóxico	50 - 500	200 - 2.000	100 - 1.000	400 - 4.000
IV Pouco Tóxico	> 500	> 2.000	> 1.000	> 4.000

^a: os termos "sólidos" e "líquidos" indicam o estado físico do ingrediente ativo classificado.

LD₅₀: IPCS. 2002.

Portanto, já é bem reconhecida a necessidade de conhecer tanto as características degradativas quanto os efeitos biológicos das novas moléculas com atividade fungicida, além das já existentes.

As informações sobre a biodegradação lamentavelmente são incompletas. Existem informações parciais disponíveis na literatura sobre a biodegradação de aproximadamente 1000 compostos, sendo que menos de 0,01% dos compostos orgânicos conhecidos foram testados (WACKETT & ELLIS, 1999).

As rotas pelas quais os fungicidas são dissipados ou dispersados das áreas-alvo após a aplicação já são bem conhecidas. O que ainda não é bem conhecido é a importância relativa quantitativa de cada rota, o que dependerá das propriedades físicas e químicas das moléculas orgânicas. As perdas dos fungicidas são causadas principalmente pela degradação química ou biológica do composto que alcança a superfície do solo. A perda por escorrimento superficial é menor que 5%, por lixiviação provavelmente menor que 1%, enquanto que a volatilização pode explicar perdas de 40-80%, dependendo das propriedades físicas e ambientais (SCHNOOR, 1992; SCHIAVON *et al.*, 1995). Perdas por volatilização entre 80-90% foram medidas poucos dias após a aplicação (GLOTFELTY *et al.*, 1984; TAYLOR & SPENCER, 1990).

A influência dos fungicidas na biota do solo é determinada pela persistência do composto orgânico que, por sua vez, é dependente de importantes fatores físicos (temperatura, umidade, fatores climáticos, textura do solo, entre outros), químicos (matéria orgânica, estado nutricional do solo, entre outros.) e biológicos (biomassa microbiana, diversidade biológica e cobertura vegetal). As propriedades físico-químicas da molécula do fungicida como: tamanho molecular, ionizabilidade, solubilidade em água, lipofilicidade, polarizabilidade e volatilidade governarão o seu comportamento no solo e sua atividade biológica. As variáveis ambientais como temperatura e conteúdo de umidade não controlam especificamente a biodegradação, mas controlam a atividade metabólica microbiana nos solos.

Embora possam existir condições favoráveis para a atividade microbiana nos solos, a degradação dos agrotóxicos pode ser dificultada devido à baixa disponibilidade do composto como resultado da limitação de transferência de massa via processos de sorção, dessorção ou solubilização. Além disso, o tipo e quantidade de matéria orgânica e argilas presentes, a temperatura local e umidade, o histórico de uso e aplicação, também afetam a velocidade de degradação dos agrotóxicos (KOOKANA *et al.*, 1998). Portanto, a degradabilidade de uma molécula deve ser definida em relação ao meio a que está exposta.

Os microrganismos do solo têm uma função importante na atenuação do impacto ambiental dos compostos orgânicos que estão biodisponíveis, uma vez que eles podem adaptar-se à presença destes compostos potencialmente tóxicos e sobreviver por meio de sua transformação ou degradação. É essencial fazer a distinção entre estes dois processos. A transformação é todo e quaisquer processos físico, químico ou biológico que acarrete mudanças na natureza química de uma molécula com atividade agrotóxico. As degradações química e biológica dos agrotóxicos são os principais processos envolvidos nas transformações, ocorrem simultaneamente, sendo difícil definir a contribuição relativa de cada processo. Deve ser enfatizado

que a transformação de agrotóxicos está relacionada com o aparecimento de metabólitos com propriedades diferentes do composto parental - freqüentemente mais polares, mais solúveis em água e mesmo mais tóxicos os quais podem lixiviá-la mais facilmente.

Como são poucos os dados disponíveis sobre a ocorrência ou comportamento ambiental dos metabólitos, as predições devem ser baseadas no conhecimento das propriedades químicas relevantes e da provável ocorrência de metabólitos em associação com o composto parental. Deve ser assumido que processos de transformação e transporte influenciarão o destino dos metabólitos e suas propriedades físicas determinarão sua partição nos compartimentos ambientais (KOOKANA & AYLMORE, 1994; PLIMMER, 2002).

Por exemplo, os produtos iniciais da biotransformação podem, em alguns casos, ser incorporados ao material celular como os ácidos carboxílicos formados pela oxidação dos *n*-alquil cloretos de cadeia longa, incorporados aos ácidos graxos pelas linhagens de *Mycobacterium* sp. (MURPHY & PERRY, 1983); metabólitos do metolacloro que poderiam ser extraídos de células com acetona, aparentemente ficaram ligados quimicamente em componentes celulares, não identificados, que continham enxofre (LIU *et al.*, 1989).

Segundo Alexander (1999) a detoxicação é o papel mais importante desempenhado pelos microrganismos na transformação de agrotóxicos, tornado-os menos ativos a uma ou mais espécies susceptíveis. A detoxicação resulta em inativação, com a substância toxicologicamente ativa sendo convertida em um produto inativo. Como a atividade toxicológica está associada com muitas propriedades químicas da molécula (estrutura, solubilidade, concentração, grupos substituintes, entre outros), com os modos de ação, a detoxicação similarmente inclui um grande conjunto de diferentes tipos de reações, tais como, hidrólise, hidroxilação, dehalogenação, metilação, nitro-redução, conversão de nitrila à amida, dentre outras. Estas reações, entretanto, não são sempre de detoxicação, pois pode ocorrer a formação de produtos mais tóxicos que os parentais.

A formação de substâncias mais tóxicas é um dos aspectos mais surpreendentes, e possivelmente, o mais indesejável da biotransformação. Um grande número de compostos que são inócuos pode e freqüentemente são convertidos a produtos mais tóxicos, tanto para microrganismos, plantas, animais quanto para o homem. Neste caso, os microrganismos desenvolvem poluentes onde não os havia. O processo de formação de produtos tóxicos a partir de precursores inócuos é chamado de ativação. A ativação ocorre em solo, água, e em outros ambientes nos quais os microrganismos são ativos, e o composto produzido pode ser persistente ou não. A conversão pode representar uma reação simples ou uma seqüência simples de um processo co-metabólico.

Como consequências da ativação podemos ter a biossíntese de compostos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, fitotoxinas e produtos com atividade inseticida e fungicida. Como exemplo cita-se os ditiocarbamatos que geram etilenotioréia (ETU). Além disso, a mobilidade do produto de ativação é algumas vezes muito diferente do parental, podendo então o produto ser transportado para locais distantes, com uma bem maior ou significativamente menor mobilidade. A

ativação também pode ocorrer durante a biorremediação, particularmente se houver biotransformação das moléculas, no lugar de biodegradação.

A biodegradação, por sua vez, sob condições aeróbicas resulta na mineralização de um composto orgânico para dióxido de carbono e água e – se o composto contém nitrogênio, enxofre, fósforo ou cloro – com a liberação de amônio (ou nitrito), sulfato, fosfato ou cloreto. Estes produtos inorgânicos podem entrar nos ciclos biogeoquímicos. Sob condições anaeróbicas, pode ser formado metano além do dióxido de carbono, e o sulfato pode ser reduzido para sulfeto (NEILSON, 2000).

A biodegradação e a biotransformação são, geralmente, alternativas, mas elas não são mutuamente exclusivas. Por exemplo, Allard *et al.* (1987) propuseram que a reação de *O*-metilação para compostos clorofenólicos poderia ser uma alternativa importante em suas rotas degradativas. Além do significado ambiental muitas reações da biotransformação têm enorme importância na biotecnologia, como por exemplo, a síntese de derivados do esterol e as reações que tiram vantagem do potencial oxidativo das bactérias metanotróficas (LINDSTROM & STIRLING, 1990) e dos rodococci (FINNERTY, 1992).

2. Metabolismo dos fungicidas

O catabolismo dos fungicidas normalmente envolve uma hidrólise seguida do metabolismo por microrganismos adaptados, os quais utilizam os produtos da hidrólise como nutriente ou fonte de energia. O metabolismo freqüentemente resulta na completa mineralização de um fungicida, isto é, em sua conversão para dióxido de carbono, água e íons inorgânicos. Esta rota metabólica consiste de uma série de reações seqüenciais de transformação, cujo propósito é a conversão do fungicida em moléculas que possam ser processadas pelo metabolismo intermediário ou central, servindo então como precursores para a biossíntese dos constituintes celulares (JANKE & FRITSCHE, 1985). A energia necessária aos propósitos biossintéticos é derivada da oxidação completa da porção remanescente para CO₂ e água. As primeiras reações periféricas são normalmente catalisadas por enzimas que são induzidas pelo fungicida substrato e que tem uma limitada especificidade de substrato. Os genes que codificam as enzimas que catalisam estas reações iniciais, freqüentemente residem em plasmídeos.

É também importante considerar a degradação de agrotóxicos no amplo contexto das reações que ocorrem fora das células. As células precisam obter energia para realizar as reações biossintéticas essenciais (anabolismo) para a continuidade de sua existência e serem capaz de crescer e reproduzir-se. O substrato não pode, portanto, ser degradado inteiramente para dióxido de carbono ou metano, por exemplo, uma porção precisa ser canalizada para a biossíntese de moléculas essenciais. Na verdade, muitos organismos somente degradarão agrotóxicos na presença de um substrato de crescimento mais facilmente degradável, o qual fornecerá carbono para a célula e energia para o crescimento. O fenômeno onde a degradação ocorre na presença de dois substratos tem sido denominado de co-oxidação, ou menos especificamente de co-metabolismo ou metabolismo concorrente. Pesquisas sobre

estas transformações co-metabólicas microbianas revelam que estes processos são normalmente atribuídos a atividades de enzimas não específicas do metabolismo periférico celular, capazes de modificar outras substâncias que não são seus substratos naturais.

A especificidade das enzimas ativas contra agrotóxicos difere de um microrganismo para outro. O metabolismo fortuito, não específico, fornece um importante mecanismo para a degradação de agrotóxicos no ambiente (KNACKMUSS, 1981; SLATER & LOVATT, 1984). A transformação fortuita de substratos por estas enzimas de baixa especificidade é provavelmente a forma predominante de degradação de agrotóxicos, principalmente quando eles estão em concentrações muito baixas.

3. Biotransformação de fungicidas

3.1 Fungicidas inibidores da demetilação (DMI)

Várias classes de fungicidas atuam inibindo a biossíntese de esteróis, sendo o grupo mais importante já desenvolvido para o controle de doenças fúngicas, exibindo vários graus de sistemicidade e altíssima potência antifúngica. Estes fungicidas foram, inicialmente, chamados de inibidores da biossíntese de ergosterol. Atualmente passaram a ser classificados como inibidores da biossíntese de esterol, uma vez que existem fungos como os oídeos e ferrugens, onde o ergosterol não é o principal esterol produzido (LINHARES & GHINI, 2001).

Incluem compostos químicos, que necessitam de um anel heterocíclico para sua atividade e são estruturalmente muito diversificados, como morfolinas, piperazinas, imidazóis, pirimidinas e triazóis, e compartilham as seguintes características: apresentam pelo menos um anel heterocíclico (N), contém pelo menos um carbono assimétrico (há exceção) e interferem na síntese de esteróis. Na Tabela 3 apresentamos os fungicidas do grupo dos DMI utilizados no país.

A persistência no solo destes compostos causa preocupação ambiental. Poucos são os trabalhos encontrados na literatura sobre este parâmetro. A persistência destes compostos poderia levar a sua acumulação no campo após aplicações repetidas, lixiviação dos mesmos para aquíferos e drenos, ou causar efeitos deletérios nos processos microbiológicos do solo. Contudo, estes compostos são pelo menos moderadamente lipofílicos e assim moderadamente sorvidos no solo (JAMET & EUDELINÉ, 1992).

Os fungicidas triazóis (Figura 1) são os compostos mais importantes deste grupo, sendo os mais usados no país (Tabela 1).

O flutriafol é o mais polar dos fungicidas triazóis e foi moderadamente móvel no solo (WECHSLER *et al.*, 1996). O flutriafol (PP450) é muito persistente em testes de laboratório utilizando solo argiloso à temperatura de 15°C, ainda que o benzotriazol substituído tenha sido rapidamente degradado por microrganismos,

TABELA 3. Grupos químicos e ingredientes ativos dos demetiladores da biossíntese de esteróis (DMI).

Grupo químico	Ingrediente ativo
Imidazóis	Imazalil, procloraz, triflumizol
Piperazina	Triforine
Piridina	Pirifenóxi
Pirimidina	Fenarimol
Triazóis (incluindo conazóis)	Bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difeconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, flutriafol, hexaconazol, metconazol, miclobutanol, paclobutrazol, propiconazol, tebuconazol, tetriconazol, triamedifom, triamedinol, triticonazol.
Morfolina	Fempromorf

Disponível: ANVISA, 2004.

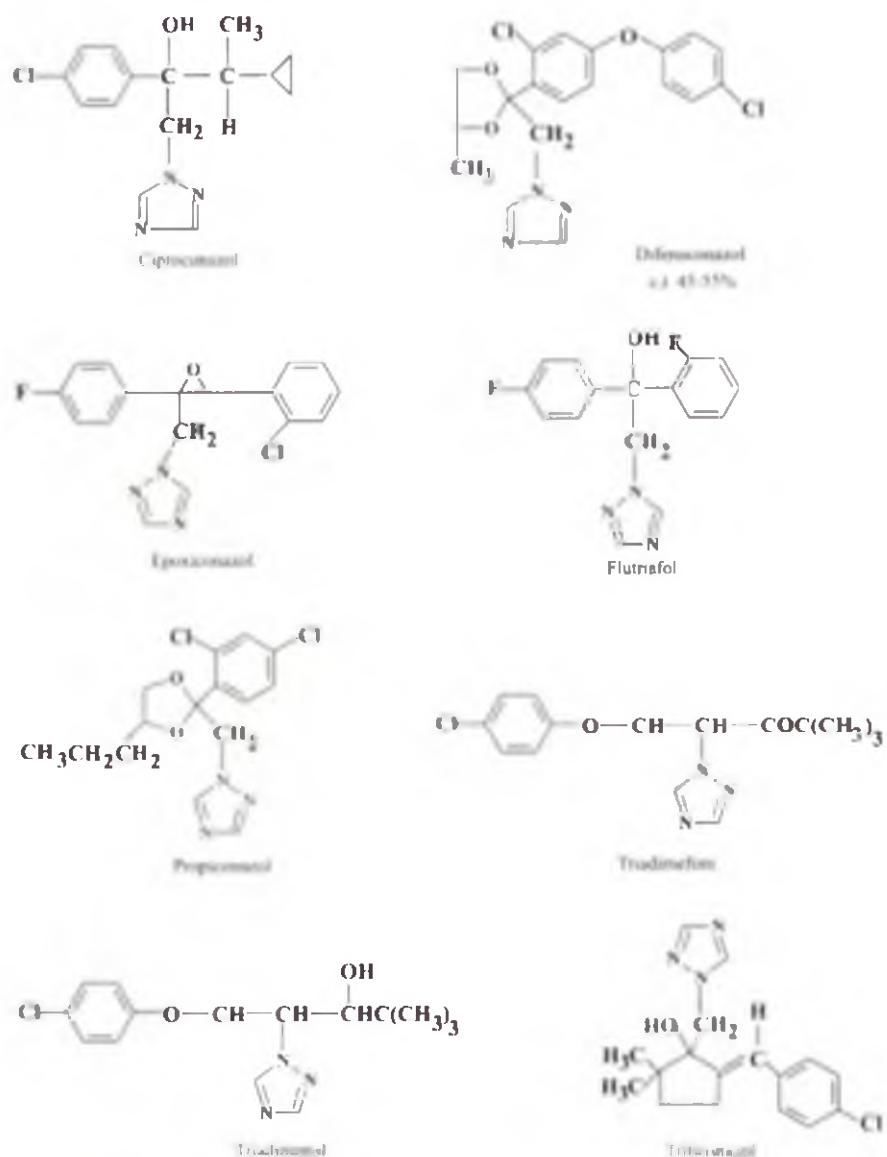


FIGURA 1. Estrutura química de alguns triazóis.

formação de 4-clorofenol. O metabolismo individual dos enantiômeros ocorre em diferentes velocidades (TOMLIN, 2000).

A taxa de degradação de cinco fungicidas triazóis em dois solos (arenoso e argiloso), durante um período de 720 dias foi estudada por Bromilow *et al.* (1999). O

indicando que os anéis triazóis não conferem, necessariamente, estabilidade (PATIL *et al.*, 1988). O flutriafol não apresenta efeitos nas populações microbianas e nem nas transformações do carbono ou nitrogênio que ocorrem no solo (TOMLIN, 2000).

Outro exemplo é o triadimenol, metabólito derivado pela rápida redução do triadimefom em solo, para o qual Bromilow *et al.* (1996) observaram meia-vida de ± 1 ano à temperatura de 15°C, para ambos os diastereoisômeros em incubações de laboratório. Os mesmos autores observaram que o triadimefom não acumulou e nem influenciou a atividade microbiana do solo após 12 anos de aplicação. No solo o triadimenol é o produto de degradação do triadimefom. Esta degradação envolve uma clivagem hidrolítica que leva a

comportamento dos compostos foi semelhante em ambos os solos. O triadimefom foi rapidamente reduzido a triadimenol, ainda que traços do primeiro tenham sempre sido detectados, indicando um possível equilíbrio redox. A degradação dos compostos seguiu essencialmente a cinética de primeira ordem durante os 720 dias de incubação e foi pouco sensível às diferentes taxas de umidade testadas. No entanto mostrou um típico aumento na taxa de degradação com o aumento da temperatura de 5° a 18°C. O flutriafol, epoxiconazol e triadimenol foram muito persistentes, com meia-vida maior que 2 anos na temperatura de 10°C e conteúdo de umidade equivalente a 80% da capacidade de campo. O propiconazol foi um pouco menos persistente com meia-vida próxima aos 200 dias. Já a temperatura de 25°C em solos aeróbios a DT₅₀ é de 40-70 dias. As principais rotas de degradação são a hidroxilação da cadeia lateral propila e do anel dioxolano, com a formação final do 1,2,4-triazol (TOMLIN, 2000).

Segundo Bromilow *et al.* (1999), as taxas de degradação observadas para flutriafol, epoxiconazol e triadimenol, em ambos os solos, foram menores do que as esperadas em campo para as temperaturas de inverno, ou para a superfície do solo durante os períodos secos no verão.

Ao contrário dos fungicidas já descritos, a DT₅₀ para difeconazol foi de apenas 33-54 dias em testes de laboratório à 30°C, com pré-tratamento e adição de palha para reduzir a persistência (THOM *et al.*, 1997). A DT₅₀ por fotólise é de 145 dias. Este composto é praticamente imóvel no solo devido a grande adsorção e baixo potencial de lixiviação (TOMLIN, 2000).

O ciproconazol, outro fungicida triazol, é um produto relativamente novo com solubilidade em água de 140 mg L⁻¹ e um coeficiente de partição octanol-água (Kow) de 819. Este fungicida é relatado como não persistente, com meia-vida de ± 90 dias em solos agrícolas e não apresenta potencial para lixiviação (TOMLIN, 2000).

Em estudos comparativos entre solos e solos turfosos com vários níveis de matéria orgânica, Gardner *et al.* (2000) verificaram a persistência e dissipação de ciproconazol. O aumento da quantidade de matéria orgânica diminuiu a concentração do fungicida até os 15 cm de profundidade. A quantidade de ciproconazol detectado no solo sob turfa aos 4 e 32 dias após a aplicação foi de 1 e 11%, respectivamente, da quantidade detectada em solos normais. Em todos os tratamentos, os resíduos do fungicida não excederam 20 µg kg⁻¹ quando considerada a profundidade de 15-30 cm. A meia-vida do composto decresceu de 129 dias em solo normal para 12 dias em solo turfoso.

A meia-vida de um agrotóxico no solo varia de acordo com algumas condições como umidade do solo, temperatura e atividade microbiana e estas condições variam de acordo com o local, estação, clima e profundidade do solo (PRIMI *et al.*, 1994; WALKER, 2002). O rápido decréscimo do ciproconazol detectado em turfa comparado com o solo normal sugere uma rápida degradação microbiana. Neste estudo, a quantidade de ciproconazol detectado em material lenhoso e solo sob turfa, com 67% de matéria orgânica, diminuiu rapidamente até os 32 dias após a aplicação, decrescendo, então, lentamente. Segundo os autores, o ciproconazol é aplicado em baixas concentrações e o posterior declínio na concentração pode ter reduzido a disponibilidade da molécula para a degradação microbiana. É também possível que as temperaturas mais frias no final da avaliação, devido à estação, tenham reduzido a atividade microbiana.

Outro fungicida triazol, o triticonazol [(1RS)-(E)-5-(4c-clorofenil-metilen)-2,2-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-ciclopantan-1-ol], usado no tratamento de sementes de cereais, controla a maioria das doenças de sementes e foliares, assim permitindo a proteção do cereal, da semente à planta adulta. A eficácia destes agrotóxicos sistêmicos aplicados em tratamentos de sementes depende muito de sua dissipação e disponibilidade no perfil do solo em relação a sua absorção pelo sistema radicular da planta. O transporte e destino destas moléculas nos solos são de crucial importância para uma ótima utilização.

As características sortivas e degradativas deste fungicida sistêmico em solo argiloso foram estudadas por Beigel *et al.* (1997; 1999). Sua degradação foi essencialmente devido a transformações co-metabólicas microbianas que poderiam ser adequadamente caracterizadas pela constante de mineralização de primeira ordem, variando de $0,3 \times 10^{-3}$ para $0,6 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, dependendo da dose inicial aplicada.

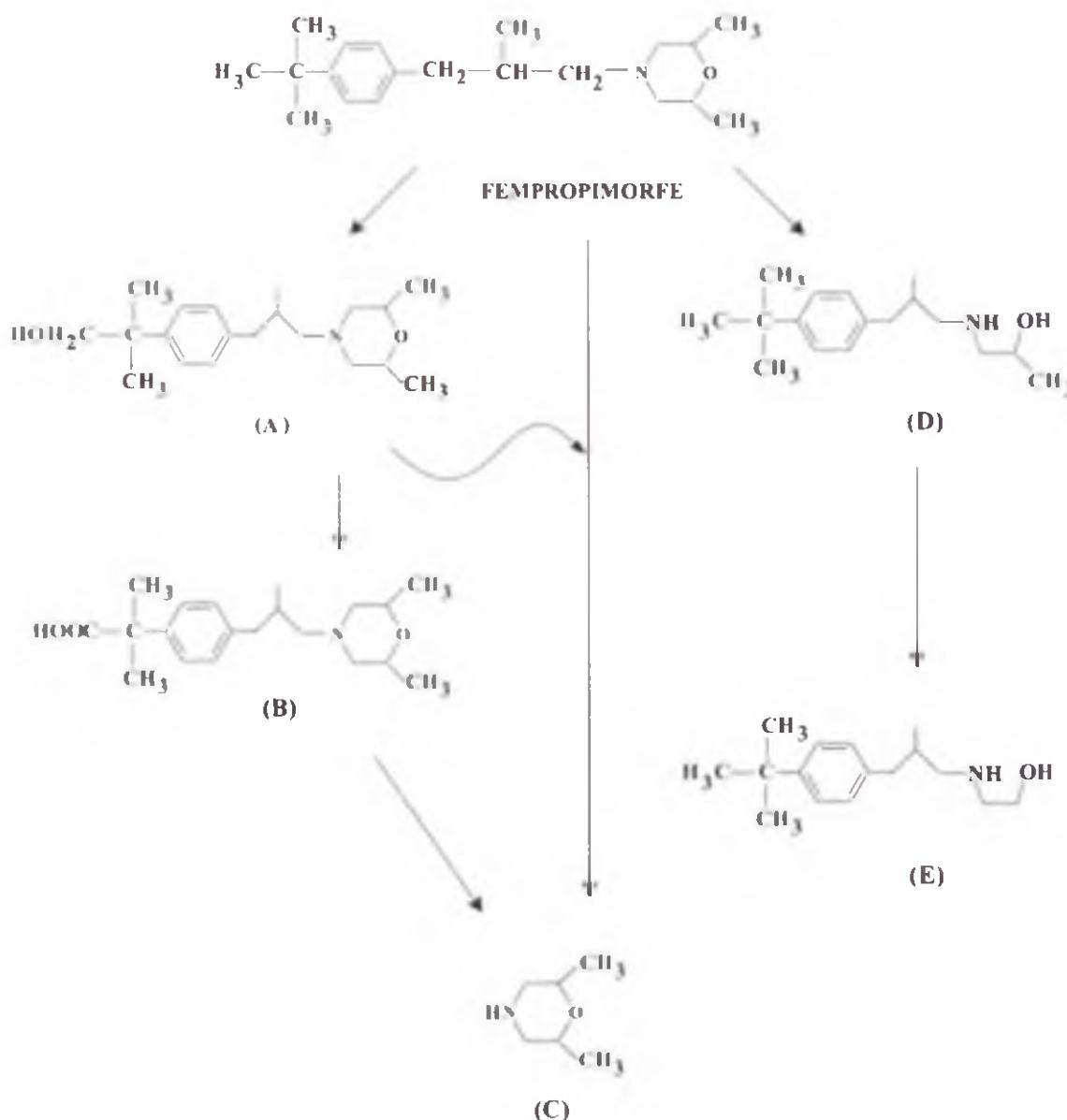
O fempropimorfe é um inibidor da biossíntese de esteróis, amplamente utilizado em aplicação foliar para o controle de fungos fitopatogênicos. Os efeitos colaterais deste fungicida em diversos organismos do solo foram relatados, uma vez que na dose de campo inibe muitos outros fungos não-alvo (KUCK & SCHEINPFLUG, 1986; STEEL *et al.*, 1989; LOEFFLER & HAYES, 1992). Alguns protozoários também são sensíveis ao produto nesta dose, reduzindo a pressão predatória sobre as bactérias (EKELUND *et al.*, 1994; EKELUND, 1999; THIRUP *et al.*, 2000). Segundo Thirup (2001) as *Pseudomonas* e os actinomicetos não foram afetados pelo fempropimorfe, ao contrário, estes organismos o degradaram para ácido fempropimórfico, que tem maior mobilidade no solo.

Este composto em condições de campo tem sua degradação iniciada pela oxidação do grupo *terc*-butil, além da oxidação e abertura do anel dimetilmorfolínico, produzindo os compostos: ácido (B), hidroxietilaminas (A, D e E) e dimetilmorfolina (C), conforme Figura 2. Estes resíduos foram identificados no solo por Huber, (1979) e von der Mühl *et al.* (1980). O primeiro autor determinou em experimento com ^{14}C -fempromorfe que após 32 semanas o $^{14}\text{CO}_2$ desprendido foi de 50% da radioatividade total aplicada. Nenhum outro composto volátil radioativo foi observado. O autor concluiu que os resultados indicaram uma rápida degradação do composto parental e sugeriu a rota apresentada na Figura 2. No sistema aeróbio água-solo a degradação é similar com exceção do anel morfolínico que não é aberto. No solo são formados outros produtos através da fotólise deste composto.

Em experimentos de campo a meia-vida determinada para fempropimorfe foi de 36 a 47 dias em solos argilosos e arenosos, respectivamente (STOCKMAIER *et al.*, 1996). No entanto, Tomlin (2000) relata a meia-vida de aproximadamente 15 e 93 dias em solos arenosos com alto e baixo teor de matéria orgânica, respectivamente, indicando que o composto é fortemente adsorvido ao solo, portanto, com baixo potencial de lixiviação.

3.2 Benzimidazóis

Dentre os fungicidas orgânicos, com ação sistêmica dentro da planta, os benzimidazóis são os mais conhecidos devido à sua propriedade e eficácia no controle



- (A) 4-(3-(4-(2-hidroxi-1,1-dimetil)etilfenil)-2-metilpropil)-*cis*-2,6-dimetilmorfolina
- (B) 2-metil-2-(4-(2-metil-3(cis-2,6-dimethylmorpholina-4-yl)propil)fenil)propanóico
- (C) *cis*-2,6dimetilmorfolina
- (D) (3-(4-tert-butilfenil)-2metilpropil)(2-hidroxipropil)amina
- (E) [3-(4-tert-butilfenil)-2-metilpropil](2-hidroxietil)amina

FIGURA 2. Rota metabólica do fempropimorfe no sistema solo/água.

de fitopatógenos de importância econômica. Os fungicidas sistêmicos desse grupo, como o benomil, o tiofanato metílico, o tiabendazol e o carbendazim se caracterizam por uma alta especificidade e tóxicos a baixas concentrações. O uso contínuo desses produtos na agricultura tem resultado em uma pressão de seleção na população dos patógenos com subsequente surgimento de linhagens extremamente resistentes (PICININI, 1994). Além disso, a grande quantidade de produto que chega ao solo pode contaminar os lençóis freáticos e afetar a vida selvagem, principalmente no caso de moléculas mais resistentes e recalcitrantes, como o carbendazim.

Nos últimos vinte anos o benomil tem sido um dos fungicidas mais utilizados (JONHSON & LAVY, 1994). Nos solos, seu resíduo biologicamente ativo é o carbendazim (MBC) (AUSTIN & BRIGGS, 1976).

A velocidade de dissipação do fungicida na solução do solo depende das propriedades físico-químicas da molécula e do solo e das condições bióticas que prevalecem no solo. Em solos tratados com benomil, Fleeker *et al.* (1974) e Rouchaud *et al.* (1974) encontraram para a meia-vida deste fungicida, períodos de 3-6 e 6-12

meses em turfa e solo, respectivamente. Eles observaram que o produto encontrado em maior concentração foi carbendazim e o menor, o metabólito 2-aminobenzimidazol.

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

Em solo arável, Raynal & Ferrari (1973) detectaram 8 µg g⁻¹ de benomil após seis meses da aplicação de 100 µg g⁻¹ do fungicida. Um composto relacionado a benzimidazol, o tiofanato-metílico, foi menos persistente que o benomil (NETZER & DISHON, 1973). O benomil nos solos foi detectado mesmo após três meses de sua aplicação. A concentração de benomil adicionada (100mg g⁻¹) diminuiu mais rapidamente em extrato de solos ricos em húmus do que em solos de jardim e diminuiu lentamente em extratos de solos minerais (HELWEG, 1973). Após seis meses da aplicação do benomil, o efeito fungistático em extrato de solo foi de <10% em solos com húmus, cerca de 30% em solos de jardim e 75% em solos minerais. Nesses trabalhos, não ficou claro se o efeito fungistático foi devido ao benomil e/ou carbendazim. Possivelmente, o carbendazim, facilmente formado a partir do benomil, foi responsável pela fungistase.

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

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

(1977), citado por Rajagopal *et al.* (1984), confirma que o carbendazim adicionado ao solo diminuiu do nível original de $6 \mu\text{g g}^{-1}$ para $3 \mu\text{g g}^{-1}$, nos três primeiros meses, após a aplicação, sem nenhum decréscimo posterior durante os próximos seis meses.

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

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

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

O carbendazim aplicado nas concentrações de 5, 10, 20 e $40 \mu\text{g g}^{-1}$ não foi detectado no solo após 3, 5, 8, e 11 meses respectivamente (SINHÁ *et al.*, 1980). Já Musumeci *et al.* (1980a) observaram a persistência de carbendazim em dois solos latossolos (62 a 86%), mesmo após 300 dias de incubação. O produto de degradação 2-AB foi detectado em maiores quantidades (23%) em um dos solos enriquecido com glicose e extrato de levedura. A degradação de carbendazim foi mais rápida em solos ricos em matéria orgânica (MUSUMECI *et al.*, 1980b). Após 150 dias de incubação, 2-AB foi o principal produto de degradação detectado.

O destino de produtos de degradação tem sido estudado em condições de laboratório, sob influência de tratamentos prévios dos respectivos fungicidas. Tem-se verificado que a adaptação microbiana aos produtos de degradação é relativamente significante (YARDEN *et al.*, 1990), principalmente quando o efeito agrotóxico é causado pelos produtos de degradação. Estes podem acelerar a degradação de agrotóxicos aplicados repetidamente, como podem também, por outro lado, prolongar a persistência dos mesmos no ambiente. O 2-AB foi instável no solo, decompondo-se rapidamente após um intervalo de três semanas, mas pequenas quantidades

permaneceram no solo por muitas semanas, presumivelmente pela adsorção das partículas no solo (HELWEG, 1977). O desprendimento máximo de $^{14}\text{CO}_2$, a partir de ^{14}C -2-AB foi a 22°C e permaneceu constante entre 25° e 30°C. Todavia, a 40°C, o desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ foi insignificante (HELWEG, 1979). A degradação de 2-AB (desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$) mostrou um aumento experimental de acordo com o aumento do conteúdo de água, de 28 a 94% da capacidade de campo do solo. Mas o desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ foi comparativamente menor em solos com a quantidade de água acima de 94% da capacidade de campo. O 2-aminobenzimidazol se dissipa rapidamente em solos expostos à molécula-mãe, carbendazim, permanecendo somente 6% deste após 4 dias de aplicação (AHARONSON *et al.*, 1990). Nestes solos, a degradação de 2-aminobenzimidazol foi mais rápida do que da molécula parental. A taxa de degradação do benzimidazol, um metabólito estruturalmente semelhante, não é afetada por aplicações continuadas do carbendazim. Já o carbendazim apresentou uma taxa de degradação mais rápida em solo com história de aplicação de benomil do que em solo sem aplicação desse produto (YARDEN *et al.*, 1985).

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

Os microrganismos têm sido responsáveis pela degradação do benomil e do carbendazim, esta constatação está baseada em estudos de persistência em sistemas estéreis e não estéreis (HELWEG, 1973; SIEGEL, 1975; HELWEG, 1977).

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

Muitas espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Flavobacterium* foram isoladas em solos enriquecidos com benomil (SMITH & WORTHING, 1975; SPENCER *et al.*, 1972; WEEKES & HEDRIC, 1971), mas não foi observada a capacidade desses microrganismos em degradar o benomil, com a clivagem do anel benzimidazólico. Da mesma forma, o anel heterocíclico benzimidazólico, do carbendazim ou de benzimidazóis relacionados resistiu a clivagem, pelos fungos, durante o metabolismo (DAVIDSE, 1976; VALENTA *et al.*, 1974; YASUDA *et al.*, 1973). Há poucos exemplos da degradação pelos microrganismos, com aparente clivagem da porção heterocíclica da molécula de carbendazim (FLEECKER *et al.*, 1974; HELWEG, 1977; SIEGEL, 1975). De acordo com Helweg (1977), o fungicida foi raras vezes usado pelos microrganismos como fonte de energia, possivelmente pelo fato do núcleo benzimidazólico ser degradado por co-metabolismo. Para outros autores, como Rouchaud *et al.* (1974, 1977a; b); Solel *et al.* (1973), as plantas também são responsáveis pela clivagem do anel benzimidazol, porém, segundo Vonk & Kaars Sijpesteijn (1977), a decomposição fotoquímica contribui para a clivagem do anel.

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

Em meio basal tamponado, suplementado com solo tratado com benomil, a concentração do carbendazim marcado começava a decrescer após 10 dias e quase desaparecia aos 40 dias. Concomitantemente havia formação de 2-AB radioativo, alcançando a concentração máxima aos 24 dias, diminuindo após 35 dias. A análise Budget demonstrou que o 2-AB foi convertido subsequentemente a CO₂ (65%) e 2-AB nucleotídeo. Realmente, após 40 dias a maior parte da radioatividade encontrada no meio foi relacionada a 2-AB nucleotídeo. A análise total, conclusiva, demonstrou uma clivagem significante do anel do núcleo benzimidazol de 2-¹⁴C-carbendazim para ¹⁴CO₂. Segundo Fuchs & de Vries (1978b), a proporção

de degradação do benomil e carbendazim é baixa, e o composto parental benomil foi recuperado em quantidades substanciais mesmo após 80 dias de incubação.

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

O método de enriquecimento do solo com benomil foi eficiente para o isolamento de microrganismos degradadores de carbendazim. O fungo *Alternaria alternata*, isolado de solos agrícolas que haviam recebido aplicações de benomil, degradou 66% do fungicida carbendazim em dois dias

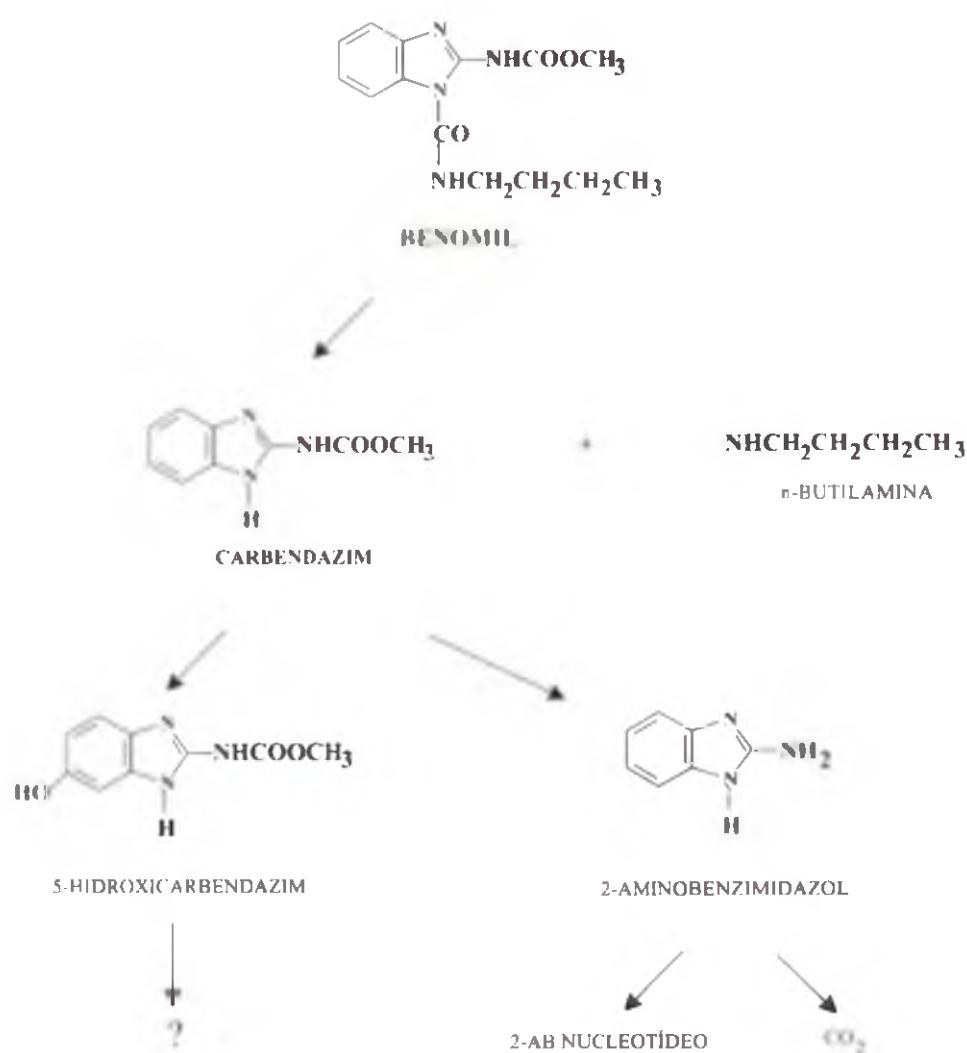


FIGURA 3. Rota da degradação de benomil no solo e em cultura pura.

com meia-vida de aproximadamente 20 horas (SILVA, 1996). Yarden *et al.* (1990) atribuíram a degradação de carbendazim por *A. alternata* ao mecanismo metabólico do fungo, segundo eles, a conjugação ou detoxificação oxidativa poderiam ser consideradas como processos igualmente presentes na degradação. *A. alternata*, e todos os Porosporae não são inibidos pelos fungicidas do grupo dos benzimidazóis e podem ser considerados como potentes agentes de descontaminação ambiental, pois esses fungicidas são usados extensivamente na agricultura, muitas vezes indiscriminadamente. Eles atuam numa ampla gama de gêneros de fungos fitopatogênicos de importância agronômica como os oídios, bolores (*Penicillium*), *Botrytis* spp., antracnoses, cercosporioses, sarnas e patógenos de solo.

Dentro da linha de biorremediação com a utilização de fungos degradadores Silva *et al.* (1996) verificaram que o fungo lignocelulolítico *Phanerochaete chrysosporium* utiliza carbendazim como fonte de carbono e apresenta um potencial para degradação do produto.

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

Yarden *et al.* (1987); Yarden *et al.* (1990), observaram que as taxas mais altas de degradação de carbendazim foram em solos tratados previamente com benomil, indiferente ao tipo de solo, cultivo, método de aplicação e outros fatores. Esta degradação acelerada também foi evidente no campo onde houve aplicação foliar do fungicida. Isso indica que mesmo baixas doses do agrotóxico são suficientes para condicionar o solo à degradação acelerada do mesmo composto.

Ao mesmo tempo em que as aplicações repetidas de agrotóxicos aumentaram sua velocidade de degradação, outras práticas agrícolas como a desinfestação diminuíram esta velocidade (YARDEN *et al.*, 1985). Os solos desinfestados com brometo de metila, solarização ou esterilização em autoclave apresentaram aumento de persistência de carbendazim, após o tratamento. Por outro lado, os autores observaram que também os fungicidas tiram e acetato de fentina inibiram a degradação de carbendazim. Como os agrotóxicos mencionados suprimem principalmente a população fúngica no solo, os resultados obtidos validam a importância dos fungos na degradação de carbendazim e benomil.

O aumento da degradação dos agrotóxicos não só resulta da aplicação freqüente do mesmo composto, mas também da capacidade de degradação adquirida devido ao contato com outros agrotóxicos estruturalmente relacionados. Yarden *et al.* (1985) observaram, em solos que recebiam aplicações constantes de benomil, em condições de campo, um aumento na degradação desse composto, 2 meses após a colheita.

Segundo Helweg (1977), a degradação de carbendazim e benomil é principalmente microbiana, porém uma certa proporção poderia ser imobilizada por processos não biológicos.

A estabilidade hidrolítica do carbendazim para pH 5,7 e 9 e a temperatura nominal de 22, 50 e 70°C foi estudada em intervalos acima de 30 dias. A elevação da

temperatura e do pH aumentava a degradação do carbendazim. As meias-vida calculadas para a degradação deste fungicida no pH 5 e a 22, 50 e 70°C foram de 457, 108 e 20 dias, respectivamente. No pH 7,0 e a 50 e 70°C as meias-vida foram de 43 e 12 dias (não houve grande declínio à 22°C). A meia-vida para pH 9,0 e 22, 50 e 70°C foram de 22, 1,4 e 0,3 dias, respectivamente (PURSER, 1987).

O carbendazim também foi exposto à luz solar por 30 horas (como resíduo em sílica gel G) e menos que 10% foi dissipado após a exposição. A foto-oxidação do anel benzeno do carbendazim foi a reação predominante com detecção de guanina, carbometoxiguanina e carbometoxiurea. Quando o carbendazim foi aplicado em folhas de milho e exposto a luz solar por 18 horas, não foram detectados produtos da fotólise nos extratos das plantas (FLEEKER & LACY, 1977).

3.3 Ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos constituem uma classe importante de fungicidas orgânicos para o controle de doenças de plantas (EBDC, 1977; ANDEF, 2003). De acordo com os diferentes modos de ação e vias de degradação, são reconhecidos dois grandes grupos dentro desta classe, os monoalquilas e derivados diaquilas, (KAARS SIJPSTEINJN *et al.*, 1977; KAARS SIJPSTEINJN & van DERK, 1954). O primeiro grupo, derivado das aminas primárias, possui um hidrogênio reativo no(s) átomo(s) de nitrogênio e como consequência produz produtos de conversão que diferem em muitos aspectos dos dialquilditiocarbamatos (KAARS SIJPSTEINJN *et al.*, 1977). Com a exceção do fungicida de solo metilditiocarbamato sódico, os monoalquilditiocarbamatos são derivados da etilenodiamina, enquanto os dialquilditiocarbamatos são derivados da dimetilamina.

a) Monoalquilditiocarbamatos

Os fungicidas deste grupo incluem manebe, zinebe (Figura 4) e o derivado relacionado mancozebe (KAARS SIJPSTEINJN *et al.*, 1977).

Os fungicidas etilenobisditiocarbamatos (EBDC) são compostos relativamente instáveis que são transformados para vários produtos principalmente por processos químicos, mas com significativo envolvimento biológico. O composto solúvel em água nabam (etenobisditiocarbamato dissódico) (Figura 4) não é usado como fungicida, mas serve como modelo para estudar a ação e degradação dos fungicidas EBDC's. Ele, por exemplo, é extremamente instável em solução aquosa e é transformado para os seguintes produtos: etilenotioréia (ETU), 5,6-dihidro-3H-imidazo (2,1-c)-1,2,4-ditiazol-3-tiona (DIDT), dissulfeto polimérico de etilenotium, etilenodiamina, etilenodiisotiocianato, enxofre elementar, CS₂ e H₂S (KAARS SIJPSTEINJN *et al.*, 1977). Zinebe e manebe produzem os mesmos produtos de decomposição em solução aquosa como nabam, mas em menor velocidade (KAARS SIJPSTEINJN *et al.*, 1977).

A ETU (Figura 4), uma impureza encontrada nos fungicidas técnicos EBDC's (WOODCOCK, 1977) é o maior produto de degradação destes fungicidas (ETHYLENOTHIOUREA, 1977) e é suscetível a biodegradação. Há muitas preocupações em relação a ETU devido ao seu risco potencial ao homem (FISHBEIN,

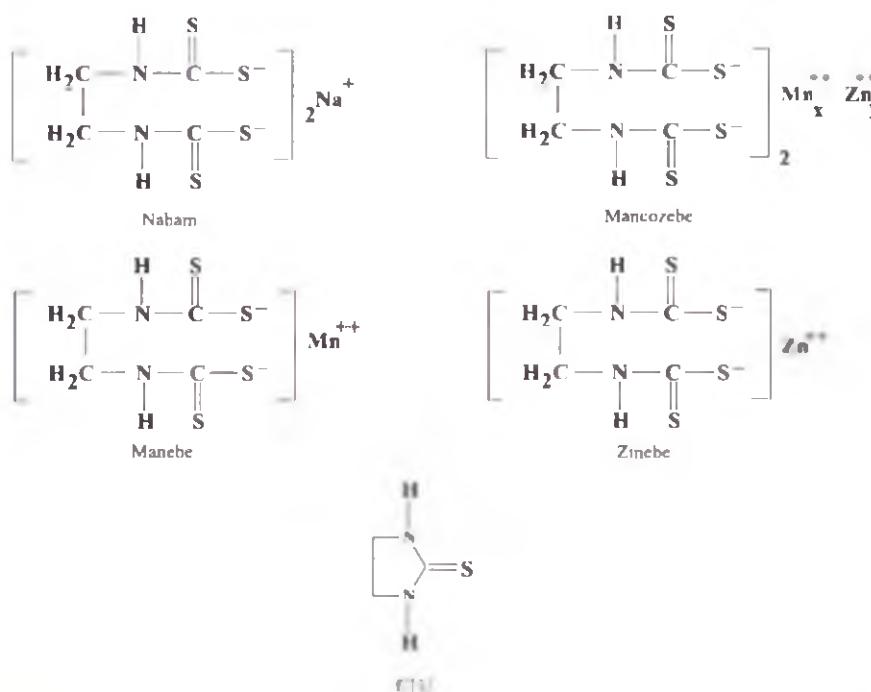


FIGURA 4. Estrutura de alguns etilenobisditiocarbamatos e etilenotiuéia (ETU).

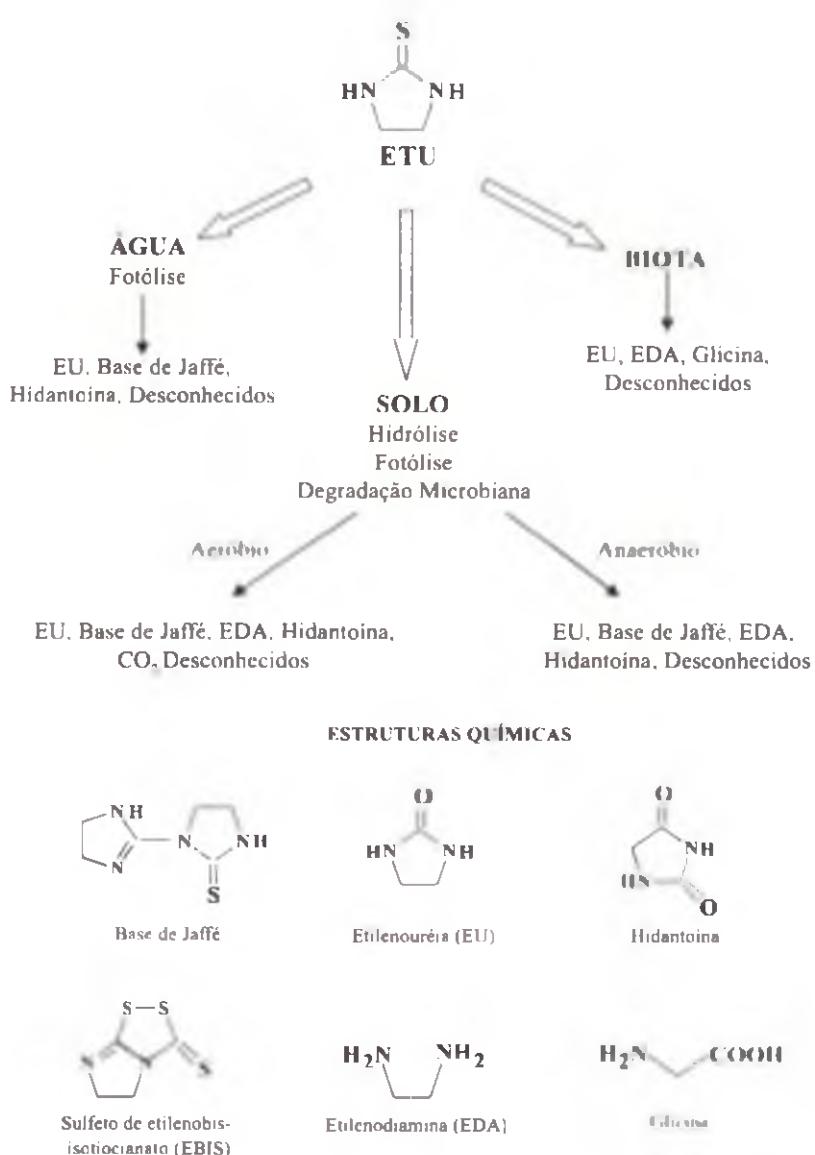


FIGURA 5. Degradção da etilenotiuéia em água, solo e biota (XU, 2003a).

1977). ETU é carcinogênica, goiterogênica, teratogênica e mutagênica havendo evidências suficientes em experimentos animais. Não há evidências da carcinogenicidade em humanos (IARC, 2004). Em água a ETU é relativamente estável à hidrólise mas pode ser rapidamente fotolisada na presença de fotosensibilizadores, que estão presentes em muitas águas naturais (XU, 2003a).

Além da ETU formada pela degradação química dos fungicidas EDBC's, os microrganismos aceleram a sua formação a partir dos produtos intermediários de degradação (DIDT). Bactérias e fungos, tanto quanto preparações puras de enzimas destes organismos, convertem DIDT para ETU, mas estes organismos não degradam ETU (VONK, 1975).

Segundo Sittig (1985) a ETU é rapidamente degradada em solos e pode ser química e biologicamente decomposta a etilenouréia (EU) com meia-vida variando de 1 a 7 dias sob condições de campo (KAUFMAN & FLETCHER, 1973; NASH & BEALL, 1980; MILES & DOERGE, 1991). De acordo com Kaufman & Fletcher (1973), diferentes concentrações de ETU (2, 20 e 200 ppm) foram totalmente degradadas e principalmente convertidas para EU dentro de 2, 2 e 8 dias, respectivamente, em solos silto-argilosos. Vários autores verificaram que a ETU e EU podem ser mineralizadas para CO₂ em solos não estéreis (MILLES &

DOERGE, 1991; JOHANNENSEN *et al.*, 1996; JACOBSEN & BOSSI, 1997). A mineralização de 10 ppm de ETU ocorreu em torno de 22 dias (LYMAN & LACOSTE, 1974). Os metabólitos de ETU em solos foram EU, hidantoína, base de Jaffé, etilenodiamina (EDA), CO₂ e outros compostos não conhecidos (Figura 5).

A degradação microbiana representa a menor rota na degradação do manebe (Figura 6) (DOWNING, 2003), porque esse fungicida é moderadamente solúvel em água e é hidroliticamente decomposto pela umidade presente no solo (SANBOM *et al.*, 1977). Seus principais produtos de hidrólise são o EU, ETU, sulfeto de etilenobis(isotiocianato) (EBIS) e glicina.

A dissipação do manebe é relatada em vários estudos com resultados diferenciados. Nash & Beall (1980) observaram que a meia-vida do manebe, aplicado na cultura de tomate em solo arenoso-argiloso, foi de 36 dias, enquanto Fraunhofer (1987a) observou que na degradação aeróbia em solo argiloso, 15,9% da radioatividade aplicada foi mineralizada e detectada como CO₂, após 32 dias. Em solo arenoso-argiloso, com 30 dias de incubação os autores recuperaram 22,82% do CO₂ radioativo. A degradação do manebe em solo produziu EU, ETU, carbimida, EBIS e seis frações não identificadas (Figura 6). Na degradação anaeróbia observada em solo argiloso, 5,5% da radioatividade aplicada foi recuperada como ¹⁴CO₂. Neste caso, os produtos de degradação do manebe foram EU, ETU, carbimida, EBIS e quatro frações não identificadas (FRAUNHOFER, 1987b).

O mancozebe, outro membro dos fungicidas EBDC tem uma pressão de vapor insignificante, portanto, baixo potencial de volatilização no ar. Na água ele é

facilmente hidrolisado com meia-vida menor que 2 dias. Os produtos da degradação hidrolítica são EU, ETU e EBIS (Figura 7) (XU, 2003b).

Este fungicida tem baixa persistência no solo porque é facilmente degradado. Após três meses de aplicação em solo não esterilizado, Doneche *et al.* (1983) não detectaram resíduos de mancozebe. Em condições aeróbias e em condições seqüencial de aerobiose e anaerobiose, em solos silto-argilosos estéreis e não estéreis, foi verificado o metabolismo de 20 ppm e 10 ppm de ¹⁴C-mancozebe (R&H Company, 1987a; b). A temperatura média nestes trabalhos foi de 23°C ± 0,6°C. Em ambos os solos estudados houve a formação de EU via

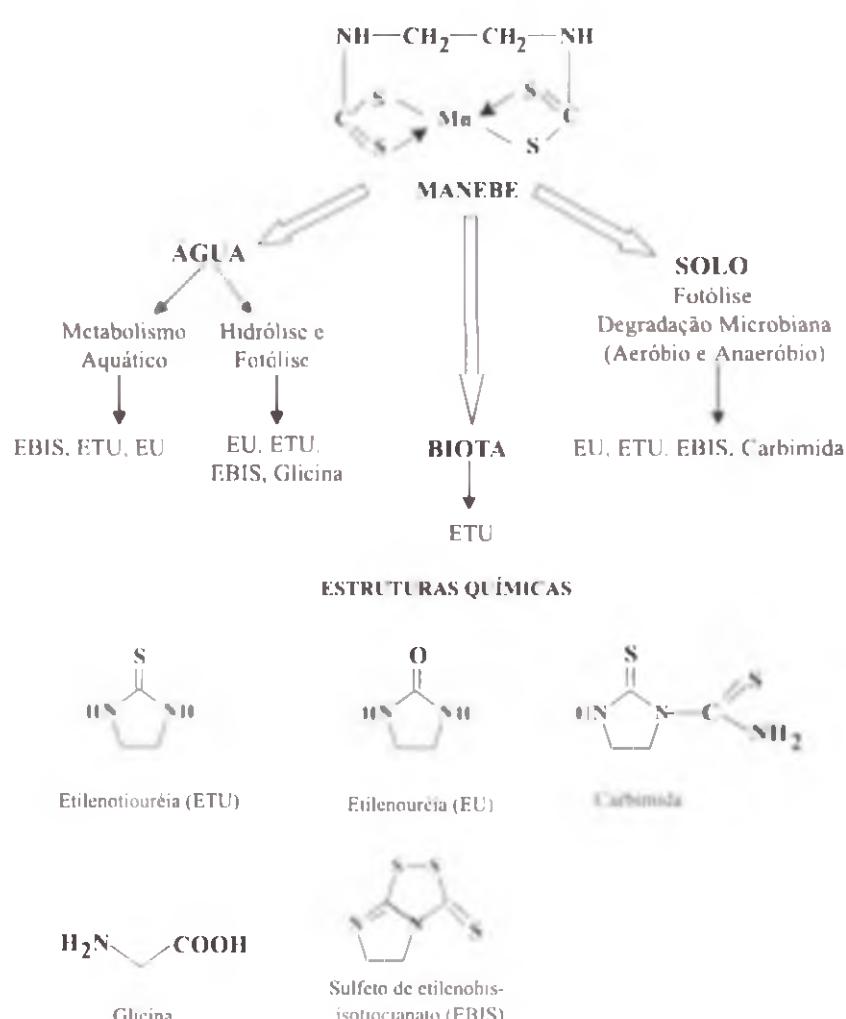


FIGURA 6. Rota degradativa do manebe.

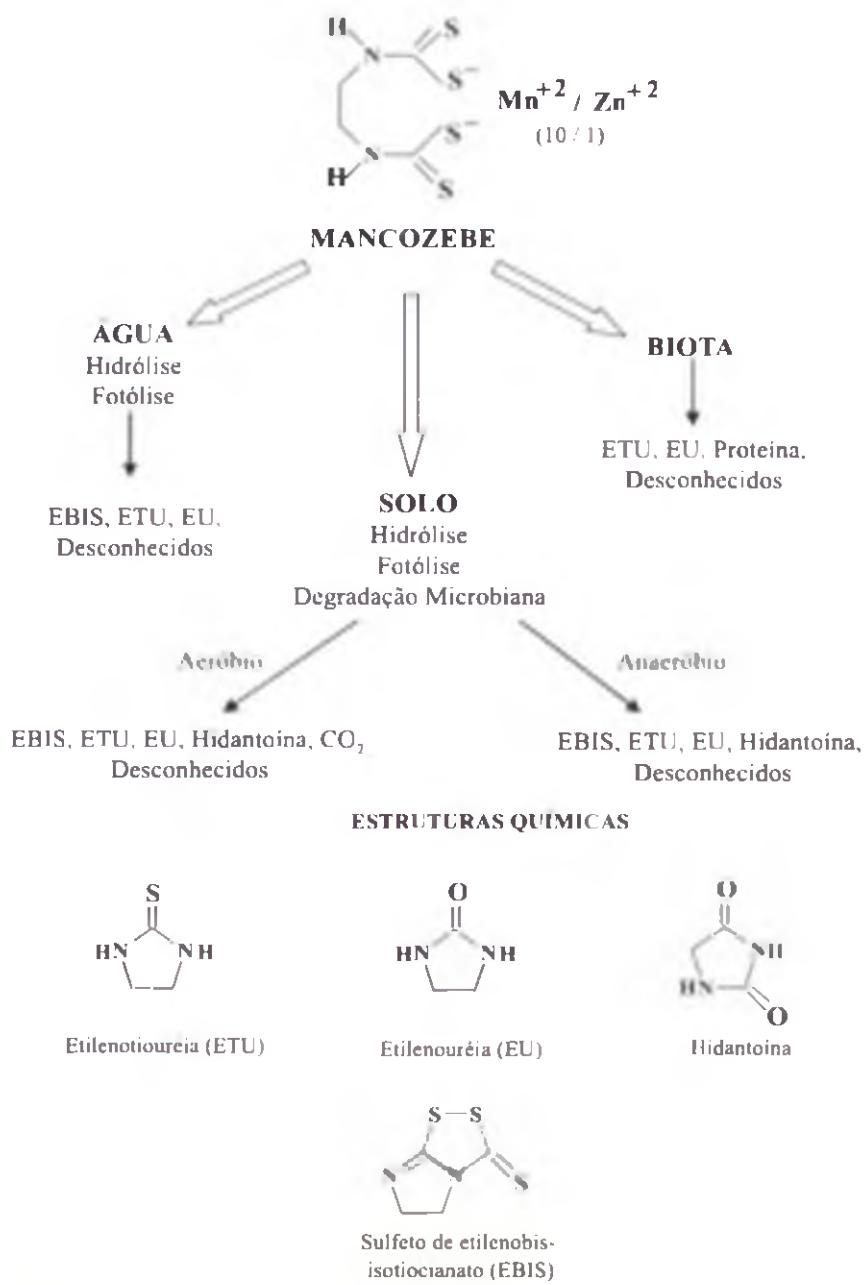


FIGURA 7. Rota degradativa do Mancozebe em solo, água e biota (XU, 2003b).

tiocarbamato técnico como produto de degradação biológica (KAUFFMAN & FLETCHER, 1973; KAARS SIJPESTEIJN & VONK, 1974).

Sob condições ácidas os dimetilditiocarbamatos são rapidamente decompostos para CS₂ e dimetilamina (THORNE & LUDWIG, 1962). A degradação microbiológica de tiram para estes produtos provavelmente aconteceu após a redução para dimetilditiocarbamatos (KAARS SIJPESTEIJN *et al.*, 1977). Esta degradação pode ser realizada por ácidos produzidos pelos organismos, contudo não pode ser excluído o envolvimento de mecanismos enzimáticos.

A velocidade de degradação do tiram em solo foi dependente da concentração aplicada (MUNNECKE & MIKAIL, 1967). A degradação foi mais rápida em solo não esterilizado do que em esterilizado, indicando o papel dos microrganismos na degradação. Além disso, o efeito da concentração do fungicida na velocidade de degradação refletiu, em parte, na inibição da atividade microbiana. Raghu *et al.* (1975) propuseram uma via de degradação para o tiram em solo, incluindo os metabólitos microbianos ácidos conjugados de DDC (α -aminobutírico e α -cetobutírico) e outros

intermediário EBIS e ETU. Sob condições anaeróbias, uma pequena quantidade de EU foi posteriormente degradada para 2-imidazolina e outros compostos não conhecidos. A meia-vida estimada para a mineralização da concentração de 20 e 10 ppm de Ditane M-45® foi de 50 e 90 dias, respectivamente (LYMAN & LACOSTE, 1975). Em solos aeróbios não estéreis e anaeróbios, a meia-vida aproximada de mancozebe foi menor que 2 e 8 dias, respectivamente, enquanto a ETU teve meia-vida menor que 2 dias em solos não estéreis (ARS, 1995).

b) Diaquilditiocarbamatos

As curvas de degradação do ferbam (dimetilditiocarbamato férreo) em solo foram comparáveis às do nabam, evidenciando novamente o processo de degradação físico-química. No entanto, a etilenotioureia que ocorre tanto como impureza no etilenobisisotiocarbamato

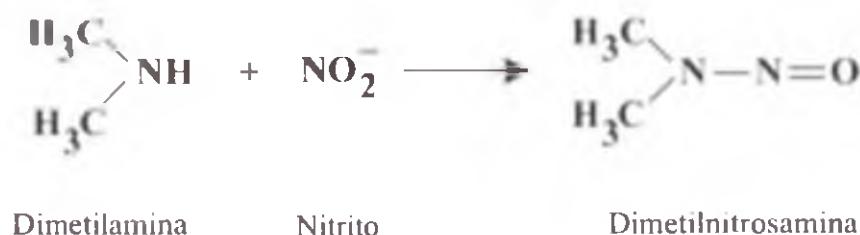


FIGURA 8. Reação de dimetilamina com nitrito para formar dimetilnitrosamina.

1973), provavelmente como produto da degradação da dimetilamina (Figura 8).

Morgenroth & Muller-Kallert (1995) suplementaram um solo argiloso coletado em Nova York com 20,3 mg do ingrediente ativo kg⁻¹ que representava a taxa de aplicação no campo (18 kg i.a. ha⁻¹). O solo foi incubado por 205 dias sob condições aeróbias, no escuro, a 20°C, sendo a umidade mantida a 75% da capacidade de campo. O desaparecimento do composto parental não seguiu a equação de primeira ordem, mas a meia-vida foi de 2 dias, com 87% de degradação aos 7 dias e 97% aos quatorze dias. O maior produto de degradação foi dimetil carbamotioperoxoato. Este metabólito alcançou o nível máximo 1,8 mg kg⁻¹ aos 4 dias de incubação e excedeu o nível do composto parental após 42 dias, mas 98% da molécula teste já havia desaparecido neste tempo.

A mineralização do resíduo foi rápida com 9% do ¹⁴C aplicado desprendido como ¹⁴CO₂ em dois dias e 50% dentro de 21 dias. Resíduos ligados ou não-extraíveis alcançaram um máximo de 48% da dose aplicada aos 14 dias e posteriormente declinaram lentamente para 31% aos dia 205. A produção de ¹⁴CO₂ foi bem menor do que os resíduos na forma ligada. Fracionamentos da matéria orgânica do solo demonstraram que a maior parte do ¹⁴C não-extraível estava ligada às frações humina e ácidos húmicos.

Burri *et al.* (1995) aplicaram [¹⁴C] tiram em uma fina camada do mesmo solo areno-argiloso utilizado por Morgenroth & Muller-Kallert (1995), na concentração equivalente a 18 kg i.a ha⁻¹. O solo foi exposto à luz artificial com o espectro simulando a luz do sol, com ciclos de 12 horas entre claro e escuro, durante 21 dias a 20°C. A meia-vida para o desaparecimento de tiram, no tratamento controle no escuro foi de 15,9 dias e no solo sob luz artificial foi de 3,7 dias. O ¹⁴C volátil produzido pelo solo sob luz artificial alcançou 57% do ¹⁴C aplicado (37% como CO₂, e provavelmente 20% como CS₂), enquanto 11% foram desprendidos pelo controle.

3.4 Fталонитрилс

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisoftalonitrila-TPN) (Figura 9) é um fungicida de contato, clorado e de amplo espectro e muito utilizado no Brasil, em culturas de grãos, legumes e frutas (BRASIL, 1998) e, embora a sua aplicação seja foliar, análises de solos de regiões onde tal agrotóxico é utilizado têm apresentado valores residuais altos (CAUX *et al.*, 1996). É aplicado por ocasião da semeadura ou por aplicação foliar. Também é freqüentemente aplicado via água de irrigação. A dosagem utilizada

produtos como dimetilamina, dimetilnitrosamina, CS₂, enxofre elementar, metionina, amônia e formaldeído.

A dimetilnitrosamina é formada a partir do tiram na presença de nitrato ou nitrito em solos acídicos sob condições de alagamento (AYANABA *et al.*, 1973), provavelmente como produto da degradação da dimetilamina (Figura 8).

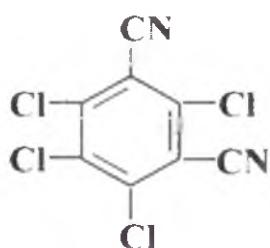


FIGURA 9. Estrutura química do fungicida clorotalonil (TPN).

Esta molécula pode causar efeitos tóxicos à microflora do solo, a médio ou longo prazo, (HABTE *et al.*, 1992; KATAYAMA *et al.*, 1991b;c; SUYAMA *et al.*, 1993; Tu, 1993), o que poderá afetar uma série de atributos benéficos decorrentes da presença dos microrganismos no solo. A contaminação do solo e da água pelo clorotalonil pode ocorrer em função da aplicação direta do produto ou indiretamente via deriva ou escoamento superficial (CAUX *et al.*, 1996). Por ser o clorotalonil um composto policlorado e ter caráter lipofílico, a persistência de seus resíduos causa preocupação ambiental (GAJBHIYE *et al.*, 1996).

A reatividade dos substituintes halogênios do clorotalonil é facilitada pelas propriedades eletrofílicas dos grupos ciano (TILLMAN *et al.*, 1973), e a posição e número de halogênios são fatores importantes na determinação de sua ação tóxica (VINCENT & SISLER, 1968). A hidrofobicidade do agrotóxico e a presença de grupos funcionais facilmente transferidos pelos microrganismos afetam a taxa de biodegradação.

A literatura apresenta muitos trabalhos mostrando que o TPN é rapidamente degradado pelos microrganismos do solo, apresentando meia-vida variando de 5 a 36 dias (KATAYAMA *et al.*, 1991a; MOTONAGA *et al.*, 1998; SATO & TANAKA, 1987; SUN *et al.*, 1985; TAKAGI *et al.*, 1991).

Gajbhiye *et al.* (1989), em experimento utilizando solo e duas doses do fungicida (1 kg ha^{-1} e 2 kg ha^{-1}), observaram que a dissipação do clorotalonil foi mais rápida quando o produto foi aplicado em doses menores. Em baixas concentrações, o efeito do fungicida não foi muito efetivo porque a maior parte dele foi adsorvida pelos colóides do solo e somente uma pequena fração estava disponível para interação com a microbiota do solo. Assim, com o aumento da dose, cada vez mais porções tornavam-se disponíveis havendo consequentemente efeitos adversos nos crescimentos microbianos, inibindo desta forma a biodegradação. Os resíduos diminuíram com o passar do tempo, e as perdas foram rápidas durante os 7 primeiros dias após a aplicação, havendo dissipação de 49,7% e 58% em relação às doses aplicadas. Nos 23 dias subsequentes a perda foi de 14,5% e 19,5%. Após 30 dias o solo tinha $0,54$ e $1,16 \mu\text{g g}^{-1}$ de resíduo, respectivamente, para a dose mais baixa e mais alta. Após 60 dias os resíduos eram não detectáveis ($< 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$).

Segundo Balasubramanian & Mathan (1996) quanto maior o conteúdo de matéria orgânica e quanto menor for o valor do pH de um solo, maior a adsorção do clorotalonil resultando em menor degradação e maior persistência. Em estudos com coluna de solo, apenas 2,8% do clorotalonil aplicado foi recuperado na eluição da coluna, sugerindo a ocorrência de uma forte adsorção, aumentando a persistência do produto, ou uma degradação significativa do composto (REDUKER *et al.*, 1988).

varia de acordo com a cultura e o patógeno, variando de 0,8 a 4,7kg de ingrediente ativo por hectare (i.a. ha^{-1}). O modo de ação do fungicida nos fungos é atribuído à sua capacidade de ligação e depleção da glutationa celular. É também capaz de se ligar e inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH), necessária para a glicólise (CAUX *et al.*, 1996; VINCENT & SISLER, 1968).

As bactérias degradadoras de clorotalonil estão presentes em solos com e sem histórico de aplicação desse fungicida. Na região de Guaíra, SP, foram isoladas bactérias degradadoras de clorotalonil, tanto de solos provenientes de áreas cultivadas com tomate como de áreas de preservação ambiental. As bactérias isoladas e selecionadas, após crescimento em meio mineral líquido suplementado com diferentes concentrações do fungicida ($20, 40$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram repicadas em meio mineral líquido suplementado com $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de clorotalonil para estudo da degradação. Bactérias que degradaram acima de 80% do composto orgânico foram caracterizadas através da metodologia convencional e molecular. Pela análise convencional seis organismos selecionados pertenciam ao grupo dos actinomicetos; na base de dados do RDP estes organismos foram identificados como: *Arthrobacter nicotinovorans*, *A. globiformis*, *A. ilicis* e *A. ureafaciens* (FAY, 2000). Segundo o mesmo autor, a incorporação de diferentes materiais orgânicos ao solo aumentou a comunidade de degradadores e diminuiu a biodisponibilidade do fungicida, minimizando os efeitos adversos do clorotalonil.

De acordo com Katayama *et al.* (1991b) a maioria das bactérias degradou o clorotalonil na presença de outras fontes de carbono. Katayama *et al.* (1991a) observaram considerável similaridade com o co-metabolismo, após a aplicação repetida do fungicida em solo sem histórico de aplicação do produto. Ainda que a degradação tenha sido suprimida, o que diferencia este composto de outros agrotóxicos, não ocorreu uma *fase lag* quando o clorotalonil foi aplicado pela primeira vez. A capacidade de degradação foi recuperada após a adição de compostos orgânicos facilmente assimiláveis (glicose, extrato de carne) o que indicou a importância destes materiais na degradação microbiana do fungicida em solos.

A supressão da degradação do clorotalonil em solos agrícolas também foi observada por Takagi & Wada (1990) após um longo período de aplicação. Segundo os autores essa supressão poderia ser explicada pelo seguinte fato: os microrganismos degradadores do clorotalonil são sensíveis o suficiente para serem suprimidos pelo clorotalonil dissolvido na solução do solo em concentração superior a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Eles observaram que a degradação do clorotalonil não foi suprimida após repetidas aplicações, quando foi incorporado carvão ativado ao solo, levando dessa forma à diminuição da concentração do produto na solução do solo. Segundo os autores, este fato indicou toxicidade do produto às bactérias degradadoras. No entanto, Sato & Tanaka (1987) sugeriram um enriquecimento das bactérias degradadoras do clorotalonil em solo, após a aplicação do fungicida.

Katayama *et al.* (1991b) isolaram bactérias degradadoras tolerantes ao clorotalonil, em concentração de 40 mg L^{-1} , discordando da proposição de Takagi & Wada (1990). A razão pela qual a degradação do clorotalonil em solos é suprimida por aplicações repetidas, embora haja um aumento da população degradadora de bactérias, ainda precisa ser solucionada. Segundo Katayama *et al.* (1991b), a hipótese para essa supressão é que a falta de matéria orgânica facilmente degradável inibe a biodegradação de clorotalonil no solo. Além disso, os autores observaram que o clorotalonil da solução do solo teve sua concentração diminuída pela adsorção à matéria orgânica adicionada, resultando daí uma maior taxa de dissipaçāo.

Ainda que a degradação deste fungicida possa ser suprimida, o clorotalonil acumulado pode vir a ser biodegradado após aclimatação em posteriores aplicações repetidas (MOTONAGA *et al.*, 1996). Estes autores observaram que a taxa de degradação do clorotalonil era significativamente diminuída após aplicações repetidas em experimento de campo, embora a taxa de degradação fosse completamente recuperada após posteriores aplicações do produto. Contrariamente ao comportamento da maioria dos agrotóxicos, as aplicações repetidas do clorotalonil suprimem a biodegradação devido à toxicidade do persistente e altamente móvel metabólito, hidróxi-clorotalonil (TPN-OH) sobre a biomassa do solo (MOTONAGA *et al.*, 1998).

Motonaga *et al.* (1996) também observaram, em laboratório, a degradação do clorotalonil (TPN) em quantidades estequiométricas de TPN-OH e anion cloreto (Cl^-). As bactérias que degradaram o TPN foram isoladas do solo e a suspensão das células dessas bactérias transformou o TPN em TPN-OH e Cl^- , mas não o utilizaram, portanto houve co-metabolismo. Acreditam os autores que a aclimatação ocorreu durante aplicações repetidas porque as bactérias não foram detectadas em solos que não haviam sido tratados com clorotalonil.

A influência da umidade e temperatura na degradação deste composto está demonstrada nos trabalhos realizados por Sato & Tanaka (1987). O aumento do conteúdo de umidade do solo (0,6 para 8,9%) ou aumento na temperatura de incubação acelerou a taxa de transformação. Os autores encontraram que 90% das bactérias isoladas em solos com aplicação prévia de clorotalonil foram capazes de degradá-lo e o fungicida foi metabolizado, principalmente, através de decloração. Essa dehalogenação hidrolítica haloaromática específica ocorre quando o halogênio é substituído por um grupo hidroxila da água, embora esse mecanismo pareça ser raro em comparação às dehalogenações oxidativas (SLATER *et al.*, 1995).

Em condições de laboratório, Sato & Tanaka (1987) observaram que a degradação ocorreu mais rapidamente com a umidade em 60% da capacidade de campo quando comparada a 20, 40 e 100% dessa capacidade. A 100% a degradação foi mínima havendo condições predominantemente anaeróbias no solo. Assim, concluíram que as condições aeróbias são as mais indicadas para a degradação desse fungicida no solo. No entanto, alguns agrotóxicos organoclorados podem sofrer degradação muito rápida em solos em condições de anaerobiose (STENERSON, 1965; SETHUNATHAN, 1973).

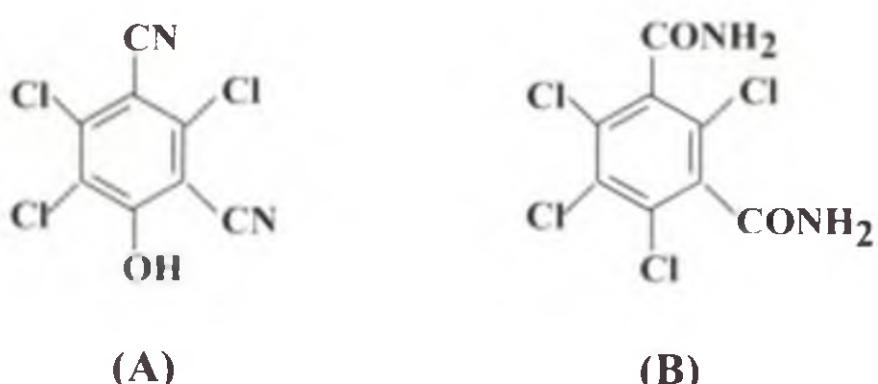


FIGURA 10. Estrutura química do TPN-OH (A) e do 1,3-dicarbamoil-2,4,5,6-tetraclorobenzeno (B).

A transformação primária do clorotalonil (TPN) em solos é microbiana, tendo como principal produto o TPN-OH (4-hidróxi-2,5,6-tricloroisofalonitrila), (Figura 10), o qual pode ser encontrado em solo, planta e animais. É aproximadamente trinta vezes mais tóxico do que o clorotalonil e mais persistente e móvel no solo (COX, 1997; SATO &

TANAKA, 1987; ROUCHAUD *et al.*, 1987). Segundo Alexander (1999), uma variedade de fungicidas é convertida microbiologicamente a substâncias que também apresentam atividade antifúngica, sendo estas conversões fungicida-para-fungicida descritas em culturas microbianas. Rouchaud *et al.* (1987) demonstraram em solo a conversão do fungicida clorotalonil no fungicida 1,3-dicarbamoil-2,4,5,6-tetraclorobenzeno, por ação microbiana.

Motonaga *et al.* (1996) indicaram que uma possível rota de degradação do clorotalonil em solo é a substituição nucleofílica do cloro (posição 4) pelo íon hidroxila. A substituição não foi devida à hidrólise abiótica porque o pH do solo era ácido. Segundo Szalkowski & Stallard (1977) o clorotalonil é hidrolisado a pH 9,0 em soluções aquosas, enquanto a pH 7,0 ou mais baixo não foi observada a degradação. O metabolismo por microrganismos do solo foi responsável por esta degradação, possivelmente porque as bactérias o detoxificaram.

O destino do TPN-OH passa a ser um problema ambiental, porque o metabólito hidroxilado tende a lixivar para o sub-solo ou águas subterrâneas uma vez que é mais solúvel em água (MOTONAGA *et al.*, 1996). Os autores supõem que grande parte do metabólito pode lixiviar e parte pode ser degradada ou retida no solo.

Outros metabólitos detectados para o clorotalonil foram a 3-cianotriclorohidroxibenzamida, 3-cianotriclorobenzamida e tricloro-3-carboxibenzamida (CAUX *et al.*, 1996), além da m-ftalodinitrila, também conhecida por isoftlonitrila (COX, 1997).

Regitano *et al.* (2001), estudaram a dissipação do clorotalonil utilizando carbono marcado (^{14}C), o que permitiu acompanhar os diferentes processos de transformação, como a mineralização, a degradação e a formação de resíduos ligados. Apresentaram também os coeficientes de sorção e a atividade microbiana dos solos. Utilizaram três tipos de solos ácidos do Brasil, gley húmico (GH), latossolo vermelho escuro (LE) e areia quartzosa (AQ), com ampla variação nas propriedades físico-químicas considerando que os solos tropicais são mais ácidos do que os de clima temperado, e consequentemente a rota metabólica do TPN poderia ser afetada. A mineralização foi lenta em todos os solos, e após 90 dias, somente 13,8, 5,7 e 2,8% do TPN aplicado foi desprendido como $^{14}\text{C-CO}_2$ nos solos GH, LE, e AQ, respectivamente. Este resultado indicou que a mineralização não foi a principal rota metabólica dos microrganismos degradadores, evidenciando que o TPN é degradado principalmente por co-metabolismo. Quanto à formação de resíduos ligados obteve 46, 34 e 18% nos solos GH, LE e AQ, respectivamente. A maior parcela de resíduos ligados foi formada no primeiro dia da aplicação, mas o envelhecimento também contribuiu para a formação de formas menos reversíveis do complexo TPN-solo. A degradação foi acompanhada pelo aparecimento de metabólitos por cromatografia de camada delgada (CCD), e a média geral da recuperação no experimento foi de 96,4%. No tempo zero a recuperação do $^{14}\text{C-TPN}$ extraível variou entre 95 a 98%, sendo que praticamente 100% desta radioatividade correspondia ao composto original nos solos LE e AQ. Já o solo GH não apresentou resultado com a utilização de CCD. Nos solos LE e AQ à medida que o metabólito ácido 3-carbamilo-2,4,5-triclorobenzólico (Figura 11) aumentava, o TPN extraído do solo continuava a decrescer durante todo o período de incubação, sendo este o metabólito mais abundante em ambos os solos. Os autores acreditam

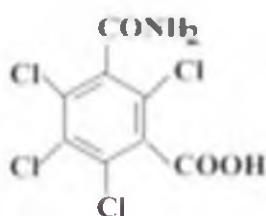


FIGURA 11. Estrutura química do metabólito ácido 3-carbamoil-2,4,5-triclorobenzóico.

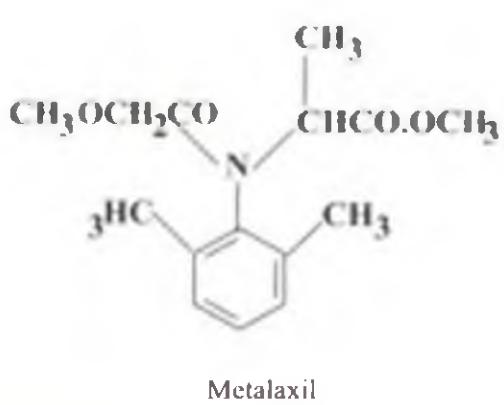


FIGURA 12. Estrutura química do metalaxil.

furalaxil, foi primeiramente descrito em 1977 (URECH *et al.*, 1977) e sua fungitoxicidade está associada à função éster da molécula. O metalaxil inibe a síntese do RNA ribossomal, interferindo desta forma na síntese de proteínas (TOMLIN, 2000).

A degradação do metalaxil tem sido relatada como sendo, principalmente, microbiológica e dependente de fatores como tipo de solo, condições climáticas e histórico de aplicação (BAILEY & COFFEY, 1985; 1986). A capacidade de degradar o fungicida tem sido atribuída a muitos microrganismos, tanto em cultura pura como mista (MUSUMECI *et al.*, 1986; ZHENG *et al.*, 1989; ANAN'EVA *et al.*, 1997; SOUDAMINI *et al.*, 1997 e 1999). Entretanto, o papel das populações naturais na degradação desta molécula ainda é pouco conhecido. Droby & Coffey (1991) demonstraram que fungos, bactérias e actinomicetos presentes no solo foram capazes de transformar a molécula do fungicida. Em solo arenoso, a população natural apresentou na taxa de degradação do metalaxil diferenciada, quando considerada superfície e sub-superfície do solo (DI *et al.*, 1998). Spessoto *et al.* (2000); Spessoto (2002) confirmaram a biodegradação da molécula do metalaxil e observaram que as bactérias foram predominantes durante todo o experimento, enquanto que os actinomicetos e fungos foram suprimidos na presença do fungicida.

A meia-vida do metalaxil tem sido descrita como variável, podendo ser alguns dias até meses. Por exemplo, estudos realizados com microrganismos isolados de solos com histórico de aplicação do metalaxil apresentaram meia-vida de 14 dias

que a principal rota metabólica envolva oxidação/hidratação dos grupos ciano, originando a amida correspondente, e subsequentemente o ácido orgânico, nos solos ácidos utilizados. Outra rota seria a dehalogenação redutiva ou a hidroxilação levando a formação do TPN-OH. A dissipação do TPN foi rápida nos solos testados principalmente devido à degradação microbiana e a ligação aos solos.

O metalaxil [metil D,L,N-(dimetilfenil)-N-(2-metoxiacetyl)alaninato] (Figura 12) fungicida sistêmico do grupo dos alaninatos (acilaninas), é uma mistura racêmica de enantiômeros R- e S-, com classe toxicológica variando de II a IV, dependendo de sua formulação. É extensivamente utilizado na agricultura brasileira, em fruticultura, plantas ornamentais e hortaliças (GELMINI, 1991; SPESSOTO *et al.*, 2000; PAPINI & ANDRÉA, 2001; SPESSOTO, 2002). Em função do amplo espectro de atividade ele é registrado para uso em muitos países, em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (MONKIEDJE *et al.*, 2002). Juntamente com o

(BAILEY & COFFEY, 1986), enquanto que estudos sobre a mineralização do fungicida, considerando solos com diferentes teores de areia apresentaram meia-vida entre 69 e 159 dias (WANG *et al.*, 1995). Segundo Spessoto (2002) uma vez que a molécula esteja disponível na solução do solo ela pode ser rapidamente metabolizada, diminuindo os riscos ambientais provocados pela recalcitrância. A ausência de metabólitos provenientes da mineralização do anel radiomarcado em estudos realizados pelo autor reforçou esta hipótese, sugerindo que a degradação do metalaxil pode ocorrer num prazo inferior a 70 dias de incubação.

Outros trabalhos demonstraram o aparecimento de dois metabólitos provenientes da degradação do fungicida, após 60 dias de incubação, sendo que apenas um foi identificado como N-(2-metoxiacetil)-N-(2,6xilil)-DL-alanina (MUSUMECI & RUEGG, 1984). Outros autores detectaram a presença de um metalaxil ácido como sendo o maior metabólito gerado pela degradação do fungicida (DROBY & COFFEY, 1991).

Solos que apresentam histórico de aplicação de agrotóxicos têm sido relatados como capazes de dissipar mais facilmente estas moléculas pelo fato de apresentarem populações microbianas que se caracterizam por um curto período de aclimatação e rápida fase exponencial de crescimento (ALEXANDER, 1999). Vários autores demonstraram que em solos onde existe histórico de aplicações constantes de metalaxil foram observadas as maiores taxas de dissipação do fungicida em menor tempo (BAILEY & COFFEY, 1986; DROBY & COFFEY, 1991; NARESH *et al.*, 1997; PAPINI & ANDRÉA, 2001; SPESSOTO, 2002). A aplicação repetida do fungicida pode aumentar a seleção dos microrganismos degradadores e consequentemente aumentar a taxa de degradação da molécula, cujo fenômeno é conhecido como biodegradação acelerada. Droby & Coffey (1991) avaliaram as taxas de biodegradação de metalaxil ¹⁴C em seis solos com características diferentes durante quatro semanas e os resultados variaram de 2,1% até 11,3%. Os solos com histórico de aplicações prévias do fungicida foram os que apresentaram as maiores taxas de biodegradação e, de acordo com as porcentagens remanescentes de radioatividade, determinaram a meia-vida do fungicida como sendo de apenas seis dias.

Um exemplo de degradação acelerada de metalaxil em solos brasileiros é apresentado por Papini & Andréa (2001). Os autores estudaram a dissipação do fungicida em dois tipos de solos utilizados para plantio de laranja e limão. Os resultados demonstraram que a degradação acelerada ocorreu somente em um tipo de solo, embora em ambos tenha sido detectado degradação parcial e mineralização do fungicida. Segundo os autores, as amostras de áreas tratadas apresentaram taxa de mineralização pelo menos duas vezes mais altas quando comparadas às áreas nunca expostas ao fungicida (máximo de 26,9% e 11,5%, respectivamente).

Em estudos sobre a degradação acelerada do metalaxil pela ação sinérgica entre bactérias e fungos isolados de três solos diferentes, Soudamini & Awasthi (1997) observaram que as culturas de fungos não oomicetos de todos os solos interagiram para aumentar a degradação do fungicida. Culturas enriquecidas em solo arenoso, depois de repetidas aplicações de metalaxil, nas condições de seco, alagado e irrigado agiram mais efetivamente na degradação do fungicida que outras culturas obtidas em solos nunca expostos ao agrotóxico.

Considerando quatro solos diferentes, Spessoto (2002) verificou que as bactérias demonstraram tendência a beneficiar-se com a presença da molécula do fungicida no solo, sugerindo a existência de populações adaptadas à degradação do composto, cujos resultados ficaram evidentes em solos com histórico de aplicação do fungicida. As maiores taxas de mineralização foram obtidas nestes solos, sugerindo que as aplicações sucessivas do composto estimulariam ou selecionariam o crescimento de microrganismos aptos a degradarem o fungicida. Segundo o autor os *Bacillus* seriam o grupo de degradadores de metalaxil mais indicados como agentes biológicos em estudos de biorremediação de solos contaminados com o fungicida.

3.5 Dicarboximidas

Os fungicidas dicarboximidas foram introduzidos na agricultura, no final da década de 1970, devido a forte resistência adquirida por fungos fitopatogênicos aos benzimidazóis. São amplamente utilizados para o controle de doenças fúngicas em vegetais e frutas. Iprodiona, procimidona e vinclozolina, diclorofenil dicarboximidas, são os mais importantes membros desta classe de fungicidas e inibe a germinação dos esporos, o crescimento micelial e ocasionam lise das células (CABRAL & CABRAL, 2000).

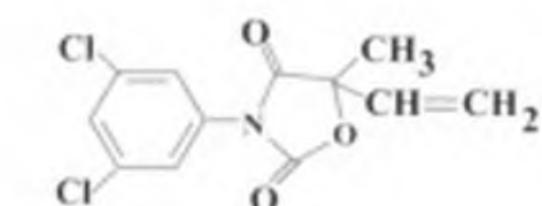
De forma geral, as culturas recebem várias aplicações destes compostos durante o crescimento e após a colheita os restos são aproveitados para compostagem. Neste processo a matriz verde sofre biodegradação aerobia e estes compostos podem transformar-se em metabólitos de acordo com uma cinética específica. É importante verificar a presença ou não destes fungicidas no final da compostagem para evitar a reintrodução de substâncias potencialmente perigosas no ciclo de produção ou de seus metabólitos eventualmente mais tóxicos. Vanni *et al.* (2000a; b) determinaram a presença dos fungicidas carboximidas por meio da 3,5-dicloroanilina, metabólito comum deste grupo, no final do processo de compostagem. Em algumas amostras encontraram o composto parental e o metabólito, e em outras só a 3,5-dicloroanilina; portanto, a sua presença sem a molécula parental pode ser utilizada como um índice de transformação atingido pela compostagem. A ausência do metabólito na presença do parental pode ser devida ao limite de detecção do método utilizado para a análise dos resíduos ou pelo baixo grau de maturação atingido na compostagem. Deve-se levar em consideração que o produto resultante da compostagem tem diversos usos e o perigo da bioacumulação não deve ser ignorado, uma vez que a toxicidade dos possíveis produtos de degradação é desconhecida.

Estes autores propuseram a seguinte rota de degradação para a vinclozolina em solos (Figura 13).

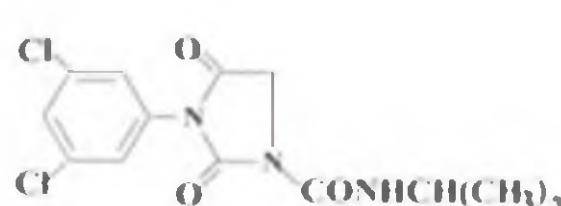
A persistência da vinclozolina em três solos tropicais, sob cultivo de arroz, com características físico-químicas extremamente diferentes, foi comparada em condições de solo seco e alagado. A degradação do fungicida foi mais rápida em condições de alagamento para os três solos estudados. A degradação seguiu a cinética de primeira ordem independentemente do tipo de solo ou regime de água. Foi observado que a acidez do solo e a salinidade afetaram significativamente a persistência do

fungicida em condições de solo seco. A degradação foi acelerada depois de repetidas aplicações em um solo aluvial em ambos os regimes hídricos, sendo que em condições de alagamento a degradação acelerada foi maior. A 3,5-dicloroanilina foi detectada como metabólito da degradação do fungicida nestes solos (BANERJEE, 1999).

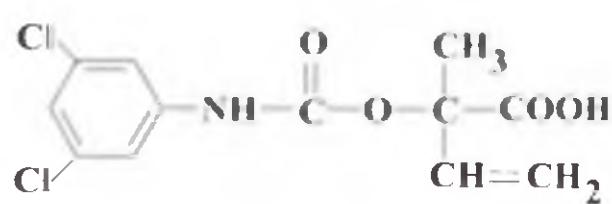
Vanni *et al.* (2000b) estudaram a presença e o destino da iprodiona e procimidona na compostagem, uma vez que este processo não é muito bem compreendido. Além disso, é possível encontrar em culturas e no ambiente resíduos e/ou metabólitos destes fungicidas como consequência das aplicações freqüentes ou porque o intervalo entre os tratamentos não é respeitado. Os autores compararam a degradação biótica e abiótica destes compostos, num intervalo de oito meses, e observaram que a cinética das reações eram distintas. Propuseram então uma rota de biodegradação para estes compostos (Figura 14). A iprodiona mostrou rápida transformação para 3,5-dicloroanilina, único metabólito detectado após 30 dias. Por espectrometria de massas, o composto intermediário formado, durante o processo de compostagem, foi identificado como sendo isômero (3-isopropil-N-(3,5-diclorofenil)-2,4 dioxol-imidazolidina-carboxamida) quantitativamente convertido do composto parental. O resultado está de acordo com o encontrado em amostras de vegetais fortificadas com o produto por Newsome & Collins (1990).



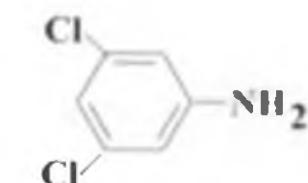
VINCLOZOLINA



IPRODIONA

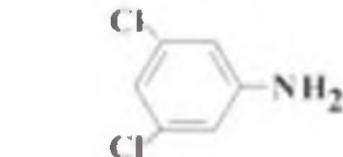


Isômero I



3,5-Dicloroanilina

FIGURA 13. Rota de degradação da vinclozolina (VIGOUROUX, 2003).



3,5 Dicloroanilina

FIGURA 14. Rota da biodegradação de iprodiona (European Commission, 2004; VANNI *et al.*, 2000b).

A procimidona durante o período estudado (0 – 241 dias) apresentou 70% de transformação, permanecendo 30% da molécula original na compostagem. A degradação biológica da procimidona apresentou 2 metabólitos, a 3,5-dicloroanilina e o 2-(3,5-diclorofenilcarbamoil)-1,2-dimetilpropano carboxílico (metabólito I). O metabólito I, posteriormente foi degradado a 3,5-dicloroanilina.

Os fungicidas dicarboximidas e os tiocarbamatos parecem ser particularmente suscetíveis a biodegradação acelerada. Para os fungicidas iprodiona e vinclozolina a incorporação de pequenas quantidades (0,1%) de solo pré-condicionado em solos cuja degradação dos fungicidas foi relativamente lenta, aumentou as taxas de dissipaçāo destes compostos (WALKER & WELSH, 1990).

3.6 Estrobilurinas

As estrobilurinas, uma nova classe de fungicidas para uso agrícola, são derivadas do ácido β -metoxiacrílico e estruturalmente relacionadas a estrobilurina A, produto natural excretado por fungos (BARTLETT *et al.*, 2002). São utilizadas para o controle e tratamento de várias culturas entre elas as frutícolas, apresentando amplo espectro de ação sendo, portanto, efetivas contra diferentes grupos de fungos fitopatogênicos (Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota) (EPA, 1999; MCGRATH, 2003). De aplicāo predominantemente foliar, estes compostos têm atividade translaminar, isto é, movem-se através das folhas tratadas, proporcionando controle em ambas as faces das mesmas (BARTLETT *et al.*, 2002; VINCELLI, 2002).

Comercializadas a partir de 1996 nos Estados Unidos, as estrobilurinas e os fungicidas relacionados (famaxadona e fenamidona, quimicamente distintos, mas no mesmo grupo de resistência cruzada) venderam aproximadamente US\$ 620 milhões em 1999, representando portanto, mais de 10% do mercado global de fungicidas em apenas 4 anos (BARTLETT *et al.*, 2002). A azoxistrobina foi o primeiro composto deste grupo a ser registrado pelo EPA seguido da trifloxistrobina (EPA, 1999).

O impacto deste grupo na agricultura pode ser observado pela venda da azoxistrobina, registrada em 72 países para uso em 84 diferentes culturas, representando acima de 400 sistemas cultura/doença. As vendas de azoxistrobina foram de US\$ 415 milhões em 1999, sendo o fungicida mais vendido no mundo (BARTLETT *et al.*, 2002). Apesar desta importância comercial, são escassas as referências bibliográficas sobre o comportamento e destino destes compostos.

No Brasil, segundo os números de registro no Sistema de Informação de Agrotóxicos (SAI), os primeiros produtos técnicos formulados à base de cresoxim-metílico e azoxistrobina tiveram seu registro no MAPA em 1998, enquanto a trifloxiestrobina e a piraclostrobina somente em 2001 (Tabela 4). Uma diferença estrutural importante entre a azoxistrobina e o cresoxim-metílico é que o último contém um grupo (*E*)-metil metoxiiminoacetato no lugar de (*E*)-metil β -metoxiacrilato (Figura 15), o que lhes confere distintas propriedades biológicas (BARTLETT *et al.*, 2002). As estrobilurinas apresentam propriedades físico-químicas muito diferentes o que conseqüentemente lhes confere uma ampla variedade de comportamentos biocinéticos tanto no interior da planta quanto na superfície externa (BARTLETT *et al.*, 2002).

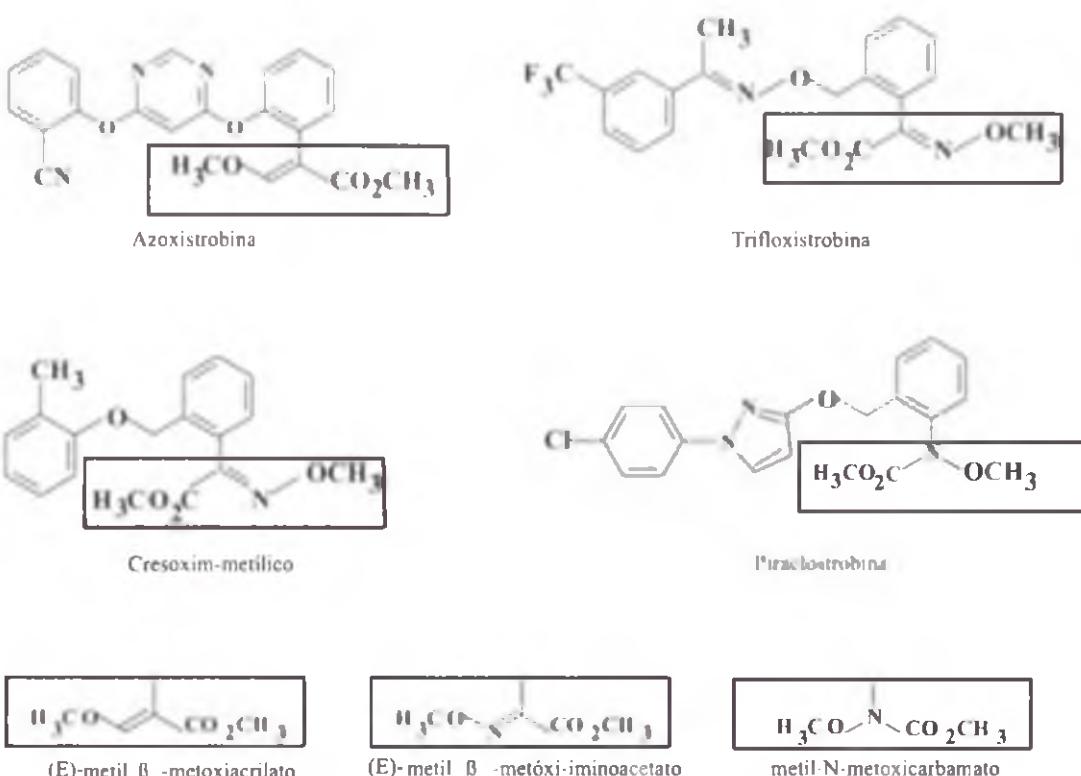


FIGURA 15. Fungicidas do grupo das estrobilurinas.

TABELA 4. Estrobilurinas registradas no Brasil.

Fungicidas	Ano de registro
Azoxistrobina	1998
Cresoxim-metílico	1998
Trifloxystrobina	2001
Piraclostrobina	2001

Fonte: ANVISA, 2004.

As estrobilurinas têm um único sítio de atuação e inibem a respiração mitocondrial, pela ligação ao chamado sítio Q_o do citocromo *b*, localizado na membrana mitocondrial interna de fungos e outros eucariotos, bloqueando a transferência de elétrons na cadeia respiratória (MCGRATH, 2003; ZIEGLER *et al.*, 2003). Baseado neste novo modo de ação, as estrobilurinas controlam os fungos que são resistentes aos fungicidas inibidores da demetilação (DMI), fenilamidas, dicarboximidas e benzimidazóis (BARTLETT *et al.*, 2002; MA *et al.*, 2003). Estudos com azoxistrobina, cresoxim-metílico, trifloxystrobina e piraclostrobina (Figura 15) demonstraram que no desenvolvimento dos fungos, a germinação dos esporos e a motilidade dos zoosporos são extremamente sensíveis a estes compostos (BARTLETT *et al.*, 2002). Isto pode ser explicado pelo modo de ação bioquímico destes produtos, pois são disruptores da produção de energia, sendo portanto efetivos nestes estágios de desenvolvimento que demandam alta energia, contrastando com os triazóis que inibem a biossíntese do ergosterol e portanto não impedem a germinação dos esporos e o crescimento dos tubos germinativos iniciais (BARTLETT *et al.*, 2002). O efeito potente das estrobilurinas sobre a germinação dos esporos e motilidade dos zoosporos explica o alto nível de atividade preventiva dada por estes fungicidas, em função da variação individual dos ingredientes ativos, amplo espectro, controle de isolados fúngicos

resistentes a outros fungicidas com diferentes modos de ação, aliado à baixa concentração na aplicação (BARTLETT *et al.*, 2002).

Por serem compostos com atuação sítio-específicos as estrobilurinas foram classificadas como de “risco reduzido” pela EPA (VINCELLI, 2002).

As estrobilurinas são rapidamente degradadas, portanto, a persistência em qualquer compartimento ambiental não é motivo para preocupação (Tabela 5) (BARTLETT *et al.*, 2002). A hidrólise não é a principal rota de dissipaçāo ambiental, mas a adsorção, degradação microbiana e a fotólise também são rotas importantes. Embora não haja dados disponíveis para a piraclostrobina, as estrobilurinas seguem um padrão típico similar para a degradação em solos, com a formação de metabólitos que potencialmente têm maior mobilidade, porém são menos tóxicos do que o composto parental (BARTLETT *et al.*, 2002). O metabólito principal, a forma ácida destes compostos, é inativo. Não há evidências que estes compostos causem efeitos genéticos, carcinogênicos ou problemas na reprodução, portanto, quando aplicados segundo as recomendações técnicas, não apresentam efeitos adversos na saúde humana (AUSTRÁLIA, 2000; EUROPEAN COMMISSION, 2000).

A degradação rápida da trifloxiestrobina foi observada, em vários tipos de solos, sendo a meia-vida em laboratório menor do que três dias. O principal metabólito foi o ácido, cuja meia-vida foi significativamente maior em laboratório, em torno de cem dias, embora isômeros do composto parental e do metabólito ácido tenham sido formados sob muitas condições experimentais (AUSTRÁLIA, 2000). Em estudos de laboratório e campo foi observada rápida degradação para o metabólito ácido, mais solúvel e, portanto, mais lixiviável, principalmente em função do tipo de solo. No campo a meia-vida do composto parental foi inferior a 5 dias, e em solos com ampla diferença nas características físico-químicas o resultado foi o mesmo. A trifloxiestrobina foi caracterizada como não sendo preocupante em relação aos microrganismos do solo. Em sete solos testados, utilizando compostos radiomarcados, em aerobiose, a meia-vida da trifloxiestrobina foi de 2 dias, e o metabólito ácido apresentou meia-vida entre 100-473 dias. Entretanto, em solo estéril, a degradação foi significativamente retardada com meia-vida acima de 100 dias para o composto parental (AUSTRÁLIA, 2000).

A taxa de degradação pode ser afetada tanto pela temperatura quanto pela umidade dos solos, tanto para o parental quanto para o metabólito. Em condições normais de campo ($T=20^{\circ}\text{C}$ e umidade de 60%), a mineralização da trifloxiestrobina foi alta, na ordem de 50% ou mais. Esta rápida degradação foi independente do tipo de solo. O metabólito foi lentamente convertido para $^{14}\text{CO}_2$ por ter sido incorporado

TABELA 5. Persistência das estrobilurinas em solo e água.

Composto	Solo DT ₅₀ (dias)	Água DT ₅₀ (dias)
Azoxistrobina	7 - 56 ^a	$\pm 7^{\text{d}}$
Cresoxim-metílico	< 1 ^a	1 ^b
Trifloxiestrobina ^a	4 - 10	0,3 - 1
Piraclostrobina ^c	2 - 37	--

Fonte: a: Tomlin, 2000; b: US EPA, 1998; c: Ammermann *et al.*, 2000; d: Syngenta GLP data.

nos constituintes do solo (ácidos húmicos, fúlvicos e humina), indicando a mineralização da porção radiomarcada da molécula (AUSTRÁLIA, 2000).

4. Considerações finais

A maioria dos fungicidas é transformada predominantemente por processos biológicos. Os resíduos desses compostos podem ser mineralizados por um simples microrganismo ou envolver o efeito interativo das comunidades mistas de microrganismos e conta com a versatilidade metabólica das bactérias e fungos. As transformações bióticas dos fungicidas geralmente resultam na degradação da estrutura molecular em formas mais simples, no entanto a molécula pode persistir se as condições ambientais forem desfavoráveis para a atividade degradativa.

Quando a biodegradação é o principal processo de degradação, a aplicação repetida dos compostos leva ao enriquecimento das populações degradadoras, originando um desaparecimento acelerado da molécula com atividade fungicida. A biodegradação acelerada de fungicidas é uma ameaça significativa para a eficácia destes produtos. Embora seja consequência de processos naturais de adaptação metabólica, este processo pode ser considerado por dois ângulos: do ponto de vista agronômico aumenta a necessidade de utilização do produto, diminui a eficácia e leva a necessidade de aumento de doses para obtenção do mesmo resultado, podendo resultar em prejuízo econômico ao produtor. Já do ponto de vista ecológico, é um dos maiores mecanismos para a biodegradação e detoxificação no controle de poluição. Muitos autores questionam se a adaptação microbiana responsável pela biodegradação acelerada é resultado do aumento do número de microrganismos ou do aumento na atividade enzimática. A capacidade dos microrganismos crescerem usando um composto orgânico específico como fonte de carbono não significa que a inoculação do microrganismo em um ambiente natural causará a degradação do composto. A capacidade para metabolizar o composto orgânico é necessária, mas não é condição suficiente para que o organismo efetue a transformação, pois as moléculas do fungicida ou seus metabólitos podem persistir sob condições desfavoráveis para a biodegradação.

Desta forma, deve-se levar em consideração o custo/ benefício social e ambiental do uso de fungicidas, para que ocorra minimização de riscos e maximização do retorno de benefícios do uso destes compostos na agricultura, visando a qualidade do ambiente.

Referências

- AHARONSON, N.; KAFKAFI, V. Adsorption, mobility and persistence of thiabendazole and methyl-2-benzimidazolecarbamate in soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Washington, v.23, p.720. 1975.
AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in

the enhanced degradation of fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. (Ed.). *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington: American Chemical Society, 1990. p.113-127. (ACS Symposium Series, 426).

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation.** 2. ed. New York: Academic Press, 1999. 453 p.
- ALLARD, A.S.; REMBERGER, M.; NEILSON, A. H. Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.839-845, 1987.
- ANAN'-EVA, N.D.; DEMKINA, T.S.; BLAGODATSKAYA, E. V.; SUKHOPAROVA, V.P.; ABELENTSEV, V.I. A complex approach to the study of the behavior of pesticides in soil. **Pochvovedenie**, New York, v.6, p.763-769, 1997.
- ANDEF. **Associação Nacional de Defesa Vegetal.** Disponível em: www.andef.com.br/dentr/banco.html Acesso em: 9 out. 2001.
- ANVISA. Consulta Pública nº 50. 09 de junho de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 11 jun. 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[4882-2-0\].PDF](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[4882-2-0].PDF)>. Acesso em: 09 março. 2004.
- ARS. **Pesticide properties.** Disponível em: <<http://wizard.arsusda.gov/rsml/texfiles/MANCOZEB>> Acesso em nov. 2003.
- AUSTIN, D.J.; BRIGGS, G.G. A new extraction method for benomyl residues in soil and its application in movement and persistence studies. **Pesticide Science**, London, v.7, n.2, p.201-210, 1976.
- AUSTRALIA. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. **Public release summary on evaluation of the new active Trifloxystrobin in the product Flint fungicide.** Canberra, 2000.
- AYANABA, A.; VERSTRAETE, W.; ALEXANDER, M. Formation of dimethylnitrosamine, a carcinogen and mutagen, in soils treated with nitrogen compounds. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.37, p.565, 1973.
- BAILEY, A.M.; COFFEY, M.D. Biodegradation of metalaxyl in avocado soils. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n.2, p.135-137, 1985.
- BAILEY, A.M.; COFFEY, M.D. Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.32, p.562-569, 1986.
- BALASUBRAMANIAN, G.; MATHAN, K.K. Adsorption and desorption of chlorothalonil in soils. **Journal of the Indian Society of Soil Science**, New Delhi, v.44, p.321-323, 1996.
- BANERJEE, A.; PADHI, S.; ADHYA, T.K. Persistence and biodegradation of vinclozolin in tropical rice soils. **Pesticide Science**, London, v.55, p.1177-1181, 1999.
- BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J. R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. Review: The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, Chichester, v.58, p.649-662, 2002.
- BAUDE, F.J.; PEASE, H.L.; HOLT, R.F. Fate of benomyl on field soil and turf. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.22, n.3, p.413-418, 1974.
- BEIGEL, C.; BARRIUSO, E.; DI PIETRO, L. Time dependency of triticonazole fungicide sorption and consequences for diffusion in soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.26, p.1503-1510, 1997.
- BEIGEL, C.; CHARNAY, M.; BARRIUSO, E. Degradation of formulated and unformulated fungicide in soil: effect of application rate. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.525-534, 1999.
- BELANGER, A. Residues of azinphosmethyl, cypermethrin, benomyl and chlorothalonil in monarda and peppermint oil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.249, p.67-73, 1989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Agrotóxicos. "Agrofit 98": uso adequado de agrotóxicos. Brasília, 1998. CD ROM.
- BROMILOW, R.H.; EVANS, A.A.; NICHOLLS, P. H. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: I. laboratory incubations. **Pesticide Science**, London, v.55, p.1129-1134, 1999.
- BROMILOW, R.H.; EVANS, A.A.; NICHOLLS, P.H.; TODD, A.D.; BRIGGS, G.G. The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years. **Pesticide Science**, London, v.48, p.63-72, 1996.
- BURRI, R. **Photodegradation study of ¹⁴C-thiram in soil.** Bern: ROC Umweltchemie AG, 1995. Unpublished. (RCC Project 326171).
- CABRAL, S.M.J.C.S.; CABRAL, J.P.S. The primary mode-of-action of vinclozolin: are oxygen free radicals directly involved? **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.66, p.145-152, 2000.
- CARSON, R.L. **Silent spring.** Cambridge: Riverside Press, 1962.
- CAUX, P.Y.; KENT, R.A.; FAN, GT.; STEPHENSON, G.L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: a canadian perspective. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Palo Alto, v.26, n.1, p.45-93, 1996.
- COX, C. Chlorothalonil. **Journal of Pesticide Reform**, Eugene, v.17, n.4, p.14-20, 1997.
- DAVIDSE, L.C. Metabolic conversion of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate (MBC) In: *Aspergillus nidulans*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.6, p.638, 1976.

- DI. H.J.; AYLMORE, L.G.A.; KOOKANA, R.S. Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science*, New Brunswick, v.163, n.5, p.404-411, 1998.
- DONECHE, B.; SEGUIN, G.; RIBEREAU-GAYON, P. Mancozeb effect on soil microorganisms and its degradation in soil. *Soil Science*, New Brunswick, v.135, p.361, 1983.
- DOROUGH, H.W.; BALLARD, S.K. Degradation of pesticides by animals. In: MATSUMURA, F.; KRISHNA MURTI, C.R. (Ed.). *Biodegradation of pesticides*. New York: Plenum Press, 1982. p.3-20
- DOWNING, E. *Environmental fate of manebe*. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/empm/pubs/fatememo/manebe.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2003.
- DROBY, S.; COFFEY, M.D. Biodegradation process and the nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v.118, n.3, p.543-553, 1991.
- EBDC. Fungicide Assessment Team. U.S. Department of Agriculture. *Assessment of ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) fungicide uses in agriculture. I. Analysis of uses and their relationship to exposure*. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1977.
- EKELUND, F. The impact of the fungicide fenpropimorph (Corbel) on bacterivorous and fungivorous protozoa in soil. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v.36, p.233-243, 1999.
- EKELUND, F.; RONN, R.; CHRISTENSEN, S. The effect of three different pesticides on soil protozoan activity. *Pesticide Science*, London, v.42, p.71-78, 1994.
- EMANS, H.J.B.; BEEK, M.A.; LINDERS, J.B.H.J. *Evaluation system for pesticides - (ESPE) I: agricultural pesticides*. Bilthoven: National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), 1992. (Report, 679101004).
- ENDS. Industry glimpses new challenges as endocrine science advances. *The ENDS Report*, London, n.290, p.26-30, 1999.
- ETHYLENETHIOUREA. *Pure and Applied Chemistry*, London, v.49, p.675, 1977.
- EUROPEAN COMMISSION. Health & Consumer Protection Directorate-General. *Trifloxystrobin: SANCO/4339/2000-Final*. Disponível em: <<http://www.fluorideaction.org/pesticides/trifloxystrobin.eu.april.03.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2004.
- EUROPEAN COMMISSION. Health and Consumer Protection Directorate-General. *Opinion of the Scientific Committee on Plants on specific questions from the Commission concerning the evaluation of iprodione in the context of Council Directive 91/414/EEC*. Disponível em: <<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out123.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2004.
- FAY, E.F. *Dissipação do fungicida clorotalonil*. 2000, 96 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- FENPROPIIMORPH: Disponível em: <http://www.fao.org/WAINCENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/95/fenpro.pdf> Acesso em 10 de março de 2004.
- FERREIRA, C.R.R.P.T.; SILVA, J.R.; ASSUMPCÃO, R. Distribuição territorial das vendas de herbicidas no Brasil, 1991-2000. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.32, n.6, p.15-23, 2002.
- FINNERTY, W.R. The biology and genetics of genus *Rodococcus*. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.46, p.193-218, 1992.
- FISHBEIN, L. Toxicological aspects of fungicides. In: SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. (Ed.). *Antifungal compounds*. New York: Marcel Dekker, 1977. v.1, p.337-398.
- FLEECKER, J.R.; LACY, H.M. Photolysis of methyl 2-benzimidazole-carbamate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v.25, p.51-55, 1977.
- FLEECKER, J.R.; SCHULTZ, I.R.; HOUKOM, E.C. Persistence and metabolism of thiophanate-methyl in soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v.22, n.4, p.592-592, 1974.
- FRAUNHOFER INSTITUT SCHMALLENBERG. *Aerobic biodegradation in soil of the EBDC-fungicide manebe*. Hannover, 1987a. (CDPR, v.110-039). #63345.
- FRAUNHOFER INSTITUT SCHMALLENBERG. *Aerobic biodegradation of the EBDC-fungicide manebe*. Hannover, 1987b. (CDPR Volume Number 110-039). #63346.
- FUCHS, A.; de VRIES F.W. Bacterial breakdown II. Mixed cultures. *Antonie van Leeuwenhoeck. Journal of Microbiology and Serology*, Dordrecht, v.44, p.293, 1978b.
- FUCHS, A.; de VRIES F.W. Bacterial breakdown of benomyl. I-Pure cultures. *Antonie van Leeuwenhoeck. Journal of Microbiology and Serology*, Dordrecht, v.44, p.283, 1978a.
- GAJBHIYE, V.T.; AGNIHOTRI, N.P.; GUPTA, R.K.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, K.P. Persistence and safety evaluation of chlorothalonil on tomato and mustard. *Annals of Agricultural Research*, London, v.17, n.1, p.70-73, 1996.
- GAJBHIYE, V.T.; JAIN, H.K.; AGNIHOTRI, N.P. Persistence of chlorothalonil in soil, water and sediment. *Pesticides*, Bombay, v.23, p.32 J-32 L, 1989.

- GARDNER, D.S.; BRANHAM, B.E.; LICKFELDT, D. W. Effect of turfgrass on soil mobility and dissipation of cyproconazole. **Crop Science**, Madison, v.40, p.1333-1339, 2000.
- GELMINI, G.A. **Agrotóxicos: legislação básica**. Fundação Cargill, Campinas, Brasil, 1991.
- GLOTFELTY, D.E.; TAYLOR, A.W.; TURNER, B. C.; ZOLLER, W. H. Volatilization of surface-applied pesticides from fallow soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, p.634-638, 1984.
- GRAY, L.E. Xenoendocrine disruptors: laboratory studies on male reproductive effects. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.102-103, p.331-335, 1998.
- HABTE, M.; AZIZ, T.; YUEN, J.E. Residual toxicity of soil-applied chlorothalonil on mycorrhizal symbiosis in *Leucaena leucocephala*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.140, p.263-268, 1992.
- HELWEG, A. Degradation and adsorption of carbendazim and 2-aminobenzimidazole in soil. **Pesticide Science**, London, v.8, n.1, p.71-78, 1977.
- HELWEG, A. Influence of temperature, humidity and inoculation on the degradation of ¹⁴C labeled 2-aminobenzimidazole in soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.12, p.275, 1979.
- HELWEG, A. Microbial breakdown of the fungicide benomyl. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.4, p.377-378, 1972.
- HELWEG, A. Persistence of benomyl in different soil types and microbial breakdown of the fungicide in soil and agar culture. **Tidskrift for Panteavl**, Stuttgart, v.77, p.232-243, 1973.
- HINE, R.B.; JOHNSON, D.C.; WENGER, C.J. The persistency of two benzimidazole fungicides in soil and their fungistatic activity against *Phymatotrichum omnivorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.798, 1969.
- HUBER, R. Stage on the investigations on the metabolism of fenpropimorph in soil. Unpublished BASF report nº 1684, Maag. Doc. 041/0719. Ciba fenpropimorph submission to 1994 JMPM Volume 2 Section2, tab. 12, 1979.
- IARC. **Ethylenethiourea (group 3): summary of data reported and evaluation**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol79/79-18.html>>. Acesso em: 10 fev.2004.
- IPCS – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **The WHO recommended classification on pesticides by hazard and guidelines to classification 2000 – 2002**. [Genebra]: UNEP; ILO; WHO: [2002]. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class.pdf>> Acesso em 10 mar. 2004.
- JACOBSEN, O.S.; BOSSI, R. Degradation of ethylenethiourea (ETU) in oxic and anoxic sandy aquifer. **FEMS Microbiological Reviews**, New York, v.20, p.539-544, 1997.
- JAMET P.; EUDLINE, V. Assessment of the movement of triazole fungicides by soil thin-layer chromatography. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.123/124, p.459-468, 1992.
- JANKE, D.; FRITSCHE, W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.23, p.603-619, 1985.
- JOHANNENSEN, H.; NIELSEN, A.B.; HELWEG, A.; FOMSGAARD, I.S. Degradation of [¹⁴C]ethylenethiourea in surface and subsurface soil. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.191, p.271-276, 1996.
- JOHNSON, W.G.; LAVY, T.L. In-situ dissipation of benomyl, carbofuran, thiobencarb and triclopyr at three soil depths. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.23, p.556-562, 1994.
- KAARS SIJPESTEIJN, A.; DEKHUIZEN, H.M.; VONK, J.W. Biological conversion of fungicides in plants and microorganism. In: SIEGEL, M. R.; SISLER, H. D. (Ed.). **Antifungal compounds**. New York: Marcel Dekker, 1977. v.2, p.99-147.
- KAARS SIJPESTEIJN, A.; van der KERK, G.J.M. Investigations on organic fungicides. VIII. The biochemical mode of action of bisdithiocarbamates and diisothiocyanates. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.13, p.545, 1954.
- KAARS SIJPESTEIJN, A.; VONK, J.W. Decomposition of bisdithiocarbamates and metabolism by plants and microorganisms. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY**, 3., 1974. **Abstracts**.. London, 1974. Abstract 033.
- KATAYAMA, A.; ISEMURA, H.; KUWATSUKA, S. Population change and characteristics of chlorothalonil-degrading bacteria in soil. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.16, p.239-245, 1991b.
- KATAYAMA, A.; ISEMURA, H.; KUWATSUKA, S. Suppression of chlorothalonil dissipation in soil by repeated applications. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v.16, p.233-238, 1991a.
- KATAYAMA, A.; KUWATSUKA, S. Effect of pesticides on cellulose degradation in soil under upland and flooded conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Dordrecht, v.37, p.1-6, 1991c.
- KAUFMAN, D.D.; FLETCHER, C.L. Ethylenethiourea degradation in soil. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT PATHOLOGY**, 2., 1973, Minneapolis. **Proceedings**.. Minneapolis, 1973. Abstract 1018.

- KNACKMUSS, H.J. Degradation of halogenated and sulfonated hydrocarbons. In: LEISINGER, T. (Ed.). **Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds**. New York: Academic Press, 1981. p.187-212.
- KOKANA, R.S.; BASKARAN, S.; NAIDU, R. Pesticide fate and behavior in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review. **Australian Journal of Soil Research**, Victoria, v.36, p.715-764, 1998.
- KUCK, K.H.; SCHEINPFLUG. Biology of sterol-biosynthesis inhibiting fungicides. In: KATO, T.; KRÄMER, W.; KUCK, K.H.; NORRIS, D.M.; SCHEINPFLUG. (Ed.). **Chemistry of plant protection: nº 1: sterol biosynthesis, inhibitors and anti-feeding compounds**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.65-96.
- LAVIDORENTI, A. Remobilização e transporte de resíduos ligados de agrotóxicos ao solo. In: SIMPÓSIO SOBRE DINÂMICA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO SOLO: aspectos práticos e ambientais, 2002. Piracicaba. Apostila... Piracicaba: ESALQ-USP, 2002. p.70-78.
- LEVITAN, L.; MERWIN, I.; KOVACH, J. Assessing the relative environmental impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.55, p.153-168, 1995.
- LINDSTROM, M.E.; STIRLING, D.I. Methylotrophs: genetics and commercial applications. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.44, p.27-58, 1990.
- LINHARES, A.I.; GHINI, R. Resistência de fungos fitopatogênicos a fungicidas inibidores da demetilação (DMI): uma revisão. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 64p.(Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 26).
- LIU, S.Y.; ZHENG, Z.; ZHANG, R.; BOLLAG, J. M. Sorption and metabolism of metolachlor by a bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.733-740, 1989.
- LOEFFLER, R.S.T.; HAYES, A.L. Effects of sterol biosynthesis, inhibitorfungicides of *Ustilago maydis*, *Botrytis cinerea* and *Pyrenophora teres*. **Pesticide Science**, London, v.36, p.7-17, 1992.
- LYMAN, W.R.; LACOSTE, R.J. New developments in the chemistry and fate of ethylenebis(dithiocarbamate) fungicides. In: INTERNATIONAL IUPAC CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY, 3., 1974, Helsinki. **Proceedings...** Stuttgart: George Thieme Publishers, 1974. p.67-74.
- LYMAN, W.R.; LACOSTE, R.J. New developments in the chemistry and fate of ethylenebis(dithiocarbamate) fungicides. **Environmental Quality**, Washington, v.3, p.67-74, 1975.
- MA, Z.; FELTS, D.; MICHAELIDES, T.J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, London, v.77, p.66-74, 2003.
- MCGRATH, M.T. **Resistance management is essential with Strobilurin fungicides**. Ithaca: Cornell University. Department of Plant Pathology, 2002.
- MILES, C.J.; DOERGE, R. Fate of ethylenethiourea in Hawaiian soil and water. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.39, p.214-217, 1991.
- MONKIEDJE, A.; ILORI, M.O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.34, n.1, p.1-10, 2002.
- MORGENROTH, U.; MÜLLER-KALLERT, H.M. ¹⁴C-Thiram. **Degradation and metabolism in one soil incubated under aerobic conditions**. Berne: RCC Umweltchemie AG, 1995. Unpublished. (RCC Project 326182).
- MOTONAGA, K.; TAKAGI, K.; MATUMOTO, S. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.23, p.340-345, 1996.
- MOTONAGA, K.; TAKAGI, K.; MATUMOTO, S. Suppression of chlorothalonil degradation in soil after repeated application. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford, v.17, p.1469-1472, 1998.
- MUNNECKE, D.E.; MICKAIL, K.Y. Thiram persistence in soil and control of damping-off caused by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, p.969, 1967.
- MURPHY, G.I.; PERRY, J.J. Incorporation of chlorinated alkanes into fatty acids of hydrocarbon-utilizing mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.156, p.1158-1164, 1983.
- MUSUMECI, M.R.; CAINELLI, V.C.B.; RUEGG, E.F. Persistencia do fungicida carbendazim em amostras de solo do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.5, n.31, p.305-309, 1980a.
- MUSUMECI, M.R.; LORD, A.; FLORES-RWGG, E. Adsorption, leaching and persistence of carbendazim in Brazilian soils. São Paulo: Instituto Biológico, 1980b. (Report. Biological Institute. State Department of Agronomy).

- MUSUMECI, M.R.; PIMENTEL, C.P.V.; RUEGG, E. F. Degradation in vitro of metalaxyl by pure cultures of plant pathogenic fungi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, n.4, p.957-961, 1986.
- MUSUMECI, M.R.; RUEGG, E.F. Microbial degradation of metalaxyl in the soil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.9, n.3, p.583-591, 1984.
- NARESH M.; SAHARAN, G.S.; KATHPAL, T.S. Absorption and degradation of metalaxyl in mustard plant (*Brassica juncea*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.37, p.119-124, 1997.
- NASH, R.G.; BEALL JR., M.L. Fate of manebe and zineb fungicides in microagroecosystem chambers. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.28, p.332-330, 1980.
- NEILSON, A.H. **Organic chemicals: an environmental perspective**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000. 870 p.
- NETZER, D.; DISHON, I. Persistence of benomyl and thiophanate compounds in soil and various plants following soil application. **Phytoparasitica**. Bet Dagan, v.1, p.33, 1973.
- NEWSOME, W.H.; COLLINS, P. Determination of iprodione, vinclozolin and procymidone as the heptafluorobutyramides of 3,5-dichloroanaline. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, New York, v.38, p.489-494, 1990.
- OSTBY, J.; KELCE, W.R.; LAMBRIGHT, C.; WOLF, C.J.; MANN, P.; GRAY, L.E.J. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. **Toxicology and Industrial Health**, Little Rock, v.15, p.80-93, 1999.
- PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Enhanced degradation of metalaxyl in agricultural soils of São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.36, n.1, p.1-5, 2001.
- PATIL, S.G.; NICHOLLS, P.H.; CHAMBERLAIN, K.; BRIGGS, G.G.; BROMILOW, R.H. Degradation rates in soil of 1-benzyltriazoles and two triazole fungicides. **Pesticide Science**, London, v.22, p.333-342, 1988.
- PICININI, E.C. Fungicidas benzimidazóis. **RAPP: Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.357-409, 1994.
- PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, Dordrecht, v.8, p.17-29, 1995.
- PLIMMER, J.R. Chemistry of pesticides. In: KRIEGER, R.; DOULL, J.; ECOBICHON, D.; GAMMON, D.; HODGSON, E.; REITER, L.; ROSS, J. (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology - v.1, Pesticide risk characterization**. New York: Academic Press, 2002. p.95-107.
- PRIMI, P.; SURGAN, M.H.; URBAN, T. Leaching potential of turf care pesticides; a case study of Long Island golf courses. **Groundwater Monitoring and Remediation**, New York, v.14, p.129-138, 1994.
- PURSER D. **Carbendazim: behavior in water**. Harrogate: Hazelton Laboratories, 1987. (Unpublished Report No. 5220-269/12, prepared for E. I. Du Pont de Nemours and Co., Inc.).
- R&H COMPANY. **Aerobic and anaerobic soil metabolism of mancozeb**. Sacramento: Department of Pesticide Regulation, 1987a. (DPR, v.176-041 # 53694 & 53695).
- R&H COMPANY. **Soil photolysis study of mancozeb**. Sacramento: Department of Pesticide Regulation, 1987b. (DPR, v.176-039 # 53692).
- RAGHU, K.; MURTHY, N.B.K.; KUMARASAMY, R.; RAO, R.S.; SANE, P.V. Fate and persistence of thiram in plants and soil. In: **Proceedings of the Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1975. p.137-148.
- RAJAGOPAL, B.S.; BRAHMAPRAKASH, G.P.; REDDY, B.R.; SINGH, U.D.; SETHUNATHAN, N. Effect and persistence of selected carbamate pesticides in soil. **Residue Reviews**, New York, v.93, p.6-19, 1984.
- RAYNAL, G.; FERRARI, F. Remenence et action sur la microflore fongique du bénomyl utilisé en incorporation à un sol. **Phytatrie - Phytopharmacie**, Paris, v.22, p.259, 1973.
- REDUKER, S.; UCHRIN, C.G.; WINNETT, G. Characteristics of the sorption of chlorothalonil and azinphosmethyl to a soil from a comercial cranberry bog. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v.41, p.633, 1988.
- REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L.; LAVORENTI, A.; PACOVSKY, R.S. Transformation pathways of ¹⁴C-chlorothalonil in tropical soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.40, p.295-302, 2001.
- ROUCHAUD, J.P.; DECALLONE, J. R.; MEYER, J.A. Metabolic fate of methyl-2-benzimidazolecarbamate in melon plants. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, n.12, p.1513-1571, 1974.
- ROUCHAUD, J.P.; DECALLONE, J.R.; MEYER, J.A. Metabolism of 2-aminonobenzimidazole in melon plants. **Pesticide Science**, London, v.8, n.1, p.31-34, 1977a.
- ROUCHAUD, J.P.; LHOEST, G.J.; MERCIER, M.J.; MEYER, J.A. Metabolism of benomyl in carrot, strawberry and apple. **Pesticide Science**, London, v.8, p.23-30, 1977b.

- ROUCHAUD, J.; ROUCOURT, P.; VANACHTER, A.; BENOIT, F.; CEUSTERMANS, N. Hydrolitic biodegradation of chlorothalonil in the soil and in cabbage crops. **Toxicological and Environmental Chemistry**, London, v.17, p.59-68, 1987.
- ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **The Agrochemicals handbook - Cyproconazole**, A1032/Aug.91. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991.
- SANBOM, J.R.; FRANCIS, B.M.; METCALF, R.L. **The degradation of selected pesticides in soil**. Washington: EPA, 1977. p.573-582. (EPA 600/9-77-022).
- SATO, K.; TANAKA, K. Degradation and metabolism of a fungicide, 2,4,5,6-tetrachloroisophthanitrile (TPN) in soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.3, p.205-209, 1987.
- SCHIAVON, M.; PERRIN-GARNIER, C.; PORTAL, J.M. La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires: état et origine. **Agronomie**, Paris, v.15, p.157-170, 1995.
- SCHNOOR, J.L. Chemical fate and transport in the environment. In: SCHNOOR, J.L. (Ed.). **Fate of pesticides and chemicals in the environment**. New York: John Wiley & Sons, 1992. p.1-24.
- SETHUNATHAN, N. Microbial degradation of insecticides in flooded soil and anaerobic cultures. **Residue Reviews**, New York, v.47, p.143-165, 1973.
- SEVERN, D.J.; BALLARD, G. Risk/benefit and regulations. In: CHENG, H. H. (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.467-491. (SSSA Book Series, 2).
- SIEGEL, M.R. Benomyl-soil microbial interactions. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, p.219, 1975.
- SILVA, C.M.M.S. **Biodegradação do fungicida carbendazim**. 1996, 86 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; MELO, I.S. Degradação do fungicida carbendazim por *Phanerochaete chrysosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.496-498, 1996.
- SINHA, A.P.; AGNIHOTRI, V.P.; SINGH, K. Persistence of carbendazim in soil and its effect on rhizosphere in fungi of sugar beet seedlings. **Indian Phytopathology**, Bombay, v.3, p.21, 1980.
- SITTIG, M.M. **Handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens**. 2. ed. Park Ridge: Noyes Data Corporation, 1985.
- SLATER, J.H.; BULL, A.T.; HARDMAN, D.J. Microbial dehalogenation. **Biodegradation**, Amsterdam, v.6, p.181-189, 1995.
- SLATER, J.H.; LOVATT, D. Biodegradation and the significance of microbial communities. In: GIBSON, D.T. (Ed.). **Microbial degradation of organic compounds**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.439-485.
- SMITH, P.M.; WORTHING, C.R. Microbial degradation of soil applied fungicides. **Report. Glasshouse Crops Research Institute**, Littlehampton, v.1974, p.106, 1975.
- SOLEL, Z.; SANDLER, D.; DINOOR, A. Mobility and persistence of carbendazim and thiabendazole applied to soil via drip irrigation. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.12, p.1273-1277, 1979.
- SOLEL, Z.; SCHOOLEY, J.M.; EDGINGTON, V. Uptake e translocation of benomyl and carbendazim (methyl benzimidazol-2-yl carbamate) in the symplast. **Pesticide Science**, London, v.4, p.713, 1973.
- SOUDAMINI-MOHAPATRA, P.; AWASTHI, M.D. Degradation of metalaxyl by enrichment cultures from sandy loam soil developed under different moisture regimes. **Pesticide Research Journal**, Bangalore, v.9, n.1, p.36-40, 1997.
- SOUDAMINI-MOHAPATRA, P.; AWASTHI, M.D.; MOHAPATRA, S. Enhanced degradation of metalaxyl by enrichment cultures from different soils. **Journal of the Indian Society of Soil Science**, Madras, v.47, n.2, p.217-221, 1999.
- SOUDAMINI-MOHAPATRA; AWASTHI, M.D.; MOHAPATRA, S. Enhancement of metalaxyl degradation by synergistic interaction among bacterial and fungal isolates. **Pesticide Research Journal**, Bangalore, v.9, n.1, p.62-66, 1997.
- SPENCER, D.M.; SMITH, P.M.; WORTHING, C.R. Breakdown of benomyl by soil microorganisms. **Report. Glasshouse Crops Research Institute**, Littlehampton, v.1971, p.111, 1972.
- SPESSOTO, A.M. **Dissipação do fungicida metalaxil em solos brasileiros e caracterização genética por RAPD de isolados envolvidos no processo**. 2002, 93 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SPESSOTO, A.M.; MELO, I.S.; FERRACINI, V.L. Dissipação do fungicida metalaxil em solos brasileiros. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v.25, n.4, p.596-601, 2000.
- STEEL, C.C.; BALOCH, R.I.; MERCER, E.J.; BALDWIN, B.C. The intracellular location and physiological effects of abnormal sterols in fungi grown in the presence of morpholine and functionally related fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.33, p.101-111, 1989.

- STENERSON, J.H.B. DDT metabolism in resistant and susceptible stable flies and bacteria. *Nature*, London, v.207, p.660-661, 1965.
- STOCKMAIER, M.; KREUZIG, R.; BAHADIR, M. Investigations on the behavior of fenpropimorph and its metabolite fenpropimorphic acid in soils. *Pesticide Science*, London, v.46, p.361-367, 1996.
- SUN, T.; HASHIMOTO, T.; WADA, H.; TAKAI, Y. Effects of organic amendments on soil microbial ecosystem modified by long-term application of pesticides. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.56, p.31-36, 1985. (in Japanese).
- SUYAMA, K.; YAMAMOTO, H.; TATSUYAMA, K.; KOMADA, H. Effect of long-term application of a fungicide, chlorothalonil, on cellulose decomposition and microflora in soil under upland conditions. *Journal of Pesticide Science*, Tokyo, v.18, p.225-230, 1993.
- SZALKOWSKI, M.B.; STALLARD, D.E. Effect of pH on the hidrolysis of chlorothalonil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v.25, p.208-210, 1977.
- TAKAGI, K.; WADA, H. A long-term change in biodegradation of a fungicide chlorothalonil: (TPN) in upland soils. *Transactions of the 14th International Congress of Soil Science*. v.3, p.196-201, 1990.
- TAKAGI, K.; WADA, H.A.; YAMAZAKI, S. Effect of a long-term application of a fungicide chlorothalonil: (TPN) in upland ecosystem. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.37, p.583-590, 1991.
- TAYLOR, A.W.; SPENCER, W.F. Volatilization and vapor transport process. In: CHENG, H. H. (Ed.). *Pesticides in the soil environment*. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.213-269. (Book Series n° 2).
- THIRUP, L.; EKELUND, F.; JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C.S. Population dynamics of the fast-growing sub-populations of *Pseudomonas* and total bacteria, and their protozoan grazers, revealed by fenpropimorph treatment. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.32, p.1615-1623, 2000.
- THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; TORSVIK, V.; SPLIID, N.H.; JACOBSEN, C.S. Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.33, p.1517-1524, 2001.
- THOM, E.; OTTOW, J.C.G.; BENEKISER, G. Degradation of the fungicide difeconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. *Environmental Pollution*, Barking, v.96, p.409-414, 1997.
- THORNE, G.D.; LUDWIG, R.A. *The dithiocarbamates and related compounds*. Amsterdam: Elsevier, 1962.
- TILLMAN, R.W.; SIEGEL, M.R.; LONG, J.W. Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, New York, v.3, p.160-167, 1973.
- TOMLIN, C.D.S. *The pesticide manual: a world compendium*. 12. ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 2000. 1250 p.
- TU, C.M. Effect of fungicides, captafol and chlorothalonil, on microbial and enzymatic activities in mineral soil. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, New York, v.28, n.1, p.67-80, 1993.
- URESH, P.A.; SCHWINN, F.; STAUB, T. CGA 48988, a novel fungicide for the control of late blight downy mildew and related soil borne diseases. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE OF PESTS AND DISEASES. 9., 1977, Brighton. *Proceedings...* Brighton: BCPC, 1977. p.623-631.
- VALENTA, J.R.; DICUOLLO, C.J.; FARE, L.R.; MILLER, J.A.; PAGANO, J.F. Microbial transformation of methyl 5(6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate. *Applied Microbiology*, New York, v.28, p.995, 1974.
- van der WERF, H.M.G. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Amsterdam, v.60, p.81-96, 1996.
- VANNI, A.; GAMBERINI, R.; CALABRIA, A.; NAPPI, P. Determination and identification of metabolites of the fungicides Iprodione and procymidone in compost. *Chemosphere*, Amsterdam, v.41, p.1451-1439, 2000b.
- VANNI, A.; GAMBERINI, R.; CALABRIA, A.; PELLEGRINO, V. Determination of presence of fungicides by their common metabolito, 3,5-DCA, in compost. *Chemosphere*, Amsterdam, v.41, p.453-458, 2000a.
- VIGOUROUX, M. *Iprodione pathway map* Disponível em: <http://umbbd.ahc.unm.edu/ipd_map.html> Acesso em 10 mar. 2004.
- VINCELLI, P. Q1 (Strobilurin) fungicides: Benefits and risks. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-1-2002-0809-02, 2002. Disponível: <www.apsnet.org/education/> Acesso em: 06 mar. 2004.
- VINCENT, P.G.; SISLER, H.D. Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile. *Physiologia Plantarum*, Dordrecht, v.21, p.249-1246, 1968.
- VINGGAARD, A.M.; JOERGENSEN, E.C.; LARSEN, J.C. Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Orlando, v.155, p.150-160, 1999.

- von der MÜHLL, P.A.; PRYDE, A.; GÄTZI, M.; ETERILLI, M. Soil field dissipation, metabolism and leaching study with radioactive fenpropimorph. Unpublished Maag. Ltd. Report 204-12-173; Internal report 041/1176. Ciba fenpropimorph submission to 1994 JMPR Volume 4, tab. 24. 1980.
- VONK, J.W. Chemical decomposition of bisdithiocarbamate fungicides and their metabolism by plants and microorganisms. 1975. Thesis (Ph.D.) - University of Utrecht.
- VONK, J.W.; KAARS SIJPESTEIJN. Metabolism. In: MARSH, R. H. (Ed.). **Systemic fungicides**. London: Longman, 1977. p.160-175.
- WACKETT, L.P.; ELLIS, L.B.M. Predicting biodegradation. **Environmental Microbiology**. London, v.1, p.119-124. 1999.
- WALKER, A. Adsorption and degradation: from the laboratory to the real world. In: SYMPOSIUM ON PESTICIDE CHEMISTRY, 12., 2002. Cremona. **Proceedings...** Piacenza: Università Cattolica de Sacro Cuore, 2002.
- WALKER, A.; WELCH, S.J. Enhanced biodegradation of dicarboximide fungicides in soil. IN: RACKE, K.D.; COATS, J.R. (Ed.). **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1990. p.53-67.
- WANG, H.; PENG, G.; QI, M. Study on degradation and residues of ¹⁴C-metalaxyl in soil. **Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis**. Beijing, v.21, n.4, p.395-401, 1995.
- WECHSLER, K.; ROMBOURG, M.; BINDLER, F.; EXINGER, A.; BREUZIN, C. Pollution potential on some trizole pesticides. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, New York, v.65, p.277-288, 1996.
- WEEKS, R.E.; HEDRICK, H.G. Influence of a systemic fungicide on oxygen uptake by soil microorganisms. **Soil Science**, New Brunswick, v.119, p.280, 1971.
- WOODCOCK, D. Microbial degradation of fungicides, fumigants and nematocides. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L. (Ed.). **Pesticide microbiology**. New York: Academic Press, 1978. p.731-780.
- WOODCOCK, D. Nonbiological conversions of fungicides. In: SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. (Ed.). **Antifungal compounds**. New York: Marcel Dekker, 1977. v.2, p.209-249S.
- XU, S. **Environmental fate of ethylenethiourea**. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/empm/pubs/fatememo/etu.pdf> Acesso em: 17 set. 2003a.
- XU, S. **Environmetal fate of mancozeb**. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/empm/pubs/fatememo/mancozeb.pdf>> Acesso em: 17 set. 2003b.
- YARDEN, O.; AHARONSON, N.; KATAN, J. Accelerated microbial degradation of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate in soil and its control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.735-739, 1987.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEN-YEPHET, Y. Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, p.763-767, 1985.
- YARDEN, O.; SALOMON, R.; KATAN, J.; AHARONSON, N. Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.15-23, 1990.
- YASUDA, Y.; HASHIMOTO, S.; SOEDA, Y.; NOGUCHI, T. Metabolism of thiophanate-methyl by pathogenic fungi and antifungal activity of its metabolites. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v.39, p.49, 1973.
- ZHENG, Z.; SHU-YEN, L.; FREYER, A.J.; BOLLAG, J.M. Transformation of metalaxyl by the fungus *Syncephalastrum racemosum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.1, p.66-71, 1989.
- ZIEGLER, H.; BENET-BUCHHOLZ, J.; ETZEL, W.; GAYER, H. Trifloxystrobin - a new strobilurin fungicide with an outstanding biological activity. **Pflanzenschutz-Nachrichten**, Stuttgart, v.56, n.2, p.213-230, 2003.

18

Biodegradação de Monoterpenos

Lucia Regina Durrant



Foto: I.S. Melo

I. Introdução

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, seguido dos Estados Unidos, sendo que em 1996, o Estado de São Paulo foi responsável por mais de 80% da produção do país. O primeiro subproduto da indústria de cítricos foi o óleo de laranja e, hoje, se destaca como um dos principais produtos geradores de receitas às empresas do setor. O monoterpeno *d*-limoneno, principal componente do óleo da casca da laranja, tem aplicação em diversas indústrias, que incluem alimentação animal, fabricação de produtos químicos, aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, entre outros, sendo também utilizado como material na fabricação de resinas adesivas, solventes, garrafas plásticas. Além disso, seu uso comercial aumentou muito nos últimos anos pelo fato do *d*-limoneno ser excelente solvente industrial ou agente desengordurante, substituindo os clorofluorohidrocarbonos.

Apesar do número ilimitado de aplicações do *d*-limoneno, ele possui também ação antimicrobiana e, portanto, sua liberação para a linha de tratamento de efluentes industriais é prejudicial, uma vez que pode destruir a flora microbiana do processo.

O *d*-limoneno e os compostos resultantes de sua auto-oxidação possuem propriedades alergênicas podendo causar problemas às pessoas expostas a estes, tanto por contato direto com a pele como por inalação, quando presentes em altas concentrações nas linhas de tratamento de efluente.

O uso crescente do *d*-limoneno como matéria-prima por diversas indústrias, o consequente aumento da concentração deste composto nas estações de tratamento de efluentes (ETE) e a escassez de informação sobre a sua biodegradação geraram a necessidade de se estudar o seu destino ambiental, assim como os processos biológicos efetivos para sua degradação.

2. Óleo essencial de frutas cítricas

Os óleos essenciais, tanto de frutas cítricas como outros, consistem de uma mistura de terpenos e sesquiterpenos, compostos oxigenados e resíduos não voláteis, sendo que o termo óleo implica que estas substâncias são insolúveis em água, mas solúveis em solventes polares (MARQUES, 1997).

O óleo essencial aromático é uma camada oleosa separada durante a coleta da essência aquosa cítrica, enquanto que o óleo da casca é espremido de glândulas presentes nesta durante a extração do suco, não entrando em contato direto com ele, pois contém substâncias amargas (POTTER & HOTCHKISS, 1995). O óleo cítrico da casca é encontrado em sacos de forma oval, na porção colorida do flavedo, e age como barreira tóxica natural para entrada de microrganismos. Ele é composto,

principalmente, de *d*-limoneno (mais de 90%) e outros mono e sesquiterpenos. Entretanto, os terpenos não contribuem muito para a fragrância do óleo essencial aromático, agindo mais como carregador dos compostos aromáticos (KIMBALL, 1991).

A recuperação do óleo cítrico da casca como subproduto para uso como matéria-prima por diversas indústrias, tais como, de perfume, de cosmético, farmacêutica, de inseticidas e têxteis, previne que este seja um grave poluente ambiental (MATTHEWS & BRADDOCK, 1987). A utilização dos monoterpenos, tais como, *d*-limoneno, α -pineno, β -pineno e linalool, em larga escala industrial, na tentativa de encontrar substitutos para solventes clorados e clorofluorocarbonos, é recente (MISRA & PAVLOSTATHIS, 1997; PAVLOSTATHIS & MISRA, 1999). Todavia, o aumento do uso industrial de monoterpenos e consequente aumento das concentrações destes compostos e de outros terpenos nos efluentes das indústrias cítricas, assim como das químicas e farmacêuticas, pode causar danos aos organismos que compõem o lodo ativado das estações de tratamento de efluentes, ocasionando problemas sérios ao funcionamento geral destas indústrias (CONNOR *et al.*, 1993; KARLBERG; MAGNUSSON & NILSSON, 1994; MISRA; PAVLOSTATHIS & PERDUE, 1996; CHANG, KARLBERG & MAILBACH, 1997; MISRA & PAVLOSTATHIS, 1997; MUMTAZ *et al.*, 1998; PAVLOSTATHIS & MISRA, 1999; VILA *et al.*, 1999). No campo da ecotoxicidade, os efeitos dos compostos lipofílicos sobre os microrganismos têm recebido muita atenção, uma vez que estes organismos têm papel essencial na remoção de poluentes do meio ambiente e, portanto, a inibição na biodegradação, devido à insolubilidade em água e consequentemente menor biodisponibilidade, resulta em um aumento no período de remoção (SHIKKEMA, BONT & POOLMAN, 1995). /

2.1 Terpenos

Os terpenos constituem a maior família de produtos naturais encontrados na natureza, sendo que, mais de 30000 diferentes monoterpenos já foram identificados (WERF; KEIJZER & SCHAT, 2000). São hidrocarbonetos insaturados derivados de unidades de isopreno e encontrados na maioria das plantas superiores (IKAN, 1990; WERF, OVERKAMP & BONT, 1998; WERF, SWARTS & BONT, 1999), sendo os óleos essenciais cítricos e de madeira as fontes mais abundantes de terpenos. Na Figura 1, observa-se uma unidade de isopreno.

Os terpenos possuem fortes odores mesmo em baixas concentrações, são insolúveis em água e considerados não agressivos aos metais e à maioria dos plásticos e dos polímeros, entretanto, são materiais inflamáveis (IKAN, 1990).

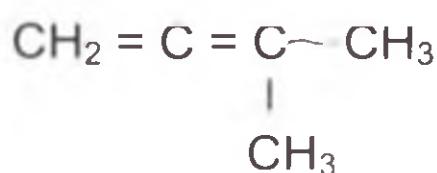


FIGURA 1. Unidade de isopreno.

De acordo com o número de unidades de isopreno ligadas, os terpenos podem ser classificados em: monoterpenos ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$), sesquiterpenos ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), diterpenos ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}$), triterpenos ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}$), tetraterpenos ($\text{C}_{40}\text{H}_{64}$) e politerpenos (C_5H_8^n) (IKAN, 1990; WERF, SWARTS & BONT, 1999).

2.2 Monoterpenos

Os monoterpenos constituem a classe mais simples de terpenos encontrados na natureza, sendo os maiores componentes dos óleos de plantas (WERF, KEIJZER & SCHAFT, 2000). São sintetizados a partir de duas unidades de isopreno através de diferentes processos. Os monoterpenos são, de preferência, produzidos por plantas que contêm ductos de resinas, sendo que a emissão destes compostos está associada à fotossíntese, uma vez que é estimulada pela luz, declina no escuro e é inibida na ausência de CO₂ no ar. As enzimas monoterpeno sintetas catalisam o passo final do difosfato geranil para vários monoterpenos e, através de diferentes processos de ciclização, ocorre a formação destes compostos (FISCHBACH *et al.*, 2000; BOON, BOON & MULDER, 2000).

Os monoterpenos são subdivididos em três grupos: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (IKAN, 1990; TRUDGILL, 1990; MISRA, PAVLOSTATIS & PERDUE, 1996; WERF, KEIJZER & SCHAFT, 2000), sendo que os monoterpenos cílicos são chamados de monoterpenóides. A Figura 2 mostra alguns monoterpenos bastante encontrados na natureza.

Tradicionalmente, os monoterpenos são muito usados como agentes flavorizantes na indústria de alimentos e de perfumes e alguns monoterpenos, que possuem valor medicinal, são usados na indústria farmacêutica. O efeito dos monoterpenóides no crescimento e atividade microbiana tem sido estudado, primariamente, para determinar o potencial destes compostos em prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos na indústria de alimentos (SHIKKEMA; BONT & POOLMAN, 1995; AMARAL *et al.*, 1998; BARNHART *et al.*, 1999; ONKEN & BERGER, 1999).

Recentemente, a biotransformação microbiana de monoterpenos em compostos de interesse comercial, tais como, α-terpinol, limoneno 1,2-diol e ácido perílico, e a degradação destes, quando presentes em efluentes industriais, tem recebido atenção. Entretanto, ainda é pequeno o conhecimento de como os monoterpenos afetam bactérias e fungos, mas sabe-se que estes compostos exercem

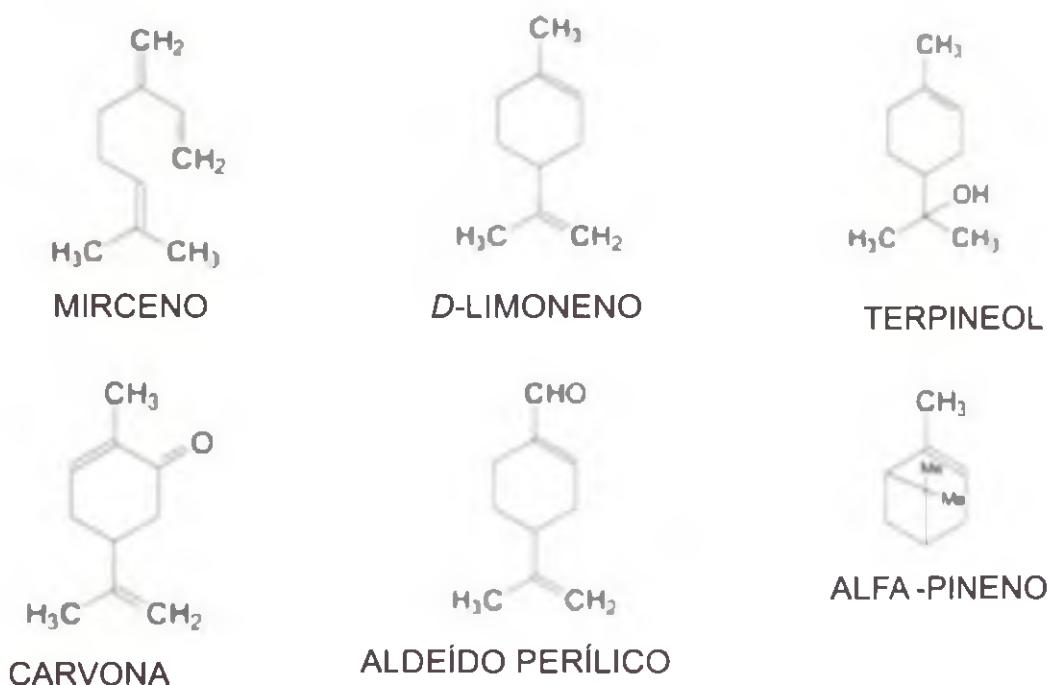


FIGURA 2. Alguns monoterpenos importantes encontrados na natureza: Mirceno (monoterpeno acílico); D-limoneno (monoterpeno hidrocarbono); Terpineol (monoterpeno álcool); Carvona (monoterpeno acetona); Aldeído perílico (monoterpeno aldeído); α-pineno (monoterpeno bicíclico).

propriedades antimicrobianas pelo rompimento da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (AMARAL *et al.*, 1998; WARD; COURTNEY & LANGEHEIM, 1998).

2.3 D-limoneno

É um monoterpeno monocíclico encontrado em frutas cítricas e especiarias, vegetais e plantas, sendo componente de mais de 300 óleos essenciais em concentrações que variam de 95% (limão, laranja) a menos de 1% (palmorosa) (TAN & DAY, 1998; WERF, KEIJZER & SCHAFT, 2000; ADAMS, DEMYTTENAERE & KIMPE, 2003). Ao lado do α -pineno, é o mais abundante terpeno na natureza (DEMYTTENAERE, BELLEGHEM & KIMPE, 2001). É um líquido insolúvel em água, de cor branca a amarelada, leve odor cítrico e bastante inflamável (BRADDOCK, TEMELLI & CADWALLADER, 1986).

A fonte primária de *d*-limoneno são os vapores da produção do suco cítrico (TAN & DAY, 1998). Estima-se que a produção anual de *d*-limoneno seja de 50000ton/ano (DUETZ *et al.*, 2001). Durante o processamento do suco, o *d*-limoneno extraído é levado para tanques de armazenamento e depois vendido para uso industrial. Quando liberado como resíduo é levado para aterros ou incinerado, dependendo das leis municipais, estaduais ou federais que controlam os aterros sanitários (MACHADO, 1997).

Durante a extração do suco ocorre a ruptura dos sacos de óleos presentes na casca e o óleo liberado é lavado, formando a emulsão óleo/água. Esta emulsão é centrifugada, separando a emulsão rica em óleo da fase aquosa. A emulsão é então destilada, obtendo-se o *d*-limoneno. A casca e a polpa são levadas para fábrica de ração e uma pequena parte de *d*-limoneno é recuperada (KIMBALL, 1991).

Existem algumas questões recentes no que diz respeito à toxicidade do *d*-limoneno. Quando liberado no meio ambiente, ele exerce efeito tóxico sobre microrganismos, insetos e plantas através da inibição da fosforilação oxidativa e mudanças da membrana celular, afetando a sua funcionalidade como barreira seletiva e como matriz enzimática (URIBE & PEÑA, 1990; SHIKKEMA, BONT & POOLMAN, 1995). Este composto é usado como inibidor do crescimento fúngico, sendo também antimicrobiano, antiviral, antilarval e repelente de insetos (MATHEWS & BRADDOCK, 1987; CHASTAIN *et al.*, 1996; The Rod Family Trust, 1997; DELORME, CRISOFULLI & WARNER, 1998; PRATES *et al.*, 1998). Segundo SANTOS *et al.* (1998), os óleos essenciais exibem propriedades tóxicas, repelentes e atrativas em numerosas espécies de insetos. Além disso, eles reduzem a fecundidade de vários insetos herbívoros. Em seu trabalho, o *d*-limoneno demonstrou grande ação inseticida, sendo tóxico ao inseto via penetração pela cutícula, sistema respiratório e aparelho digestivo.

Já existem trabalhos que demonstram que o *d*-limoneno pode causar vários danos para algumas espécies de ratos (ANDERSON & ANDERSON, 2000). Aparentemente, quando o *d*-limoneno é consumido por ratos, um de seus subprodutos (*cis-d*-limoneno-1,2-óxido) se liga à proteína alfa-2T-globulina, impedindo sua

degradação. O acúmulo desta proteína no rim provoca danos a este órgão e câncer (DIETRICH & SWENBERG, 1991; HARD & WHYSNER, 1994). Esta ação não é observada em humanos, pois estes não sintetizam a proteína alfa-2T-globulina. Em seres humanos o *d*-limoneno é convertido em 2 metabólitos (*d*-limoneno 8,9-glicol e *d*-limoneno 1,2-glicol), os quais são eliminados pelo rim.

Para humanos, o *d*-limoneno pode ser irritante para pele, olhos e membranas das mucosas do nariz e da garganta, podendo causar náuseas, vômitos, queimação abdominal, diarréia e dor de cabeça quando ingerido, além de irritar todos os tecidos, podendo também levar ao colapso circulatório (FALK, 1991, KARLBERG & DOOMSGOOSSENS, 1997; MACHADO, 1997; CHANG, KARLBERG & MAILBACH, 1997). A inalação pode causar tontura, taquicardia, dificuldades respiratórias, inconsciência e convulsão, sendo que o *d*-limoneno constitui-se em um veneno quando injetado por via intravenosa, sendo moderadamente tóxico por via intraperitoneal e menos tóxico quando ingerido (KARLBERG & DOOMSGOOSSENS, 1997; CHANG, KARLBERG & MAILBACH, 1997).¹

O *d*-limoneno é considerado geralmente seguro pelo *Food and Drug Administration* (FDA)-USA, mas trabalhadores de uma estação de tratamento de esgoto municipal em Boston - MA, nos Estados Unidos, apresentaram sintomas, como, irritação do sistema respiratório e dor de cabeça, causados por exposição a um composto, o qual foi identificado como sendo *d*-limoneno. Por isso, foi sugerido que fossem determinadas concentrações limites de descarte deste composto para proteger a integridade dos trabalhadores das linhas de tratamento de efluentes, assim como a sanidade da fauna e da flora presentes na costa marítima e nos rios ao redor de Boston (CONNOR *et al.*, 1993).

3. Degradção dos monoterpenos por microrganismos

1 O *d*-limoneno é considerado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) como sendo biodegradável, mas sua baixa solubilidade e alta volatilidade podem causar problemas quando presentes, em altas concentrações, nas Estações de Tratamento de Efluentes (CONNOR *et al.*, 1993). ↴

A degradação microbiana de monoterpenos sob condições tanto aeróbias como anaeróbias tem sido estudada (AMARAL *et al.*, 1998). O estudo da biodegradação dos monoterpenos está voltado principalmente para os processos aeróbios, mas em sistemas naturais de solo, a redução por nitrato ou outros processos anaeróbios, tais como redução de sulfato e metanogênese, também podem ser importantes (MISRA & PAVLOSTATHIS, 1997; PAVLOSTATHIS & MISRA, 1999). Em altas concentrações, a toxicidade não específica aos microrganismos pode impedir a decomposição e mineralização, podendo inibir processos, como a nitrificação de solos (WARD, COURTENEY & LANGEHEIM, 1998; PAVLOSTATHIS & MISRA, 1999). ↴

1 Vários microrganismos têm sido descritos como sendo capazes de utilizar o *d*-limoneno como única fonte de carbono e energia, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (MARS, GORISSEN & Van DEN BELD, 2001). ↴

Muitos trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos sobre biodegradação do *d*-limoneno, sendo que os primeiros dados são da década de 60 (DEMYTTNAERE, BELLEGHEM & KIMPE, 2001). Atualmente, está sendo muito estudada a bioconversão de *d*-limoneno para outros monoterpenos de valor mais elevado, uma vez que este composto é relativamente barato e facilmente encontrado na natureza (ADAMS, DEMYTTEAERE & KIMPE, 2003) como, α -terpineol, limoneno-1,2-diol, ácido perílico e carvona, utilizados como compostos de aroma em alimentos e perfumes. Existem vários estudos sobre esta bioconversão utilizando muitos tipos de microrganismos, tais como, *Penicillium digitatum*, *Cladosporium* sp., *Pseudomonas incognita*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas gladioli*, *Pleurotus sapidus*, *Xanthomonas* sp. (CADWALLADER, BRADDOCK & PARISH, 1992; BRADDOCK & CADWALLADER, 1992; CHANG & ORIEL, 1994; SPEELMANS, BIJLSMA & EGGINK, 1998; TAN & DAY, 1998; ONKEN & BERGER, 1999; WELF, KEIJZER & SCHAFT, 2000; ADAMS, DEMYTTEAERE & KIMPE, 2003). Estes microrganismos, geralmente, utilizam uma das cinco vias para bioconversão do *d*-limoneno: 1) oxidação do substituinte metil para compostos perílicos; 2) oxidação alílica para cis e trans-carveol; 3) epoxidação da dupla ligação na unidade isopropenil para α -terpineol; 4) conversão da dupla ligação do anel para o correspondente diol; 5) formação de isopiperitenol.

Entretanto, nestes processos, a formação destes monoterpenos ocorre, geralmente, em quantidades insuficientes devido à toxicidade microbiana do *d*-limoneno (ONKEN & BERGER, 1999; ADAMS, DEMYTTEAERE & KIMPE, 2003). A deficiência nos sistemas de biotransformação do *d*-limoneno em produtos de valores mais elevados, em geral, se deve à volatilidade e à toxicidade dos terpenos aos microrganismos, dado pelo aumento na fluidez da membrana e perda de sua integridade. Entretanto, processos de adaptação podem decrescer a fluidez da membrana em bactérias pelo aumento de ácidos graxos saturados na membrana fosfolipídica (SPEELMANS, BIJLSMA & EGGINK, 1998; CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001).

3.1 Degradação de monoterpenos por bactérias

Na última década, algumas linhagens bacterianas resistentes ao *d*-limoneno, foram descobertas e caracterizadas. Estas linhagens, tais como, *Pseudomonas putida*, podem adaptar suas membranas, tornando-se mais resistentes ao acúmulo de terpenóides tóxicos (SPEELMANS, BIJLSMA & EGGINK, 1998). Koh *et al.* (2003), em seu trabalho, conseguiram isolar do meio ambiente, bactérias capazes de crescer em carvona e limoneno como única fonte de carbono e energia. A maioria das bactérias era Gram-positiva, sendo que 7 linhagens eram da classe *Proteobacteria*. Em outro trabalho, *P. putida* foi capaz de converter o limoneno em ácido perílico, quando cultivada em meio de cultura contendo glicerol, amônia e limoneno (MARS, GORISSEN & Van DEN BELD, 2001). Chatterjee & Bhattacharyya (2001), utilizando 3 fungos e 15 bactérias, também observaram que *P. putida* foi capaz de oxidar o *d*-limoneno e convertê-lo em álcool perílico e p-1-mentano 6,8-diol. Entretanto, a degradação dos

produtos pela bactéria não foi observada neste trabalho. *P. aeruginosa* também foi capaz de converter 95% do *d*-limoneno presente no meio em α -terpineol e carvona em trabalho realizado por Acosta *et al.* (1996).

Outros trabalhos realizados por vários pesquisadores demonstraram a habilidade de certas bactérias, como *Pseudomonas*, em degradar totalmente o *d*-limoneno. Segundo Misra e Pavlostathis (1997), microrganismos presentes no solo são capazes de degradar prontamente monoterpenos, como α -pineno, limoneno e g-terpineno.

A degradação de α -pineno por *Pseudomonas* forma inicialmente *d*-limoneno, carveol, álcool perílico e aldeído perílico, seguida de uma clivagem do anel e formação de metabólitos ácidos que podem ser degradados por β -oxidação (COLOCOUSI, SAQIB & LEAK, 1996; SAVITHIRZ *et al.*, 1998).

Em trabalhos com outros microrganismos, a bactéria Gram-positiva, *Rhodococcus erythropolis*, foi capaz de crescer utilizando o *d*-limoneno como única fonte de carbono e energia. Este microrganismo produziu a enzima limoneno-1,2-epóxido hidrolase capaz de transformar o *d*-limoneno, pois converte o limoneno 1,2-epóxido em limoneno-1,2-diol (WERF, OVERKAMP & BONT, 1998; WERF, KEIJZER & SCHAFT, 2000).

Duetz *et al.* (2001), utilizando uma linhagem degradadora de tolueno, *Rhodococcus opacus*, demonstraram que esta bactéria foi capaz de converter o *d*-limoneno em trans-carveol, em culturas onde o tolueno foi utilizado como fonte de carbono.

3.2 Degradção de monoterpenos por fungos

Segundo Onken e Berger (1999), o *d*-limoneno é tóxico para os fungos porque aumenta a fluidez das membranas fúngicas, levando a uma permeabilidade inespecífica da membrana e a perda de sua integridade. Isto causa um decréscimo do peso seco e uma inativação do metabolismo fúngico.

Os fungos filamentosos e leveduras, tais como *Hormonema* sp., *Trichosporon* sp., *Candida parapsilosis*, *Arxula adensorivorans*, foram capazes de utilizar o *d*-limoneno produzindo como produtos da biotransformação a isopiperitenona, ácido perílico, α -terpineol e álcool perílico (Van DYK, Van RENSBURG & MOLELEKI, 1998). Estes autores estudaram a biotransformação de limoneno por fungos e leveduras e observaram que os melhores resultados foram obtidos por *Hormonema* sp., quando o *d*-limoneno era adicionado a cada 12 horas ao meio de cultura. No mesmo trabalho, os autores também observaram que após 24 horas da adição do monoterpeno houve um decréscimo das células viáveis assim como um decréscimo da formação dos produtos. Entretanto, não ficou esclarecido se a morte celular era devido à toxicidade do composto ou dos subprodutos formados. Outro fungo capaz de utilizar o *d*-limoneno produzindo o ácido perílico é o *Fusarium verticilloides* (OLIVEIRA & STRAPASSON, 2000).

O estudo de Tan e Day (1998) mostra que o fungo *P. digitatum* foi capaz de transformar o *d*-limoneno em α -terpineol, onde o O₂ acelerou esta bioconversão. Em

outro trabalho utilizando esporos de *P. digitatum*, estes foram capazes de crescer em meio contendo *d*-limoneno como única fonte de carbono e convertê-lo em α -terpineol (DEMYTTENAERE, BELLEGHEM & KIMPE, 2001). Em outra pesquisa, Adams, Demyttenaere & Kimpe (2003), utilizando linhagens de *P. digitatum* isoladas de mandarim, obtiveram a conversão de *d*-limoneno em α -terpineol.

Os estudos sobre biodegradação de monoterpenos mostram que tanto fungos como bactérias são responsáveis por transformações aeróbias destes compostos, tais como, hidroxilação na posição alílica, oxidações de álcoois e compostos carbonis, ruptura dos anéis carboxilícios e clivagens das ligações carbono-carbono (MISRA, PAVLOSTATHIS & PERDUE, 1996). Algumas destas ligações estão presentes na lignina, como ligação carbono-carbono e os fungos ligninolíticos são capazes de clivá-las. Além disso, o sistema enzimático destes fungos apresenta uma série de reações de oxidação e redução capazes de degradar compostos aromáticos (BARR & AUST, 1994; MONTIES, 1994).

Fischer *et al.* (1995) estudaram a habilidade do fungo de degradação branca *Ceriporiopsis subvermispora* de reduzir o conteúdo das resinas da madeira e este foi capaz de reduzi-las em 40%. As espécies de *Ophiostoma*, fungos comuns encontrados em árvores coníferas, não danificam estruturalmente a madeira como os fungos ligninolíticos, mas agem sobre seus componentes não estruturais como as resinas ácidas, as quais são ricas em terpenos (WANG *et al.*, 1995).

4. Fungos Ligninolíticos e seus sistemas enzimáticos

Os fungos responsáveis pela degradação da madeira podem ser divididos em 3 classes: fungos de degradação branca, fungos de degradação marrom e fungos de degradação branca, sendo a mais importante esta última, uma vez que são altamente ligninolíticos. Alguns fungos de degradação branca são: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera adusta* (HATAKKA, 1994).

O sistema ligninolítico extracelular dos fungos de degradação branca tem encontrado significantes aplicações na área biotecnológica, graças ao sistema enzimático altamente oxidativo e não específico produzido por eles (COLLINS & DOBSON, 1995). O sistema enzimático destes fungos os torna capazes de metabolizar não só a lignina e seus subprodutos (MANZANARES, FAJARDO & MARTIN, 1995), mas uma grande variedade de poluentes como compostos fenólicos e compostos policíclicos aromáticos, azocorantes, defensivos agrícolas, bifenil policlorados (PCB) e outros, podendo ser então usados no tratamento de efluentes industriais e resíduos sólidos, contribuindo para a diminuição da poluição ambiental (BABITSKAYA, 1994; ARORA, 1995; GOLOVLEVA & LEONT'EVSKII, 1998; RODRIGUEZ, PICKARD & VAZQUEZ-DUHALT, 1999; ZHANG, KNAPP & TAPLEY, 1999).[†] Além disso, estes fungos são capazes de suportar altas concentrações de poluentes tóxicos, ao contrário das bactérias (BORJA *et al.*, 1993). As principais enzimas produzidas por eles são: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase.[‡]

5. Enzimas responsáveis pela biodegradação

As enzimas microbianas são utilizadas na degradação dos poluentes (MARS, GORISSEN & Van DEN BELD, 2001). A destoxificação pode resultar na completa mineralização do poluente ou em decomposição parcial associada com a perda da atividade biológica. Muitas enzimas estão envolvidas neste mecanismo, protegendo as células das substâncias que lhes seriam tóxicas e/ou permitindo a utilização destes compostos como fonte de carbono e energia (BALAN, 2001).

No caso dos monoterpenos, ainda hoje, pouco é conhecido sobre o seu metabolismo, especialmente, sobre as enzimas envolvidas nas vias de degradação (WERF, KEIJZER & SCHAFT, 2000).

5.1 Enzimas extracelulares

São enzimas produzidas pelos microrganismos e liberadas para o meio circundante, em geral, para degradação de moléculas complexas que não podem ser transportadas para o interior da célula (TORTORA, FUNKE & CASE, 2000). Várias destas enzimas não são completamente específicas ao substrato, como é o caso das enzimas ligninolíticas que podem atuar sobre uma série de compostos tóxicos (COLLINS & DOBSON, 1995; BARR & AUST, 1994).

5.2 Enzimas intracelulares

São enzimas produzidas pelos microrganismos e que atuam no interior das células (TORTORA, FUNKE & CASE, 2000). Uma vez que os terpenos são compostos lipofílicos, eles podem difundir-se livremente através da membrana celular, podendo ser degradados por enzimas intracelulares (WERF, KEIJZER & SCHAFT, 2000).

Muitos são os estudos sobre linhagens microbianas capazes de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono e energia. Entretanto, estes trabalhos, em geral, são incompletos, não esclarecendo quais as rotas de degradação, suas enzimas e compostos intermediários (DUETZ *et al.*, 2001). Todavia, sabe-se que na degradação dos monoterpenos, as principais enzimas envolvidas são as oxigenases.

Estudando-se o efeito de 2 terpenos (limoneno e carvona) na degradação de uma mistura comercial de PCBs por *Pseudomonas stutzeri* isolada do solo contendo estes compostos, conclui-se que ambos os monoterpenos têm a capacidade de induzir dioxigenases que exercem efeito na biodegradação de PCBs, quando glicerol e xilose são usadas como fontes de carbono (TANDLICH, BREZNÁ & DERCOVÁ, 2001).

As catecôis dioxigenase catalisam a clivagem oxidativa de substratos catecôis, utilizando ferro mononuclear como cofator para catalisar a clivagem intradiol ou extradiol (BUGG, 2001). A dioxigenase responsável pela catálise extradiol, é a catecol 2,3 dioxigenase (DAGLEY, 1975), enquanto que a catálise intradiol é realizada pela catecol 1,2 dioxigenase. Esta enzima é capaz de degradar compostos altamente resistentes no meio ambiente, como os catecôis clorados. Em estudo utilizando a bactéria

Rhodococcus sp., Kim *et al.* (2002) observaram que o *d*-limoneno foi capaz de induzir a produção da enzima catecol 1,2 dioxigenase. Outro estudo demonstrou que esta enzima também pode ser produzida por *Pseudomonas* sp. (LIPTHAY *et al.*, 1999).

6. Degradção de *d*-limoneno por microrganismos - Estudo de caso

Vários microrganismos foram isolados de amostras de efluente coletadas em diferentes pontos da linha de tratamento de efluente de indústria cítrica e seus crescimentos em meio contendo *d*-limoneno foi realizado conforme mostrado nas Figuras 3 e 4. (FALCONI, F. A., 2003). A Figura 3 exemplifica o teste de avaliação do crescimento dos microrganismos em meio contendo sais minerais mais *d*-limoneno. Na Figura 3-A, observa-se o tubo controle que contém somente o meio de cultura e o

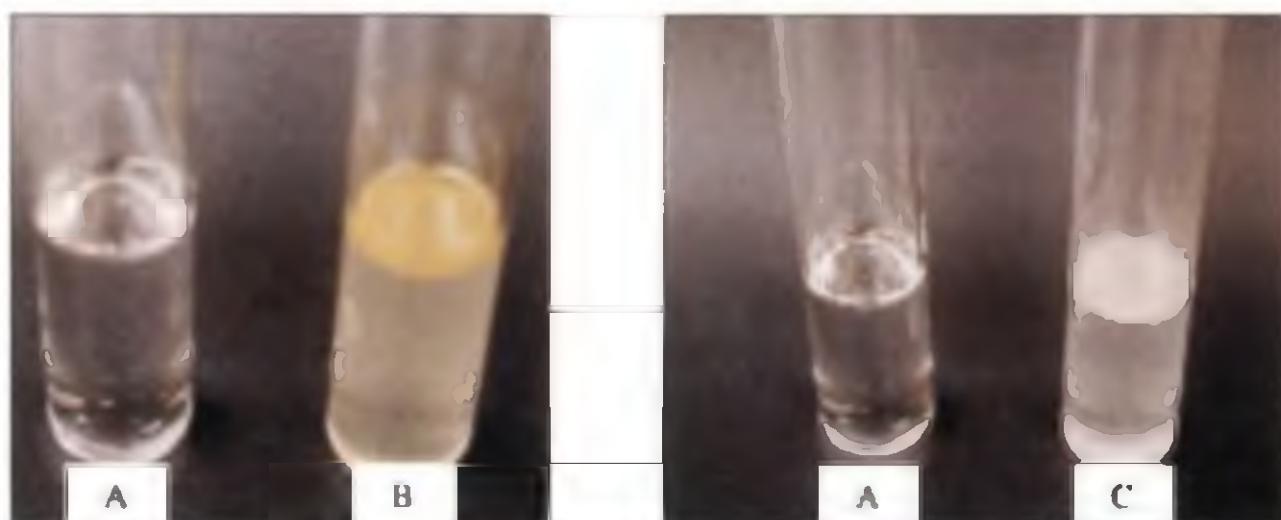


FIGURA 3. Pré-seleção de bactérias, por crescimento visual, em tubos de ensaio contendo meio de sais minerais e *d*-limoneno, na concentração 5,0% como única fonte de carbono. A = controle; B e C = crescimento de duas linhagens bacterianas.

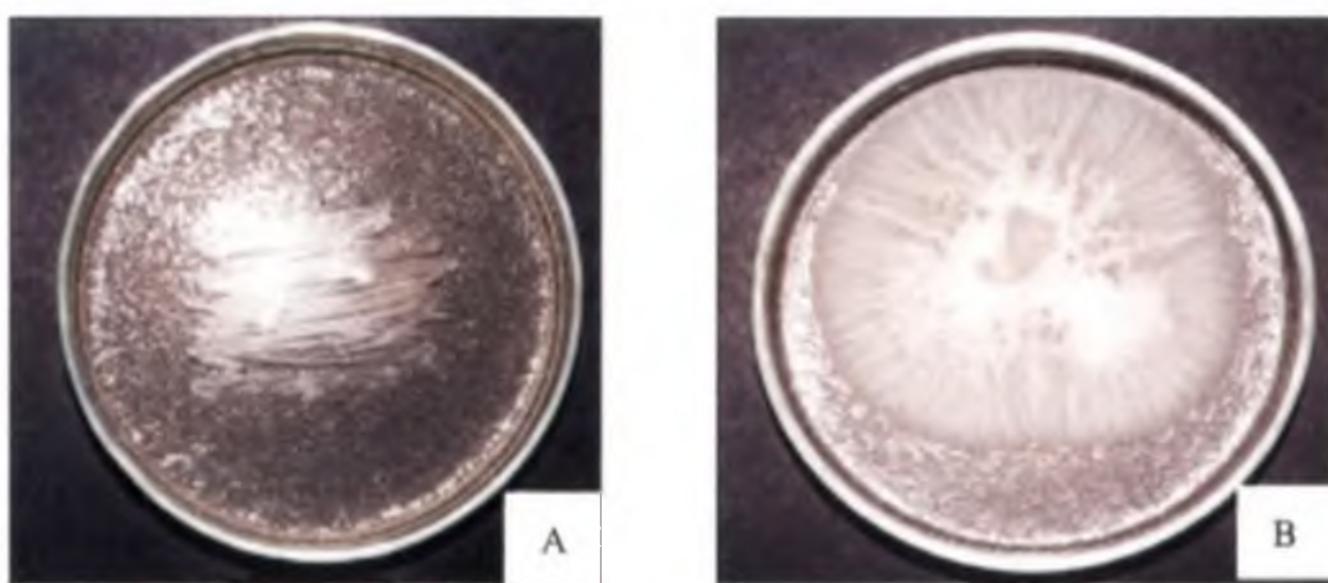


FIGURA 4. Microrganismos crescidos em placas de Petri, contendo meio de sais minerais e o *d*-limoneno como única fonte de carbono, na concentração de 5%. A = bactéria; B = fungo filamentososo.

d-limoneno na parte superior. As Figuras 3-B e 3-C mostram que o crescimento microbiano conferiu turbidez ao meio de cultura e que o *d*-limoneno foi utilizado havendo sua emulsificação.

Posteriormente, tanto fungos como bactérias foram crescidos em placas de Petri contendo meio de sais minerais e o *d*-limoneno como fonte de carbono. Alguns microrganismos apresentaram um halo transparente em volta da colônia, possivelmente formado pela degradação do *d*-limoneno. Na Figura 4, pode-se observar o crescimento de uma bactéria (4-A) e de um fungo filamentoso (4-B) e seus halos de degradação.

Com base nos melhores resultados obtidos foram escolhidos na 2^a etapa, 5 microrganismos, sendo 4 bactérias Gram-negativas (0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3) e 1 fungo (898).

O melhor crescimento apresentado pelas bactérias do que pelos fungos em meio contendo *d*-limoneno pode ter ocorrido devido à constituição da parede celular destes microrganismos. Enquanto a parede das bactérias Gram-negativas é constituída de lipopolissacarídeos, o que facilitaria a entrada do monoterpeno, pela dissolução dos lipídeos presentes, os fungos apresentam quitina em sua parede celular e o *d*-limoneno não penetra com a mesma facilidade.

6.1 Efeito da concentração de *d*-limoneno no crescimento microbiano

Os microrganismos foram testados quanto à sua capacidade de degradar diferentes concentrações de *d*-limoneno, quando crescidos em meio de sais minerais contendo o monoterpeno como principal fonte de carbono. A capacidade de degradar o monoterpeno foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e os sistemas enzimáticos por espectrofotometria.

6.2 Degradação do *d*-limoneno

A Figura 5 ilustra a porcentagem de degradação do *d*-limoneno pelas 5 linhagens selecionadas, crescidas durante 5 dias em meio contendo sais minerais e o monoterpeno como fonte de carbono, em diferentes concentrações, sob condição estacionária. Analisando-se a figura, nota-se que as linhagens 0,1D e 898 apresentaram

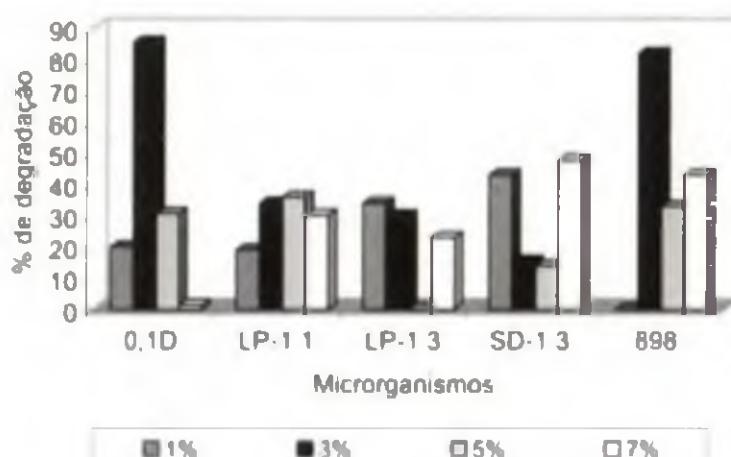


FIGURA 5. Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens selecionadas crescidas em meio de cultura contendo sais minerais e o *d*-limoneno como única fonte de carbono, em diferentes concentrações. Condição estacionária.

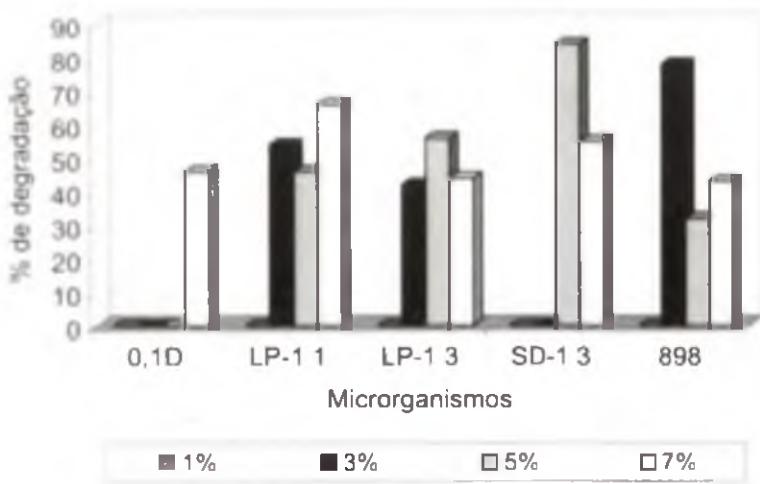


FIGURA 6. Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens selecionadas crescidas em meio de cultura contendo sais minerais e o *d*-limoneno como única fonte de carbono, em diferentes concentrações. Condição sob agitação.

de nenhuma das linhagens estudadas. As maiores porcentagens de degradação foram obtidas pela linhagem SD-1 3, quando crescida em 5% de *d*-limoneno (87%) e a linhagem 898 em 3% do monoterpeno (80%).

Comparando-se os dados obtidos na condição estacionária e sob agitação, de modo geral, verifica-se que os melhores resultados foram obtidos quando os microrganismos cresceram em meio contendo concentração de 3% de *d*-limoneno, seguida das concentrações 5 e 7% do monoterpeno. Quando utilizado 1%, as linhagens não apresentaram crescimento satisfatório em nenhuma das condições estudadas.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os de outros autores que demonstraram que muitos microrganismos são capazes de degradar e/ou transformar o *d*-limoneno, quando crescidos em meio contendo concentrações do monoterpeno, que variam de 2 a 5%. Mars, Gorissen & Van Den Beld (2001), estudando a biotransformação de *d*-limoneno para ácido perílico por *Pseudomonas* sp., observaram que a bactéria foi capaz de crescer em concentração de 2,4%, do monoterpeno, utilizando o composto como única fonte de carbono e energia. A bioconversão de *d*-limoneno por *P. putida* também foi estudada em meio de sais minerais contendo 5% do monoterpeno e observou-se que a bactéria Gram-negativa foi capaz de converter 30% do composto em ácido perílico (SPEELMANS, BIJLSMA & EGGINK, 1998). Tan & Day (1998) encontraram em seu trabalho que a conversão do *d*-limoneno para α -terpineol por *P. digitatum* aumenta com o incremento da concentração do monoterpeno, até atingir a concentração de 4%. A partir daí, não foram observadas mudanças na produção de α -terpineol.

Entretanto, outros autores, estudando a bioconversão e/ou biodegradação do *d*-limoneno não obtiveram resultados tão satisfatórios quanto estes, utilizando concentrações elevadas do monoterpeno. Em um trabalho com *Pseudomonas aeruginosa*, Chatterjee & Bhattacharyya (2001) estudaram o efeito da concentração do *d*-limoneno sobre o microrganismo e observaram que a máxima conversão do

as maiores porcentagens de degradação do *d*-limoneno, quando crescidas na concentração de 3% do monoterpeno, com valores iguais a 85 e 82%, respectivamente. As menores porcentagens de degradação foram atribuídas à bactéria LP-1 3, na concentração de 5% (0%) e ao fungo 898, na concentração 1% (0%).

Analizando-se a Figura 6, que mostra a porcentagem de degradação do *d*-limoneno, na condição agitada, observa-se que os melhores resultados foram obtidos quando os microrganismos foram crescidos em concentrações mais altas do monoterpeno. Na concentração 1%, não foi observado o crescimento

monoterpeno para álcool períflico foi obtida a 0,2%. Utilizando-se concentração de *d*-limoneno de 0,5%, o rendimento do produto diminuiu. Acosta *et al.* (1996) observaram a presença de α -terpineol e carvona em meio de cultivo, quando a bactéria foi crescida em meio de sais minerais e somente 0,25% de *d*-limoneno. Mazas & Ruiz (1995) também verificaram que cepas de *P. aeruginosa* foram capazes de converter o *d*-limoneno em compostos aromáticos, quando crescidas em meio de sais minerais contendo 0,25% de *d*-limoneno, em condição estacionária.

Isto demonstra que os resultados deste estudo são satisfatórios, pois os microrganismos cresceram em altas concentrações do *d*-limoneno. Apesar da concentração máxima do *d*-limoneno em Estações de Tratamento de Efluente (ETE) de indústria cítrica ser de 0,005% (KIMBAL, 1991), é comum ocorrerem problemas na linha de processamento do suco de laranja, aumentando consideravelmente a concentração do monoterpeno no lodo ativado. O aumento da concentração pode acarretar problemas no funcionamento geral da indústria, uma vez que o *d*-limoneno pode eliminar os microrganismos responsáveis pelo processo de biodegradação nas ETEs. Por isso, microrganismos capazes de crescer em altas concentrações de *d*-limoneno (como os encontrados neste estudo) e degradá-los e/ou convertê-los para compostos menos tóxicos, são muito importantes na solução de problemas para indústria de suco de laranja.

6.3 Atividades enzimáticas

Foram analisadas as atividades de enzimas extracelulares (Lacase, Peroxidase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) e intracelulares (Catecol 1,2 dioxigenase, Catecol 2,3 dioxigenase e Protocatecol 3,4 dioxigenase). As enzimas intracelulares foram determinadas somente para as bactérias, uma vez que não existem trabalhos que indiquem a produção destas enzimas por fungos. Da mesma maneira, as enzimas extracelulares LiP e MnP só foram determinadas para o fungo 898, uma vez que são mais verificadas em fungos do que em bactérias.

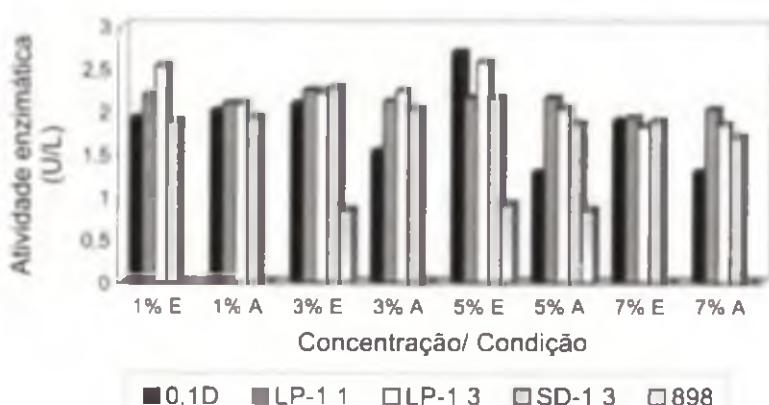


FIGURA 7. Atividade da enzima lacase pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em diferentes concentrações de *d*-limoneno. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos para atividade de lacase para os 5 microrganismos estudados, nas condições estacionária e agitada. Pela figura, verifica-se que a produção de lacase foi semelhante para todas bactérias em todas as concentrações estudadas, nas duas condições de cultivo, com a maioria dos valores entre 2,0 e 2,5 U/L. Porém, a máxima atividade enzimática foi produzida pela linhagem 0,1D (2,7 U/L), seguida da linhagem LP-1 3 (2,6 U/L), ambas na concentração 5% e LP-1 3 (2,5 U/L), na concentração 1%, quando crescidas sob condição

estacionária. As menores atividades de lacase foram produzidas pelo fungo 898 em todas concentrações estudadas.

Ao contrário da enzima lacase, a peroxidase não foi produzida de maneira semelhante por todas as linhagens. As maiores atividades enzimáticas foram produzidas pelas linhagens LP-1 1, na concentração de 5% em condição estacionária (3,4 U/L); SD-1 3, em 7% de fonte de carbono sob condição estacionária (3,2 U/L) e 0,1D, crescida em 3% de *d*-limoneno sob condição estacionária (3,0 U/L) e 5% sob agitação (3,0 U/L). As menores atividades de lacase foram observadas nos sobrenadantes, quando utilizada a concentração de 1% de *d*-limoneno nas duas condições avaliadas, com valores em torno de 1,5 U/L. O fungo 898 também produziu pouca atividade de peroxidase, como a de lacase.

A Figura 8 mostra os resultados de atividade das enzimas LiP e MnP pelo fungo 898. Observa-se que a produção da enzima LiP foi muito baixa nas diferentes concentrações de *d*-limoneno usadas como fonte de carbono. A maior atividade da enzima MnP (1,9 U/L) foi detectada quando o fungo foi crescido em 3% do monoterpeno, na condição estacionária. Atividade de MnP não foi produzida pelo fungo nas concentrações de 3 e 5% de *d*-limoneno, sob agitação.

Não existem trabalhos que demonstrem que as enzimas ligninolíticas estão envolvidas na degradação do *d*-limoneno, mas elas são responsáveis pela degradação de muitos outros compostos tóxicos encontrados no meio ambiente como fenol, ácido tântico, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dioxinas, furanos, entre outros (GOLOVLEVA & LEON'EVSKII, 1998; RODRIGUEZ, PICKARD & VAZQUEZ-DUHALT, 1999; ZHANG, KNAPP & TAPLEY, 1999). Pelos resultados obtidos pode-se observar que os microrganismos estudados aqui foram aptos a produzir estas enzimas. Sabe-se que muitos microrganismos produzem estas enzimas na presença de compostos recalcitrantes como é o caso do *d*-limoneno e que, em geral, altas concentrações destes compostos inibem o seu sistema enzimático, impedindo a degradação de xenobióticos (SAXENA, SHARMILA & SINGH, 1995). Neste estudo, altas concentrações do *d*-limoneno não impediram a produção enzimática pelos microrganismos, principalmente, das enzimas lacase e peroxidase.

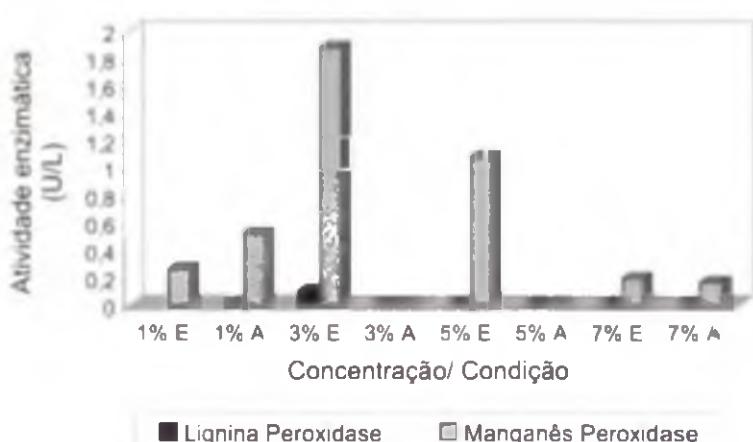


FIGURA 8. Atividade das enzimas lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) pelo fungo 898, quando crescido em diferentes concentrações de *d*-limoneno. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

As maiores atividades da enzima intracelular Catecol 1,2 dioxygenase foram produzidas pela linhagem LP-1 3 (0,05 U/L), na concentração de 7% sob agitação; LP-1 1 (0,045 U/L), em 1% estacionária; SD-1 3 (0,045 U/L), em 3% sob agitação e 0,1D (0,045 U/L), em 5% estacionária. Não foi detectada atividade desta enzima por nenhuma linhagem estudada, quando estas foram crescidas na concentração de 3% de *d*-limoneno, sob condição estacionária.

Apesar de ser conhecido muito pouco sobre a degradação e/ou

conversão do *d*-limoneno por dioxigenases, sabe-se que a catecol 1,2-dioxigenase e a catecol 2,3-dioxigenase são enzimas chaves no catabolismo de compostos aromáticos monocíclicos (MURAKAMI *et al.*, 1998) e, portanto, podem estar envolvidas na degradação do *d*-limoneno. Kim *et al.* (2002), em seu trabalho, utilizaram o *d*-limoneno para induzir a produção de catecol 1,2-dioxigenase para a degradação de outro composto tóxico, o bifenil. Apesar da enzima não ter sido utilizada na degradação do monoterpeno, os valores de atividade da catecol 1,2-dioxigenase encontradas neste trabalho, indicam que a enzima pode estar envolvida na degradação do *d*-limoneno. Além disso, outros estudos mostram que esta enzima e outras catecol dioxigenases podem degradar e/ou transformar vários compostos tóxicos, como fenol, 3,4-dicloroanilina, anilina e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (MURAKAMI *et al.*, 1998; LIPTHAY *et al.*, 1999; LEBLOND *et al.*, 2000; TRAVKIN *et al.*, 2003).

Entretanto, a ausência de algumas enzimas no sobrenadante das culturas, tanto extracelulares como intracelulares, não indica a falta de capacidade de produzi-las, pois diferentes fatores interferem na produção de enzimas, tais como, pH, temperatura, nutrientes entre outros (SPARRAT *et al.*, 2000). Além disso, a ausência de uma dessas enzimas, não significa, necessariamente, que o composto não será degradado, pois outras enzimas podem estar participando do seu processo degradativo.

Os dados obtidos da porcentagem de degradação e atividades enzimáticas sugerem que os microrganismos apresentaram melhores atividades quando o *d*-limoneno foi adicionado nas concentrações 3 e 5% como principal fonte de carbono, sendo, portanto, essas concentrações utilizadas na fase seguinte do trabalho.

6.4 Relação entre o tempo de crescimento e a degradação de *d*-limoneno pelos microrganismos

Os microrganismos foram testados quanto à sua capacidade de degradar o *d*-limoneno, quando crescidos em meio de sais minerais contendo o monoterpeno como fonte de carbono, por 1, 3, 5 e 7 dias, nas concentrações de 3 e 5%. Nesta etapa, a capacidade de utilização do monoterpeno também foi avaliada por CLAE e determinações enzimáticas.

6.5 Degradção do *d*-limoneno

Quando os microrganismos foram crescidos em meio contendo 3% de *d*-limoneno (Figura 9), nota-se que os melhores resultados foram obtidos para o fungo 898, quando crescido por 1, 3 e 5 dias, na condição estacionária e as bactérias LP-1 1, com 3 dias de crescimento estacionário e com 5 dias sob agitação e 0,1D, com 1 e 3 dias de crescimento sob agitação. Com 1 dia de crescimento, na condição estacionária, somente o fungo 898 degradou o *d*-limoneno. Com 7 dias de crescimento, nenhuma das linhagens foi capaz de degradar o monoterpeno, quando cultivados sem agitação.

A Figura 10 apresenta os resultados de degradação (%) do monoterpeno, quando os microrganismos foram crescidos utilizando-se as concentrações de 3% sob as condições estacionária e com agitação durante 1, 3, 5 e 7 dias. As melhores porcentagens de degradação do monoterpeno foram obtidas pelas linhagens 898 (82%), com 1 dia de crescimento estacionário e SD-1 3 (82%), com 5 dias de crescimento, sob agitação. Com 7 dias de crescimento somente a linhagem 898 foi capaz de degradar o monoterpeno.

Comparando-se os resultados ilustrados nas Figuras 9 e 10, observa-se que os microrganismos, em geral, degradaram maiores porcentagens de *d*-limoneno quando crescidos em meio contendo 3% do monoterpeno. Entretanto, com 1 dia de crescimento os melhores resultados foram obtidos na concentração de 5% de *d*-limoneno. Observou-se também que porcentagens de degradação ocorreram com 3 e 5 dias de crescimento, sendo os menores valores encontrados com 7 dias, provavelmente porque o composto tornou-se tóxico aos microrganismos.

Trabalhos realizados por vários pesquisadores estão de acordo com os resultados apresentados aqui, onde, geralmente, a formação dos produtos ocorreu na primeira semana do experimento. Adams, Demyttenaere & Kimpe (2003) estudaram a biotransformação do *d*-limoneno para α -terpineol por *P. digitatum*, realizada em culturas líquidas por 8 dias e após 5 dias observaram a formação do produto. Em estudo utilizando a bactéria *P. putida*, Chatterjee & Bhattacharyya (2001) analisaram os produtos de bioconversão de 0,2% de *d*-limoneno, em meio de cultura, após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de cultivo. Os autores observaram que os produtos de bioconversão aumentaram de maneira significante entre 24 e 48 horas, sendo que após 120 horas, as concentrações dos produtos permaneceram inalteradas. Pavlostathis & Misra (1999), estudando a biotransformação de 5 monoterpenos (arbanol, linalool, α -pineno, plinol e α -terpineol), observaram que após 8 dias de incubação, as concentrações dos monoterpenos decresceram muito, mas permaneceram estáveis até o final do

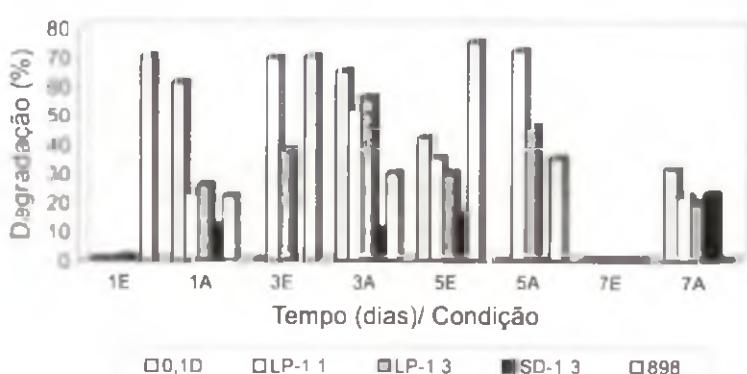


FIGURA 9. Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio de cultivo contendo o monoterpeno como única fonte de carbono, na concentração de 3%. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

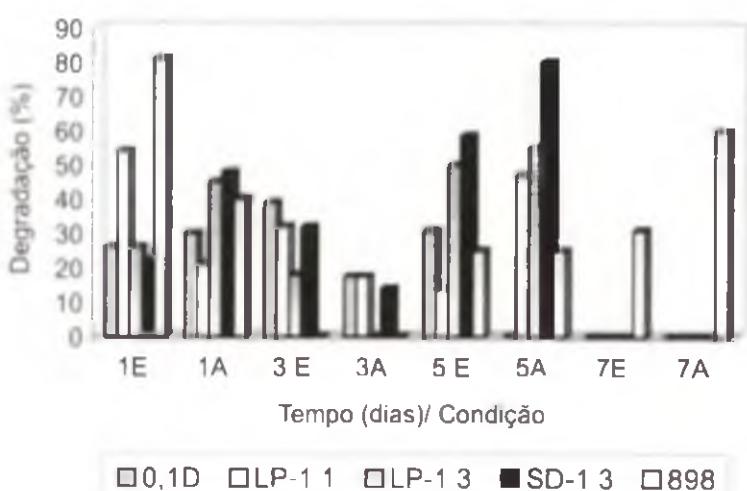


FIGURA 10. Degradação do *d*-limoneno (%) pelas linhagens 0,1D; LP-1 1; LP-1 3; SD-1 3 e 898, quando crescidas em meio de cultivo contendo o monoterpeno como única fonte de carbono, na concentração de 5%. (E) - cultivo estacionário; (A) - cultivo agitado.

período de incubação de 30 dias. Em outro trabalho com *P. putida*, observou-se que a bactéria converteu 75 a 80% do *d*-limoneno, quando crescida em meio contendo 5% do monoterpeno, em ácido perílico após 72 horas de crescimento (SPELLMANS, BILSMA & EGGINK, 1998). Misra, Pavlostathis & Perdue (1996) estudando a biodegradação aeróbica de monoterpenos por microrganismos isolados do solo, observaram que após 40 horas de incubação, os níveis de *d*-limoneno, terpineno e terpinoleno ficaram abaixo do nível de detecção, mostrando que os monoterpenos foram biotransformados ou biodegradados. Acosta *et al.* (1996), trabalhando com *P. aeruginosa* crescida em meio de sais minerais e 0,25% de *d*-limoneno por 21 dias, observaram que nas primeiras 24 horas ocorreu redução de 42% do monoterpeno e após o nono dia a concentração do *d*-limoneno se manteve constante até o final do experimento. Em ensaios em nosso laboratório os microrganismos apresentaram bons resultados, pois foram capazes de degradar as concentrações de *d*-limoneno estudadas em poucos dias. Isto é importante, porque quanto mais rápido ocorrer a biodegradação do *d*-limoneno no lodo ativado, menos problemas ele acarretará às ETEs.

6.6 Efeito da toxicidade do *d*-limoneno sobre os microrganismos estudados

6.6.1 Determinação do crescimento fúngico

O estudo da toxicidade do *d*-limoneno sobre o fungo 898 foi realizado através da determinação da massa seca, uma vez que, quanto mais tóxico for o composto para o microrganismo, menor será seu crescimento e, consequentemente, sua massa seca. Segundo alguns autores, o *d*-limoneno aumenta a fluidez da membrana fúngica, o qual leva à alta inespecificidade da membrana, aumentando sua permeabilidade, perda da sua integridade e, assim, decréscimo da massa seca (CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001; ONKEN & BERGER, 1999).

A Figura 11 mostra os resultados de massa seca obtidos quando o fungo 898 foi cultivado em meio de sais minerais contendo o *d*-limoneno nas concentrações 1, 3, 5 e 7%, nas condições estacionária e com agitação. A maior (4 mg) e a menor (5 mg) quantidade de massa seca, ou seja, o maior e o menor crescimento, foram observados quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo 1% do monoterpeno, nas condições estacionárias e sob agitação, respectivamente. Nas demais concentrações de *d*-limoneno, o valor de massa seca variou entre 15 e 25 mg, mostrando que o composto pode ser tóxico ao microrganismo. Tan e Day (1998) observaram que a conversão do *d*-limoneno para α -terpineol por *Penicillium digitatum* aumenta com o aumento da concentração do monoterpeno, até atingir a concentração de 4%. A partir daí, não foram observadas mudanças na produção de α -terpineol, mostrando que o composto tornou-se tóxico ao microrganismo. Estes dados assemelham-se aos encontrados neste trabalho.

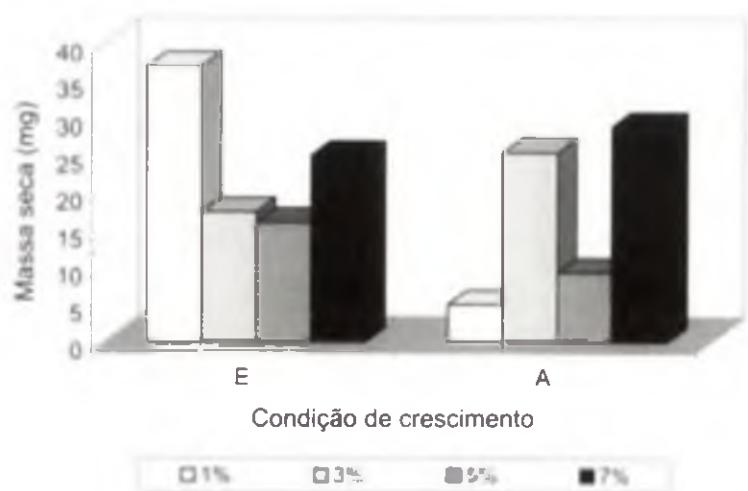


FIGURA 11. Massa seca produzida pelo fungo 898, quando cultivado em meio contendo sais minerais e o *d*-limoneno como fonte de carbono. (E) = cultivo estacionário; (A) = cultivo agitado.

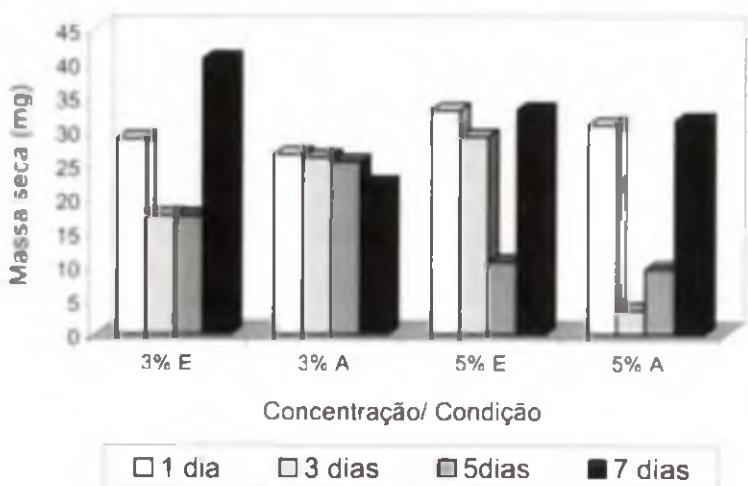


FIGURA 12. Massa seca produzida pelo fungo 898, quando cultivado em meio de cultura contendo sais minerais e 3 e 5% de *d*-limoneno como fonte de carbono. (E) = cultivo estacionário; (A) = cultivo agitado.

pode diminuir o dano destes compostos às suas membranas e estes podem crescer mesmo em altas concentrações do solvente.

De acordo com Demyttenaere, Belleghem & Kimpe (2001), que estudaram a biotransformação do *d*-limoneno por vários fungos, os diferentes gêneros não apresentam a mesma velocidade de crescimento. A conversão do *d*-limoneno para α -terpineol por *Penicillium digitatum* ocorreu na primeira parte do experimento, ou seja, após 24 horas. Já para *Corynespora cassiicola* a bioconversão foi lenta, sendo que o melhor rendimento foi obtido no final do experimento, após 5 dias de incubação. Onken & Berger (1999), trabalhando com cultura de *Pleurotus sapidus*, observaram que após adição do *d*-limoneno ocorria um rápido decréscimo da massa seca, indicando progressivo dano na membrana fúngica. Neste mesmo trabalho, os autores observaram que apesar da diminuição do peso seco, os fungos ainda possuíam atividade de biotransformação por aproximadamente 4 dias. Van Dyk, Van Rensburg & Moleleki

A Figura 12 mostra os valores de massa seca obtidos para fungo 898, quando crescido por 1, 3, 5 e 7 dias, em meio contendo sais minerais com 3 e 5% de *d*-limoneno, sob condição estacionária e com agitação. Observa-se que os maiores valores de massa seca foram obtidos quando o microrganismo foi cultivado por 7 dias, com exceção da concentração de 3%, com agitação. Nesta concentração, o microrganismo cresceu igualmente em todos os dias, apresentando os valores de massa seca em torno de 25 mg.

Observa-se também, nas Figuras 11 e 12, que, de modo geral, no 7º dia de cultivo, o fungo 898 apresentou um rápido crescimento, mostrando que o *d*-limoneno tornou-se menos tóxico ao microrganismo com o aumento do período de incubação. Provavelmente, isto ocorreu devido à degradação e/ou conversão do *d*-limoneno em compostos menos tóxicos nos primeiros dias de cultivo, possibilitando o crescimento do microrganismo. Durante o experimento, também pode ter ocorrido a adaptação do microrganismo ao *d*-limoneno. Segundo Onken & Berger (1999), a adaptação dos microrganismos a solventes tóxicos, como o *d*-limoneno,

(1998), trabalhando com vários fungos filamentosos, observaram que após 24 horas houve um decréscimo das células viáveis, assim como um decréscimo da formação dos produtos, quando os microrganismos foram crescidos em meio contendo *d*-limoneno.

6.6.2 Determinação do crescimento bacteriano

O *d*-limoneno é tóxico para muitas bactérias, mesmo em baixas concentrações, sendo que em altas concentrações a toxicidade não específica aos microrganismos pode impedir a decomposição e a mineralização do monoterpeno (PAVLOSTATIS & MISRA, 1999). Por isso, torna-se importante um estudo sobre a influência da concentração do monoterpeno sobre o crescimento dos microrganismos em estudo (CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001). A toxicidade do *d*-limoneno às bactérias foi testada na ausência do monoterpeno e variando-se sua concentração de 1% a 10%, por um período de 10 dias. O crescimento das bactérias foi observado pelo aumento da turbidez do meio de cultura, sendo maior quanto menos tóxico for o *d*-limoneno para os microrganismos.

A bactéria 0,1D cresceu melhor quando incubado por um período mais longo (10 dias), sendo que o valor de absorbância foi praticamente o mesmo no 8º, 9º e 10º dias de crescimento. O crescimento do microrganismo aumentou conforme aumento da concentração de *d*-limoneno até 3%, sendo que a partir desta concentração, o crescimento microbiano começou a declinar. O crescimento da bactéria LP-1 1 em meio contendo diferentes concentrações de *d*-limoneno foi inferior ao da 0,1D no mesmo meio. Seu comportamento foi semelhante em todas as concentrações e dias de crescimento, sendo que esta cresceu pouco durante o tempo do experimento. Observou-se também que o melhor crescimento do microrganismo ocorreu na ausência de *d*-limoneno, ou seja, quando o composto ainda não tinha sido adicionado ao meio de cultura. O maior crescimento, em meio contendo o monoterpeno, foi obtido quando a linhagem foi crescida em 2 e 3% do *d*-limoneno com 1 dia de cultivo. Os resultados demonstraram que o *d*-limoneno produziu maior toxicidade à bactéria LP-1 1, a qual apresentou baixos valores de absorbância (crescimento) em relação a 0,1D. Mesmo aumentando o tempo de incubação não houve aumento no crescimento desta linhagem. Este fato deve-se provavelmente ao fato do microrganismo ser incapaz de metabolizar o *d*-limoneno ou de se adaptar à presença do composto. /

O maior crescimento da linhagem LP-1 3 ocorreu nas concentrações de 2 e 3% do monoterpeno, sendo que o crescimento aumentou com o tempo de incubação. A partir de 3%, o crescimento foi pequeno e, praticamente, não se alterou durante o período, nas concentrações estudadas.

A linhagem SD-1 3 apresentou o melhor crescimento nas concentrações 1, 2 e 3% de *d*-limoneno, que aumentou no decorrer do tempo de cultivo, sendo maior com 10 dias de incubação. Nas demais concentrações o crescimento foi baixo durante os 10 dias de incubação. Observou-se também que o crescimento do microrganismo aumenta com o período de incubação, sendo que o crescimento máximo ocorreu com 10 dias em todas concentrações utilizadas.

Comparando-se o efeito da toxicidade do *d*-limoneno refletido no crescimento das 4 bactérias estudadas (0,1D; LP-1 1; LP-1 3 e SD-1 3), observou-se que a linhagem que apresentou maior crescimento foi a 0,1D, com medida máxima de absorbância igual a 1,9, seguida pelas linhagens LP-1 3; SD-1 3 e LP-1 1. Esta última apresentou crescimento muito baixo em todas as concentrações e dias estudados.

Verificou-se que os microrganismos apresentaram crescimento máximo quando foram adicionados ao meio 2 ou 3% de *d*-limoneno. Este estudo concorda com o apresentado por Mars, Gorissen & Van Den Beld (2001), que utilizando a bactéria *Pseudomonas*, mostraram que o microrganismo foi capaz de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono, quando crescido em meio de cultura contendo 2,4% do monoterpeno. Entretanto, não estão de acordo com o trabalho de Spelmans, Bijlsma & Eggink (1998) que utilizaram concentrações mais altas de *d*-limoneno (5%) para crescimento de *Pseudomonas putida*, nem com os trabalhos de Acosta *et al.* (1996) e Mazas & Ruiz (1995) que utilizaram concentrações menores (0,25%) para estudo de degradação por *P. aeruginosa*.

Observou-se também, através deste experimento, que a medida de absorbância aumentou, indicando o crescimento do microrganismo, com o seu período de incubação, com exceção da linhagem LP-1 1, que apresentou crescimento semelhante em todo tempo de cultivo. Segundo Chatterjee & Bhattacharyya (2001), que estudaram a degradação do *d*-limoneno por *P. putida*, o crescimento do microrganismo e o consumo do monoterpeno aumenta com o período de incubação, observado pelo aumento da massa seca. Entretanto, os autores observaram que o consumo do *d*-limoneno pelo microrganismo permaneceu o mesmo após 5 dias de cultivo, enquanto o crescimento das células aumentou até o 7º dia de crescimento. Segundo os autores, o crescimento do microrganismo e, portanto, o aumento da massa seca, pode ter ocorrido devido ao consumo de outros nutrientes do meio e não do monoterpeno.

A partir dos resultados apresentados (medida da atividade enzimática, porcentagem de degradação por CLAE e avaliação da toxicidade do composto às linhagens selecionadas), tanto da avaliação do tempo de crescimento, quanto do efeito da concentração do monoterpeno, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos quando os microrganismos foram crescidos por 3 e 5 dias, na concentração de 3% de *d*-limoneno, sob condição estacionária. Os microrganismos que apresentaram as melhores taxas de crescimento foram 0,1D, LP-1 3 e 898. Estes microrganismos foram identificados e utilizados em estudo de degradação de *d*-limoneno em efluente industrial.

6.7 Identificação dos microrganismos isolados do efluente industrial

As duas bactérias 0,1D e LP-1 3 são bacilos Gram-negativos e foram identificadas através de microscopia óptica e testes bioquímicos. De acordo com os resultados obtidos nos testes bioquímicos, a linhagem 0,1D pode ser caracterizada como sendo do gênero *Pseudomonas* sp. e a linhagem LP-1 3, *Enterobacter* sp. O gênero *Pseudomonas* é muito comum em solo e outros ambientes naturais

(TORTORA, FUNKE & CASE, 2000). Estas bactérias são capazes de sintetizar um grande número de enzimas diferentes e provavelmente contribuem significativamente para a decomposição de substâncias químicas, tais como, pesticidas, PCBs e petróleo (TANDLICH, BREZNÁ & DERCOVÁ, 2001; TORTORA, FUNKE & CASE, 2000). Vários são os trabalhos que demonstram que este microrganismo pode atuar na transformação do *d*-limoneno em outros compostos, como ácido perílico e á-terpineol, sendo várias as espécies de *Pseudomonas* capazes de utilizar o *d*-limoneno como fonte de carbono: *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. gladioli* (CHATTERJEE & BHATTACHARYYA, 2001; MARS, GORISSEN & Van DEN BELD, 2001; SPEELMANS, BIJLSMA & EGGINK, 1998; SAVITHIRZ *et al.*, 1998; ACOSTA *et al.*, 1996). Além disso, outros trabalhos demonstraram a habilidade de certas *Pseudomonas* em degradar totalmente o *d*-limoneno (MISRA & PAVLOSTATHIS, 1997; LEBLOND, APPLEGATE & MENN, 2000).

Não foi encontrado nenhum trabalho que demonstre a capacidade de *Enterobacter* sp. de degradar monoterpenos, em especial, o *d*-limoneno. Entretanto, o trabalho de Heerden *et al.* (2002) mostrou que este microrganismo pode estar presente no efluente da indústria cítrica. Além disso, *Enterobacter* sp. pertence a família *Enterobacteriaceae* e apesar de não comprovada sua capacidade de degradar o *d*-limoneno, sabe-se que outros membros desta família já foram capazes de metabolizar monoterpenos (DHERE & DHAVALIKAR, 1970). Wright *et al.* (1986), trabalhando com *Serratia marcescens*, uma enterobactéria, mostraram que este microrganismo foi capaz de oxidar α -pineno para α -terpineol.

O fungo foi identificado como sendo do gênero *Fusarium* sp. e pertence à coleção de microrganismos do Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Sabe-se que este microrganismo é um fungo ligninolítico, mas sua capacidade de degradar monoterpenos ainda não havia sido testada. Entretanto, este microrganismo mostrou-se capaz de degradar vários compostos tóxicos ao meio ambiente como ácido tânico, ácido lignossulfônico, fenol, HAPs (antraceno, naftaleno, pireno, benzo[a]pireno) (CLEMENTE, 1997; FALCONI, 1998; CLEMENTE, 2002). Existem trabalhos que demonstram que fungos pertencentes a este gênero são capazes de atuar sobre os monoterpenos. Em trabalho com *d*-limoneno, *Fusarium verticilloides* utilizou o monoterpeno produzindo ácido perílico (OLIVEIRA & STRAPASSON, 2000).

6.8 Estudo do crescimento microbiano no efluente industrial

Os microrganismos (0,1D; LP-1 3 e 898) foram cultivados no próprio efluente industrial de onde as linhagens foram isoladas: Calha, Água Preta, Saída do Sedimento e Lagoa de Polimento. Uma vez que o efluente industrial não apresenta o *d*-limoneno em condições operacionais normais, este foi adicionado na concentração de 3%. Foi utilizado efluente não esterilizado e previamente esterilizado para saber se os microrganismos presentes no meio influenciariam as linhagens em estudo. O tempo de incubação do experimento foi de 3 e 5 dias e a utilização do monoterpeno pelos microrganismos foi determinada pela degradação por CLAE (%).

6.9 Degradação do d-limoneno

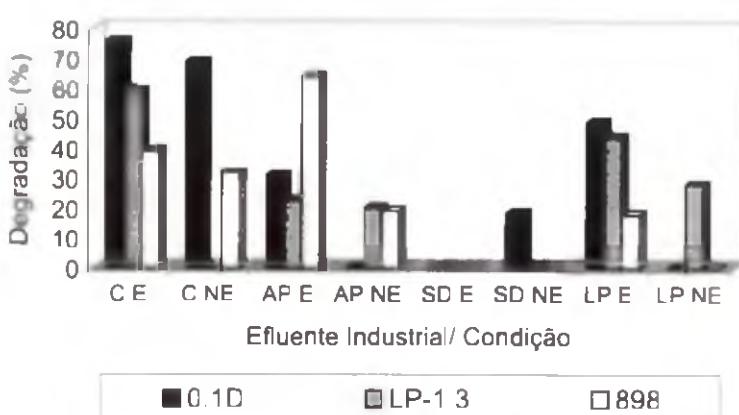


FIGURA 13. Degradação (%) do *d*-limoneno pelas linhagens 0,1D; LP-1 3 e 898, cultivadas em meio contendo o efluente industrial estéril (E) e não estéril (NE), na concentração de 3% de *d*-limoneno por 3 dias. C = Calha; AP = Água Preta; SD = Saída do Sedimento; LP = Lagoa Polimento.

Pela Figura 13 observa-se que, de modo geral, os microrganismos utilizaram maior porcentagem de *d*-limoneno como fonte de carbono, quando crescidos em efluente previamente esterilizado por 3 dias. Entretanto, no efluente coletado no ponto SD e esterilizado, nenhum dos microrganismos conseguiu degradar o monoterpeno. Os melhores resultados foram observados para a bactéria *Pseudomonas* sp. (0,1D), quando crescida no meio C estéril (75%) e não estéril (70%) e para o fungo *Fusarium* sp. (898) em meio AP estéril (68%). Quando os microrganismos foram cultivados em efluente coletado na

Calha (C) produziram uma maior porcentagem de degradação do *d*-limoneno.

Quando os microrganismos foram cultivados em efluente industrial por 5 dias, somente a bactéria *Pseudomonas* sp. (0,1D) degradou grande porcentagem de *d*-limoneno. O melhor resultado foi obtido quando a bactéria cresceu em meio contendo efluente da Lagoa de Polimento esterilizado (75%). O fungo *Fusarium* sp. (898) não foi capaz de degradar o monoterpeno em nenhum dos meios estudados. Já *Enterobacter* sp. (LP-1 3) conseguiu degradar o composto em pequena quantidade (20%) no efluente coletado da Água Preta (AP), sendo que nos demais efluentes esse microrganismo não foi capaz de degradá-lo.

Em trabalho realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA., que conduziu estudo de degradação de monoterpenos em Sistemas Municipais de Tratamento de Lodo Ativado, foi mostrado que este processo reduziu 90% do *d*-limoneno que entrou na Estação de Tratamento de Efluentes, o qual foi biodegradado para outros compostos (ALVAREZ *et al.*, 1999). Os autores explicam que as concentrações utilizadas nestes estudos (10.000 µg de *d*-limoneno por litro) são representativas de efluente municipal e em tratamento de efluente industrial, a concentração de monoterpeno encontrada pode ser muito maior. Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a degradação do *d*-limoneno em efluente industrial, entretanto, observando os dados aqui obtidos para a degradação do *d*-limoneno, verificou-se que os microrganismos foram capazes de utilizar o monoterpeno quando presente em altas concentrações no efluente de indústria cítrica.

Pode-se concluir também que, de modo geral, os microrganismos, quando cultivados no efluente industrial previamente esterilizado, foram capazes de degradar uma maior porcentagem do *d*-limoneno do que quando cultivados em efluente não estéril. Isto ocorreu, provavelmente, porque os microrganismos presentes no efluente

industrial poderiam estar competindo com aqueles adicionados, por fontes de carbono mais simples, presentes no efluente industrial. É possível que a competição por nutrientes impedi o crescimento normal dos microrganismos e, assim, a degradação do *d*-limoneno. Já no efluente estéril, isto não aconteceu porque a esterilização provocou a morte da microbiota endógena e os microrganismos, aqui estudados, utilizaram as fontes de carbono disponíveis no efluente, crescendo melhor e, assim, aumentando a degradação do monoterpeno em meio esterilizado. Já, o crescimento do microrganismo em um determinado efluente (C, AP, SD, LP) e não em outro, ocorreu devido à diferença de nutrientes presentes nestes.

6.10 Atividades enzimáticas

Foram determinadas as enzimas intracelulares (Catecol 1,2 dioxigenase; Catecol 2,3 dioxigenase Protocatecol 3,4 dioxigenase e Aldeído desidrogenase) e as enzimas extracelulares (Lacase; Peroxidase; Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase), após crescimento dos microrganismos em efluente industrial esterilizado e não esterilizado, por 3 e 5 dias. A produção da enzima foi semelhante em todos os meios utilizados, tanto estéreis, quanto não esterilizados, sendo o melhor resultado apresentado pelo *Fusarium* sp. (898), quando crescido em meio SD não estéril com valor aproximado de 2,0 U/L. 1

Quando as linhagens foram cultivadas por 5 dias, a produção de lacase também foi semelhante tanto nos efluentes esterilizados como não esterilizados, assim como nos diferentes dias de cultivo. A maior produção de lacase, com 5 dias, foi obtida pela bactéria *Pseudomonas* 0,1D em meio SD não esterilizados (2,0 U/L).

Os resultados da produção de LiP e MnP pelo fungo *Fusarium* sp. (898), quando cultivado em efluente industrial por 3 e 5 dias, mostraram uma maior produção de LiP em meio água preta estéril (AP) com 5 dias de crescimento (6,8 U/L). As maiores atividades de MnP foram produzidas pelo fungo crescido em meio AP (4,9 U/L) e LP não estéril (4,0 U/L) e SD estéril (4,0 U/L) com 3 dias de crescimento. Esta enzima não foi produzida pelo microrganismo quando este foi crescido em efluente C. Atividade de LiP não foi produzida nos meios LP estéril e SD e LP não estéril em nenhum dos dias estudados.

1 Não foram encontrados trabalhos relacionando a degradação do *d*-limoneno com a produção de enzimas ligninolíticas. Entretanto, uma vez que o sistema enzimático envolvido na despolimerização e mineralização da lignina é não específico, estas enzimas podem estar envolvidas na degradação de monoterpenos, assim como os microrganismos que as produzem. Vários trabalhos demonstram que algumas linhagens de *Fusarium* foram capazes de colonizar, modificar e degradar a lignina através da produção de lacase, LiP e MnP (REGALADO *et al.*, 1999; SPARRAT *et al.*, 2000; KWON & ANDERSON, 2002). Também já foi demonstrado que *Pseudomonas* sp. pode atuar na degradação da lignina através da produção de enzimas ligninolíticas, principalmente, lacase (UMA, KALAISELVI & SUBRAMANIAN, 1994).

Observou-se que a maior produção da enzima catecol 1,2 dioxigenase foi apresentada por *Enterobacter* sp. (LP-1 3), quando cultivada por 3 dias em efluente

SD estéril (0,34U/L). No meio C, tanto esterilizado como não esterilizado, ambos os microrganismos não conseguiram produzir esta enzima intracelular. No meio LP estéril e não estéril somente *Enterobacter* sp. (LP-1 3) produziu a enzima, tanto com 3 dias como com 5 dias de crescimento. Vários pesquisadores estudando a bactéria *Pseudomonas*, demonstraram que ela foi capaz de produzir catecol 1,2 dioxigenase para degradação de compostos tóxicos (MURAKAMI *et al.*, 1998; LIPTHAY *et al.*, 1999; LEBLOND, APPLEGATE & MENN, 2000).

As maiores atividades da enzima Catecol 2,3 dioxigenase foram produzidas pelas bactérias *Pseudomonas* sp. (0,1D) e *Enterobacter* sp. (LP-1 3), após 3 dias em meio SD não estéril e LP, respectivamente. Nos meios C e AP não esterilizados e SD esterilizados, os microrganismos não produziram a enzima em nenhum dos dias estudados.

A produção enzimática, tanto das enzimas extracelulares como intracelulares, ao contrário da porcentagem de degradação do *d*-limoneno, foi maior em meio sem prévia esterilização. Isto pode ser devido ao fato de que em meio não esterilizado a competição por nutrientes facilmente disponíveis é maior, levando os microrganismos a procurarem outras fontes de carbono e produzirem enzimas capazes de degradarem fontes de carbono menos acessíveis e, possivelmente, ativando o sistema secundário, o que explica a presença das enzimas ligninolíticas. A produção das enzimas em picos pode estar relacionada à necessidade da bactéria em ter acesso a fontes de carbono. Ao entrar em contato com o composto o microrganismo produz as enzimas necessárias para torná-lo acessível e a partir do momento em que o composto se torna disponível, as linhagens reduzem completamente a produção dessas enzimas. À medida que a fonte de carbono torna-se de difícil acesso, elas voltam a ser produzidas. /

Comparando-se os resultados apresentados no teste de toxicidade quando os microrganismos foram crescidos no meio de sais minerais e quando crescidos em efluente industrial, observa-se que o crescimento de todos microrganismos estudados foi melhor quando se utilizou o meio contendo somente sais minerais e *d*-limoneno. Este fato deve-se, provavelmente, porque o efluente industrial pode conter compostos tóxicos ao microrganismo, além do *d*-limoneno, impedindo seu crescimento.

Após a avaliação da toxicidade do monoterpeno aos microrganismos, também foi determinada a produção de biosurfactante, tanto água-óleo como óleo-água, mas os microrganismos não apresentaram resultados satisfatórios, mostrando que, provavelmente, a produção deste composto não interfere na degradação do *d*-limoneno. Uma vez que o papel dos surfactantes é permitir o crescimento dos microrganismos nos substratos imiscíveis, reduzindo a tensão superficial e tornando-os mais viáveis a degradação e ao metabolismo (FIECHTER, 1992), é provável que os microrganismos estudados aqui utilizaram outros meio para o transporte do composto para dentro da célula para sua possível degradação. Outra explicação é que, como o *d*-limoneno é um composto lipofílico, ele pode difundir-se livremente através da membrana celular (WERF, SWARTS & BONT, 1999), não sendo necessária a produção de biosurfactantes pelos microrganismos. ✓

Pelos resultados obtidos, verifica-se que os microrganismos aqui estudados podem ser utilizados, futuramente, no tratamento de efluente de indústria cítrica, pois foram capazes de degradar altas concentrações do monoterpeno, quando presente no próprio efluente.

A utilização destes microrganismos na bioconversão de *d*-limoneno para outros monoterpenos de valor mais elevado, tais como α -terpineol, limoneno-1,2-diol, ácido perílico e carvona, para serem utilizados como compostos de aroma em alimentos e perfumes também uma alternativa promissora.

Referências

- ACOSTA, M.; MAZAS, N.; MEJIAS, E.; PINO, J. Obtención de aromatizantes mediante biotransformación del limoneno por *Pseudomonas aeruginosa*. *Alimentaria*, p.73-75, mai. 1996.
- ADAMS, A.; DEMYTTE NAERE, J.C.R.; KIMPE, R.D. Biotransformation o (R)-(+)- and (S)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. *Food Chemistry*, v.80, p.525-534, 2003.
- ALVAREZ, F.R.; SHAUL, G.M.; KRISHNAN, E.R.; PERRIN, D.L.; RAHMNAN, M. Fate of terpene compounds in activated sludge wastewater treatment systems. *Journal Air & Waste Management*, v.49, p.734-739, 1999.
- AMARAL, J.A.; EKINS, A.; RICHARDS, S.R.; KNOWLES, R. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.2, p.520-525, 1998.
- ANDERSON, R.C.; ANDERSON, J.H. Respiratory toxicity of mattress emissions in mice. *Archives of Environmental Health*, v.55, n.1, p.38-43, 2000.
- ARORA, D.A. Biodelignification of wheat straw by different fungal associations. *Biodegradation*, Dordrecht, v.6, p.57-60, 1995.
- BABITSKAYA, V.G. Enzymatic degradation of lignin in plant substrates by micelial fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, New York, v.30, p.670-676, 1994.
- BALAN, D.S.L. Descoloração de corantes e efluentes têxteis. Trabalho apresentado ao II Workshop de Biodegradação. 2001, Campinas.
- BARNHART, E.T.; SARLIN, L.L.; CALDWELL, D.J.; BYRD, J.A.; CORRIER, D.E.; HARGIS, B.M. Evaluation of potential disinfectants for preslaughter broiler crop decontamination. *Poultry Science*, v.78, n.1, p.32-37, 1999.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science & Technology*, Easton, v.28, n.2, p.78-87, 1994.
- BOON, P.J.M.; BOON, D.V.D.; MULDER, G.J. Cytotoxicity and Biotransformation of the anticancer drug perillyl alcohol in PC12 cells and in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.167, p.55-62, 2000.
- BORJA, R.; MARTÍN, A.; MAESTRO, R., LUQUE, M.; DURÁN, M.M. Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by removal of phenolic inhibitors. *Bioresource Technology*, Essex, v.45, p.99-104, 1993.
- BRADDOCK, R.J.; CADWALLADER, K.R. Citrus by-products manufacture for food use. *Food technology*, p.105-110, 1992.
- BRADDOCK, R.J.; TEMELLI, F.; CADWALLADER, K.R. Citrus essential oils - a dossier for material safety data sheets. *Food Technology*, p.114-116, 1986.
- BUGG, T.D.H. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O₂ activation. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.5, p.550-555, 2001.
- CADWALLADER, K.R.; BRADDOCK, R.J.; PARISH, M.E. Isolation of α -terpineol dehydratase from *Pseudomonas gladioli*. *Journal of Food Science*, v.57, n.1, p.241-244, 1992.
- CHANG, H.C.; ORIEL, P. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Food Science*, v.59, n.3, p.660-662, 1994.
- CHANG, Y.C.; KARLBERG, A.T.; MAILBACH, H.I. Allergic contact dermatitis from oxidized *d*-limonene. *Contact Dermatitis*, v.37, n.6, p.308-309, 1997.
- CHASTAIN, D.E.; DOYLE, E.C.; EUGENE W.S.; CHRISTINE, C.S. Using limonen-10-ol to kill bacteria, yeast, and fungi. Int. A01N 031/00. US. n.5543435. 7Apr., 1994. 6Aug., 1996.
- CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D.K.; Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.55, p.541-546, 2001.
- CLEMENTE, A.R. Seleção de microrganismos ligninolíticos. estudo do sistema enzimático produzido e sua relação na degradação de compostos xenobióticos. 1997. 137 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), Lorena.

- CLEMENTE, A.R.** Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Fungos Ligninolíticos e sua Aplicação na Biorremediação de Solos Contaminados. 2002. 159p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W.** Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *Biotechnology Letters*, Kew, v.17, n.9, p.989-992, 1995.
- COLOCOUSI, A.; SAQIB, K.M.; LEAK, D.J.** Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11617 defective in the catabolism of α -pinene. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.45, p.822-830, 1996.
- CONNOR, M.S.; DELANEY, M.; ETTELE, N.; McMANUS, K.; VENTRY, L.S.** Treatment plant identifies mystery gas. *Water Environment & Technology*, v.5, n.11, p.13-14, 1993.
- DAGLEY, S.** Biochemical approach to some problems of environmental-pollution. *Essays Biochemistry*, v.11, p.81-138, 1975.
- DELORME, V.A.; CRISOFULLI, T.; WARNER, M.J.** Biodegradable fertilizer and pest control composition comprising limonene. Int. A01N 027/00. U.S. n. 5728648. 19Sep., 1996. 17 Mar., 1998.
- DEMYTTENAERE, J.C.R.; BELLEGHEM, K.V.; KIMPE, N.D.** Biotransformation o (R)-(+) and (S)-limonene by fungi and the use o solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, v.57, p.199-208, 2001.
- DHERE, S.G.; DHAVLIKAR, R.S.** Microbial transformation of terpenoids. *Science and Culture*, v.36, n.5, p.292, 1970.
- DIETRICH, D.R.; SWENBERG, J.A.** The presence of alpha-2F-globulin is necessary for *d*-limonene promotion of male rat kidney tumors. *Cancer Research*, v.51, p.3512-3521, 1991.
- DUETZ, W.A.; FJALLMAN, A.H.M.; REN, S.; JOURDAT, C.; WITHOLT, B.** Biotransformation of *d*-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.6, p.2829-2832, 2001.
- FALCONI, F.A.** Bioconversão de compostos fenólicos por fungos ligninolíticos. Campinas, 1998. 108p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FALCONI, F.A.** Seleção de microrganismos capazes de degradar monoterpenos para aplicação no tratamento de efluente de indústria cítrica. Campinas, 2003. 118p. Dissertação (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FISCHBACH, R.J.; ZIMMER, R.S.; PICHNER, A.; SCHNITZLER, J.** Monoterpene synthase activities in leaves of *Picea abies* (L.) Karst. and *Quercus ilex* L. *Phytochemistry*, n.54, p.257-265, 2000.
- FISCHER, K.; AKTHAR, M.; MESSNER, K.; BLANCHETTE, R.A.** Pitch reduction with the white-rot fungus *Cerioporiopsis subvermispora*. *6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Vienna, Austria, 1995, 11-15 June.
- GOLOVLEVA, L.A.; LEONT'EVSKII, A.A.** Ligninolytic activity of wood-decaying fungi. *Microbiology*, v.67, n.5, p.477-482, 1998.
- HARD, G.C.; WHYSNER, J.** Risk assessment of *d*-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens. *Critical Reviews in Toxicology*, v.24, n.3, p.231-254, 1994.
- HATAKKA, A.** Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.13, p.125-135, 1994.
- HEERDEN, I.V.; CRONJÉ, C.; SWART, S.H.; KOTZÉ, J.M.** Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, v.81, n.1, p.71-76, 2002.
- IKAN, R.** Isoprenoids III -Terpenoids. In: *Natural Products*. 2^a ed. New York: Academic Press, 1990. cap. 3, p.168-225.
- KARLBERG, A.T.; DOOMSGOOSSENS, A.** Contact allergy to oxidized *d*-limonene among dermatitis patients. *Contact Dermatitis*, v.36, n.4, p.201-206, 1997.
- KARLBERG, A.T.; MAGNUSSON, K.; NILSSON, U.** Influence of an antioxidant on the formation of allergenic compounds during autoxidation of *d*-limonene. *Annals of Occupational Hygiene*, v.38, n.2, p.199-207, 1994.
- KIM, D.; PARK, M.J.; KOH, S.C.; SO, J.S.; KIM, E.** Three separate pathways for the initial oxidation of limonene, biphenyl, and phenol by *Rhodococcus* sp. strain T04. *Journal of Microbiology*, v.40, n.1, p.86-89, 2002.
- KIMBALL, D.A.** Citrus oils, aromas, and essences. In: *Citrus Processing Quality Control and Technology*. New York: CHAPMAN & HALL, 1991. cap. 6, p.73-101.
- KOH, S.; PARK, Y.; KOO, Y.; SO, J.** Plants terpenes and lignin as natural cosubstrats in biodegradation of polyclorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs). Disponível em: <http://www.postech.ac.at/webzine/content/review> Acesso em: 10 abr. 2003.
- KWON, S.; ANDERSON, A.J.** Genes for multicopper proteins and laccase activity: Common features in plant-associated *Fusarium* isolates. *Canadian Journal of Botany*, v.80, n.5, p.563-570, 2002.

- LEBLOND, J.D.; APPLEGATE, B.M.; SCHULTZ, T.W.; SAYLER, G.S. Structure-toxicity assessment of metabolites of the aerobic bacterial transformation of substituted naphthalenes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, n.5, p.1235-1246, 2000.
- LIPTHAY, J.R.; BARKAY, T.; VEKOVA, J.; SORENSEN, S.J. Utilization of phenoxyacetic acid, by strains using either the *ortho* or *meta* cleavage of catechol during phenol degradation, after conjugal transfer of *tfda*, the gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/2-oxoglutarate dioxygenase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, n.2, p.207-214, 1999.
- MACHADO, M.A. **Biotecnologia na citricultura**. 1997. Disponível na Internet: <http://www.biotecnologia.com.br/lhp.html> . Data de acesso: 18 fev. 999.
- MANZANARES, P.; FAJARDO, S.; MARTIN, C. Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**. Washington, v.43, p.125-132, 1995.
- MARQUES, D.S. **Desterpenação de óleo essencial de laranja por cromatografia preparativa de fluido supercrítico**. Campinas, 1997. 331p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MARS, A.E.; GORISSEN, J.P.L.; VAN DEN BELD, I. Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillylic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v.56, p.101-107, 2001.
- MATTHEWS, R.F.; BRADDOCK, R.J. Recovery and applications of essential oils from oranges. **Food Technology**, p.57-61. 1987.
- MAZAS, N.; RUIZ, A. Aislamiento y caracterización de cepas biotransformadoras de terpenos, productoras de aromas. **Alimentaria**, v.260, p.41-43, 1995.
- MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.572-577, 1997.
- MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G.; PERDUE, E.M. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.831-838, 1996.
- MUMTAZ, M.M.; DE ROSA, C.T.; GROTHEN, J.; FERON, V.J.; HANSEN, H.; DURKIN, P.R. Estimation of toxicity of chemical mixtures through modeling of chemical interactions. **Environmental Health Perspectives**, v.106, suppl. 6, p.1353-1360, 1998.
- MURAKAMI, S.; NAKANISHI, Y.; KODAMA, N.; TAKENAKA, S.; SHINKE, R.; AOKI, K. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Pseudomonas* species AW-2. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.62, n.4, p.747-752, 1998.
- OLIVEIRA, B.H.; STRAPASSON, R.A. Biotransformation of the monoterpene, limonene, by *Fusarium verticilloides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, n.1, p.11-14, 2000.
- ONKEN, J.; BERGER, R.G. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. **Journal of Biotechnology**, v.69, n.2-3, p.163-168, 1999.
- PAVLOSTATHIS, S.G.; MISRA, G. Biotransformation of selected monoterpenes under nitrate-reducing conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.63-68, 1999.
- POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. Vegetables and Fruits. In: **Food Science**. 5^a ed. New York: CHAMPMAN & HALL, 1995. p.432-435.
- PRATES, H.T.; SANTOS, J.P.; WALQUIL, J.M.; FABRIS, J.D.; OLIVEIRA, A.B.; FOSTER, J.E. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castanum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v.34, n.4, p.243-249, 1998.
- REGALADO, V.; PERESTELO, F.; RODRIGUEZ, A.; CARNICERO, A.; SOSA F.J.; FUENTE, G.; FALCÓN, M.A. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase, and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. **Applied Microbiology and Technology**, v.51, p.388-390, 1999.
- RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v.38, n.1, p.27-32, 1999.
- SANTOS, J.P.; PRATES, H.T.; WAQUIL, J.M.; OLIVEIRA, A.B. **Avaliação de substâncias de origem vegetal no controle de pragas de grãos armazenados**. Disponível na Internet: <http://www.cnpms.embrapa.br/pesq1998.html> . Data de acesso: 19 fev. 1999.
- SAVITHIRZ, N.; GAGE, D.; FU, W.; ORIEL, P. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. **Biodegradation**, v.9, n.5, p.337-341, 1998.
- SAXENA, R.K.; SHARMILA, P.; SINGH, V.P. Microbial degradation of tannins. Biotransformations: Microbial degradation of health risk compounds. **Progress in Industrial Microbiology**, v.32, p.259-270, 1995.

- SHIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v.59, n.2, p.201-222, 1995.
- SPARRAT, M.C.N.; MARTINEZ, M.J.; TOURNIER, H.A.; CABELLO, M.N. ARAMBARRI, A.M. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* isolated from different substrata. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.16, p.799-803, 2000.
- SPEELMANS, G.; BIJLSMA, A.; EGGINK, G. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perilllic acid, by solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p.538-544, 1998.
- TAN, Q.; DAY, D.F. Bioconversion of limonene to a-terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.49, p.96-101, 1998.
- TANDLICH, R.; BREZNÁ, B.; DERCOVÁ, K. The effects of terpenes on the biodegradation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas stutzeri*. *Chemosphere*, v.44, p.1547-1555, 2001.
- THE ROD FAMILY TRUST, Robert, R.L. **Process for repelling and killing insects and compositions to effect the same comprising a monoterpene**. Int. A01N 025/32. U.S. n. 5653991. 9 May, 1995. 5Aug., 1997.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.
- TRAVKIN, V.M.; SOLYANIKOVA, I.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; VERVOORT, J.; VAN-BEREKL, W.J.H.; GOLOVLEVA, L.A. Degradation of 3,4-dichloro and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. *Journal of Environmental Science and Health*, v.B38, n.2, p.121-132, 2003.
- TRUDGILL, P.W. Microbial metabolism of monoterpenes - recent developments. *Biodegradation*, v.1, p.93-105, 1990.
- UMA, L.; KALAISELVI, R.; SUBRAMANIAN, G. Isolation of a ligninolytic bacterium for the degradation and possible utilization of coir waste. *Biotechnology Letters*, v.16, n.3, p.303-308, 1994.
- URIBE, S.; PENA, A. Toxicity of allelopathic monoterpenes suspensions on yeast. *Journal of Chemical Ecology*, v.16, n.4, p.1399-1408, 1990.
- VAN DYK, M.S.; VAN RENSBURG, MOLELEKI, E.N. Hydroxylation of (+) limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biochemistry Letters*, v.20, n.4, p.431-436, 1998.
- VILA, R.; VALENZUELA, L.; BELLO, H.; CANIGUERAL, S.; MONTES, M.; ADZET, T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. *Planta Medica*, v.65, n.2, p.178-179, 1999.
- WANG, Z.; CHEN, T.; GAO, Y.; BREUIL, C.; HIRATSUKA, Y. Biological degradation of resins acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.1, p.222-225, 1995.
- WARD, B.B.; COURTNEY, K.J.; LANGEHEIM, J.H. Inhibition of *Nitrosomonas europaea* by monoterpenes from coastal redwood (*Sequoia sempervirens*) in whole-cell studies. *Journal of Chemical Ecology*, v.23, n.11, p.2583-2598, 1998.
- WERF, M.J.; KEIJZER, P.M.; SCHAFT, P.H. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *Journal of Biotechnology*, v.84, p.133-143, 2000.
- WERF, M.J.; OVERKAMP, K.M.; BONT, J.A.M. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. *Journal of Bacteriology*, v.180, n.19, p.5052-5057, 1998.
- WERF, M.J.; SWARTS, H.J.; BONT, J.A.M. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.5, p.2092-2102, 1999.
- WRIGHT, S.J.; CAUNT, P.; CARTE, D.; BAKER, P.B. Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.224-227, 1986.
- ZHANG, F.M.; KNAPP, J.S.; TAPLEY, K.N. Decolorisation of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus. *Water Research*, v.33, n.4, p.919-928, 1999.

Degradação de Cafeína por Bactérias

Paulo Mazzafera e Dirce Mithico Yamaoka-Yano



Foto: I.S. Melo

I. Introdução

A disponibilidade de nutrientes é o principal fator ambiental controlando o crescimento de organismos em qualquer ecossistema. A falta de nutrientes e, portanto, de energia, dificultará a sobrevivência, uma vez que outros fatores, que eventualmente possam vir a limitar o crescimento, não serão superados (MORITA, 1992). Conseqüentemente, na escassez de nutrientes estabelece-se a competição entre várias populações de microrganismos.

No perfil do solo, temperatura, umidade, o conteúdo de gases e o pH variarão com as condições climáticas e com a profundidade. Entretanto, a disponibilidade de nutrientes ainda é o principal fator afetando a sobrevivência e o número de microrganismos (BERKELEY, 1971). Apesar de algumas exceções, normalmente o que se observa é a diminuição do número de microrganismos em camadas inferiores do solo, o que pode ser considerado reflexo da diminuição da matéria orgânica (BERKELEY, 1971).

É esperado que as características físicas e químicas de solos sejam alteradas quando utilizados para fins agrícolas, pela aplicação de defensivos, herbicidas, fertilizantes, como também pelo tipo de cultura conduzida sobre ele. De modo semelhante, solos em áreas não exploradas pela agricultura podem apresentar características particulares, resultantes do tipo de vegetação no local. Dessa forma, compostos presentes em determinadas plantas em quantidades significativas podem ser incorporados ao solo e afetar não só plantas posicionadas próximas, portanto com ação alelopática, como também os microrganismos presentes nele.

Entretanto, dada a carência de nutrientes no solo, não seria incomum a utilização desses compostos por microrganismos, como fonte de energia. No presente capítulo discute-se a degradação de cafeína por bactérias, com especial atenção àquelas isoladas de solo.

2. Degradação de purinas por bactérias

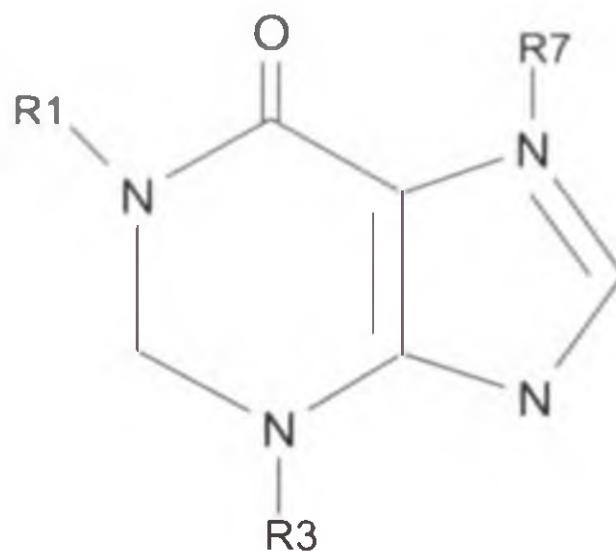
Uma ampla revisão sobre a utilização de purinas e compostos derivados como fonte de energia (carbono e nitrogênio) por microrganismos foi feita por Vogels & van der Drift (1976). Entre os compostos degradados, além das purinas adenina e guanina, degradadas por adenina/guanina deaminase, incluíam-se uréia, ácido úrico, hipoxantina, 1-metilxantina, 3-metilxantina, alantoína, ácido alantóico, 6-mercaptopurina, 2-tioxantina, 3-metil-2-tioxantina, 6,8-dihidroxipurina, entre outros. Com exceção de uréia, ácido úrico, alantoína e ácido alantóico, para os quais enzimas específicas atuam na degradação, urease, uricase, alantoinase e alantoicase, respectivamente, os outros derivados de xantina foram observados ser substratos para xantina

oxidase/desidrogenase, havendo, no entanto, variação na eficiência de degradação. Dependendo do microrganismo, NAD ou NADH podem ser os cofatores da reação.

Até o levantamento bibliográfico feito por Vogels & van der Drift (1976), apenas um trabalho mostrava a degradação de cafeína (Figura 1) por uma bactéria (WOOLFOLK, 1975).

Woolfolk (1975) isolou uma linhagem de *Pseudomonas putida*, que cresceu em até 0,5% de cafeína como a única fonte de carbono e nitrogênio. O isolamento foi feito incubando-se, por uma semana, amostras de solo em meio salino líquido, contendo 0,05% de cafeína e 0,0005% de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\cdot(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Quatro dias após sua transferência para meio sólido com a mesma composição, foi observado crescimento de colônias, parecendo todas serem do mesmo tipo. Várias transferências foram feitas antes de se cultivar em meio sólido contendo apenas cafeína (0,1%) como única fonte de carbono e nitrogênio. O isolado também crescia em qualquer di ou monometilxantinas, derivadas de cafeína. Usando células intactas ou extratos protéicos livres de células, o autor concluiu que a cafeína teria os radicais metil (CH_3) removidos hidroliticamente, com a formação final de xantina e metanol. Xantina seria, então, degradada a ácido úrico por xantina desidrogenase, entrando na via normal do metabolismo de purinas. O metanol e seus derivados seriam degradados por hidrogenases específicas.

Blecher & Lingens (1977) obtiveram vários isolados bacterianos a partir de solo, sendo todos identificados como *P. putida*. O melhor crescimento obtido foi com 0,35% de cafeína no meio, e em 0,55% o crescimento era totalmente inibido. Para o isolamento, 300 g de solo foram misturados com 0,5 g de cafeína e mantidos a 30°C por seis meses. Regularmente umedecia-se a mistura com água deionizada. Desse material foram tomadas amostras de 5g, às quais adicionou-se meio mineral líquido, contendo 0,1% de cafeína e 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e incubadas a 30°C por quatro dias. Após várias transferências para o mesmo meio de cultura, alíquotas foram semeadas em meio sólido rico em nutrientes e colônias que cresceram nesse meio foram transferidas para placas contendo meio sólido em que cafeína era a única fonte de carbono e nitrogênio. As colônias obtidas eram de só um tipo e foram todas identificadas como *P. putida*, demonstrando a seleção ocorrida ao longo do tempo de incubação. Quando amostras de solo foram incubadas com cafeína por apenas uma semana, ao



Composto	R1	R3	R7
Cafeína (1,3,7-trimetilxantina)	CH_3	CH_3	CH_3
Teobromina (3,7-dimetilxantina)	H	CH_3	CH_3
Teofilina (1,3-dimetilxantina)	CH_3	CH_3	H
Paraxantina (1,7-dimetilxantina)	H	CH_3	CH_3
1-Metilxantina	CH_3	H	H
3-Metilxantina	H	CH_3	H
7-Metilxantina	H	H	CH_3
Xantina	H	H	H

FIGURA 1. Estruturas de metilxantinas degradadas por microrganismos.

Várias transferências foram feitas antes de se cultivar em meio sólido contendo apenas cafeína (0,1%) como única fonte de carbono e nitrogênio. O isolado também crescia em qualquer di ou monometilxantinas, derivadas de cafeína. Usando células intactas ou extratos protéicos livres de células, o autor concluiu que a cafeína teria os radicais metil (CH_3) removidos hidroliticamente, com a formação final de xantina e metanol. Xantina seria, então, degradada a ácido úrico por xantina desidrogenase, entrando na via normal do metabolismo de purinas. O metanol e seus derivados seriam degradados por hidrogenases específicas.

Blecher & Lingens (1977) obtiveram vários isolados bacterianos a partir de solo, sendo todos identificados como *P. putida*. O melhor crescimento obtido foi com 0,35% de cafeína no meio, e em 0,55% o crescimento era totalmente inibido. Para o isolamento, 300 g de solo foram misturados com 0,5 g de cafeína e mantidos a 30°C por seis meses. Regularmente umedecia-se a mistura com água deionizada. Desse material foram tomadas amostras de 5g, às quais adicionou-se meio mineral líquido, contendo 0,1% de cafeína e 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e incubadas a 30°C por quatro dias. Após várias transferências para o mesmo meio de cultura, alíquotas foram semeadas em meio sólido rico em nutrientes e colônias que cresceram nesse meio foram transferidas para placas contendo meio sólido em que cafeína era a única fonte de carbono e nitrogênio. As colônias obtidas eram de só um tipo e foram todas identificadas como *P. putida*, demonstrando a seleção ocorrida ao longo do tempo de incubação. Quando amostras de solo foram incubadas com cafeína por apenas uma semana, ao

invés de seis meses, outras bactérias, além de *Pseudomonas*, eram observadas, confirmando a seletividade da cafeína em incubações por longo tempo.

De modo semelhante, Glück & Lingens (1987), Middelhoven & Bakker (1982) e Asano *et al.* (1983) obtiveram, a partir de solo, isolados de *P. putida* apresentando capacidade para degradar cafeína. No isolamento também foi usado o enriquecimento do meio com cafeína. Os isolados de Glück & Lingens (1987) e Asano *et al.* (1983) cresceram em 2% de cafeína e o de Middelhoven & Bakker (1982) em 0,5%.

Vários isolados bacterianos degradando cafeína foram isolados por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1998), a partir de solo cultivado com café. Além de *P. putida* e *Pseudomonas fluorescens*, foram isoladas *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp. e uma bactéria corineiforme. Os isolados de *P. putida* foram os que apresentaram maior capacidade de crescer em meio contendo exclusivamente cafeína como fonte de carbono e nitrogênio. O crescimento de alguns isolados de *P. putida* foi observado em até 5% de cafeína em meio sólido (Figura 2).

Nessa concentração a cafeína cristalizava-se no meio, tornando-o opaco, e à medida que havia o crescimento neste local o meio voltava a ficar translúcido. Além de cafeína, vários desses isolados apresentaram capacidade para degradar outras metilxantinas, como é mostrado na Tabela 1.

Talvez o determinante para que os isolados de Yamaoka-Yano & Mazzafera (1998) tenham crescido em 5% de cafeína, concentração mais alta

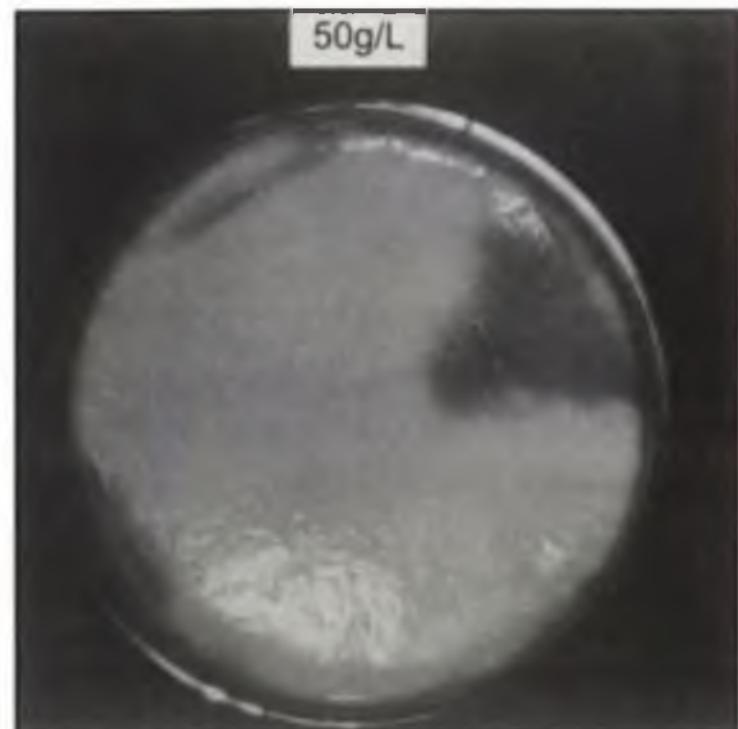


FIGURA 2. Crescimento de isolados de *Pseudomonas putida* em meio sólido contendo cafeína.

TABELA 1. Degradação de outras metilxantinas por isolados de *Pseudomonas putida* e linhagens controle, após 96h de incubação. A concentração inicial dos compostos no meio era 0,3 g/L. Os dados são expressos em mg/L.

	THF ^a	THB	XAN	HPX	URI
Controles					
1806	150	280	0	9	0
PC11B	200	282	0	8	2
<i>Pseudomonas putida</i>					
isolado L	25	28	0	8	4
isolado dob5	0	0	0	9	2
isolado Pp	0	0	0	8	2

^aTHF = teofilina THB = teobromina; XAN = xantina; HPX = hipoxantina; URI = ácido úrico.

do que a de qualquer relato anterior na literatura, tenha sido o fato de ter sido usado solo coletado sob plantas de café. O suporte para isso vem da maneira como foi feito o isolamento, ou seja, não foi feito enriquecimento e/ou cultivo prolongado com o alcalóide. Amostras de 10g de solo foram colocadas em meio mineral líquido contendo apenas cafeína (0,03%) como fonte de carbono e nitrogênio e incubadas por 72 horas. Após diluições em série (10^{-1} a 10^{-8}), 0,1 mL foi semeado em placas com meio sólido Nutriente-Agar, e incubadas a 30°C. Colônias crescendo nessas placas foram, então, transferidas para placas com meio mineral sólido contendo apenas cafeína (0,03%) como fonte de carbono e nitrogênio, e incubadas a 30°C por 48 horas. Anteriormente, Mazzafera *et al.* (1994) obtiveram ainda, de maneira mais simples, um isolado de *Serratia marcescens*, colocando amostras de solo sob cultivo de café em água, com posterior semeadura em meio sólido contendo cafeína.

Para ambos os dois casos citados (MAZZAFERA *et al.*, 1994; YAMAOKA-YANO & MAZZAFERA, 1998), onde o isolamento foi feito a partir de solo cultivado com café, as bactérias isoladas provavelmente já se apresentavam adaptadas para degradar a cafeína proveniente de cafeeiros. De outro modo, o que ocorre naturalmente nesses solos foi o que Blecher & Lingens (1977) provocaram, ao incubarem por seis meses o solo ao qual foi adicionada cafeína.

Woolfolk (1976) observou que, quando células de *P. putida* crescidas em meio contendo xantina, ao invés de cafeína, eram usadas como inóculo em meio contendo cafeína, havia atraso no crescimento. O mesmo foi posteriormente observado por Blecher & Lingens (1977), quando o inóculo foi crescido em xantina e ácido úrico. Porém, o crescimento era normal quando o inóculo foi preparado com 7-metilxantina e teobromina. De maneira semelhante, quando o isolado L de *P. putida* obtido por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1998) foi crescido em meio rico em nutrientes (Luria-Broth - LB) e usado como inóculo em meio contendo apenas cafeína (M9), também houve um atraso no crescimento e na degradação de cafeína, quando comparado com inóculo produzido em meio com cafeína (Figuras 3A e 3B). Portanto, a degradação de cafeína nessas bactérias parece ser induzida pelo próprio alcalóide.

Babu *et al.* (2005) adotaram o mesmo procedimento que Mazzafera *et al.* (1994) e Yamaoka & Mazzafera (1998) para isolar bactérias com a capacidade de

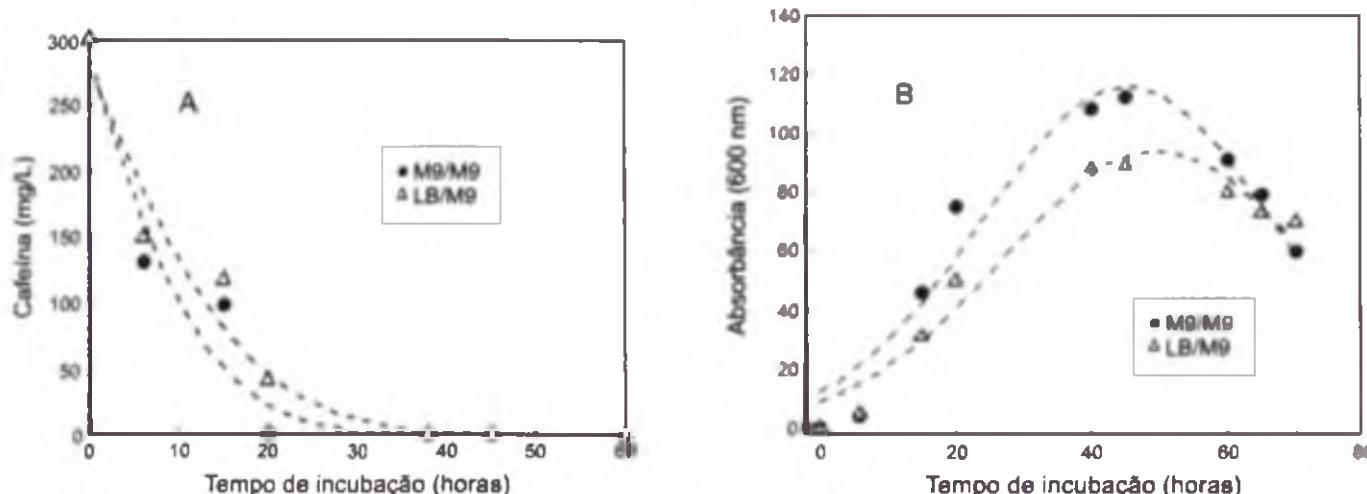


FIGURA 3. Degradação de cafeína (A) e crescimento (B) do isolado L de *Pseudomonas putida* a partir de inóculo produzido em meio M9 (com cafeína) e LB (sem cafeína), e cultivada em meio M9.

degradar cafeína, e isolaram uma linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* a partir de solo cultivado com café. Assim como mostrado na Figura 3 para *P. putida*, esta bactéria também mostrou ser induzida a degradar cafeína, sendo que no período de 48h extinguiu completamente o alcalóide do meio de cultura, contendo 1 g de cafeína por litro. A mesma linhagem foi imobilizada em coluna e utilizada em um bioreator para contínua degradação de um extrato de soluções-teste.

3. Aspectos enzimáticos na degradação de cafeína

Dikstein *et al.* (1957) e Bergmann *et al.* (1964) detectaram em linhagens de *Pseudomonas* a presença de uma desidrogenase capaz de oxidar 3-metilxantina, mas não 1-metilxantina. Mais tarde, utilizando o mesmo grupo de bactérias, Woolfolk (1975) concluiu que uma desidrogenase, provavelmente xantina desidrogenase, era capaz de oxidar 1 e 3-metilxantina. O mesmo autor sugeriu que a cafeína seria inicialmente metabolizada por ação de uma enzima que removeria, hidroliticamente, os três grupos metil, com a produção de metanol e xantina. O metanol provavelmente seria posteriormente oxidado a CO₂.

A degradação da cafeína sob efeito de concentração de oxigênio foi analisada por Middelhoven & Bakker (1982) em *P. putida*, isolada de solo. Concluíram que a primeira etapa enzimática resultava numa remoção sucessiva dos três grupos metil da molécula de cafeína, reações provavelmente catalizadas por monooxigenases.

Sauer (1982) obteve indicações de atividade de citocromo P-450 em extratos protéicos de leveduras degradadoras de cafeína, deduzindo que o metabolismo do alcalóide poderia ser semelhante ao do homem.

Por outro lado, Schwimmer *et al.* (1971) estudando em fungos a degradação de cafeína para teofilina, e Blecher & Lingens (1977), em bactérias, de cafeína para teobromina, observaram que a degradação era diferente daquela observada em leveduras, indicando a participação de diferentes enzimas no metabolismo.

Aspectos enzimológicos da demetilação da cafeína em uma linhagem mutante de *P. putida*, identificada por Blecher & Lingens (1977), foram investigados por Hohnloser *et al.* (1980). Usando cafeína como substrato e NADPH e o íon cobalto como cofatores, observaram somente a produção de teobromina, indicando que havia um só sistema de enzima que demetilava a cafeína. Utilizando outras xantinas metiladas (paraxantina, teobromina e 7-metilxantina) no lugar de cafeína, detectou-se nenhuma atividade. Os resultados levaram Hohnloser *et al.* (1980) a inferir que o crescimento pobre das bactérias no meio de cultura, usando a cafeína como fonte de carbono, era decorrente da baixa taxa de demetilação e que era o fator limitante para o crescimento dos microrganismos. O fato do extrato enzimático, obtido por Hohnloser *et al.* (1980), ser ativo somente contra cafeína é, de certa forma, conflitante com os resultados de Blecher & Lingens (1977), que observaram crescimento desse mesmo isolado com outras metilxantinas, como teobromina, pataxantina entre outros.

Gluck & Lingens (1987), também trabalhando com *P. putida*, não conseguiram obter somente teobromina como primeiro produto da degradação de cafeína; a maioria das linhagens produziam uma mistura de teobromina e paraxantina. Esses resultados

ajudaram a confirmar os trabalhos de Blecher & Lingens (1977), onde havia sido sugerido que a cafeína é demetilada através de duas vias paralelas, com formação de teobromina e de paraxantina. O trabalho de Mazzafera *et al.* (1994) também evidencia estas duas vias de degradação em *S. marcescens*. Posterior a estes compostos havia formação de 7-metilxantina e xantina. No caso de *S. marcescens*, através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, observou-se atividade de xantina oxidase contra cafeína, dimetilxantinas e monometilxantinas.

Yamaoka-Yano & Mazzafera (1999) estudaram a via de degradação de cafeína no isolado L de *P. putida* que crescia em meio mínimo contendo 5% de cafeína (YAMAOKA-YANO & MAZAFERA, 1998) e seus resultados sugerem uma via de degradação (Figura 4) semelhante àquela proposta por Blecher & Lingens (1987).

Yamaoka-Yano & Mazzafera (1999) também purificaram uma xantina oxidase responsável pela conversão de metilxantinas a seus respectivos ácidos metilúricos (Figura 4). Os autores sugerem que a enzima não seja tão específica para a conversão de xantina a ácido úrico, também possuindo a capacidade de reconhecer teobromina, paraxantina e 7-metilxantina como substratos.

Uma vez que a linhagem L de *P. putida* isolada por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1999) apresentava uma rara capacidade de crescer em altas concentrações de cafeína, foram feitas tentativas de se purificar uma cafeína demetilase (Figura 4), porém sem sucesso, uma vez que a atividade da enzima era muito instável (Yamaoka-Yano & Mazzafera, dados não publicados). Porém, estudos conduzidos com extratos parcialmente puros puderam mostrar que havia dependência

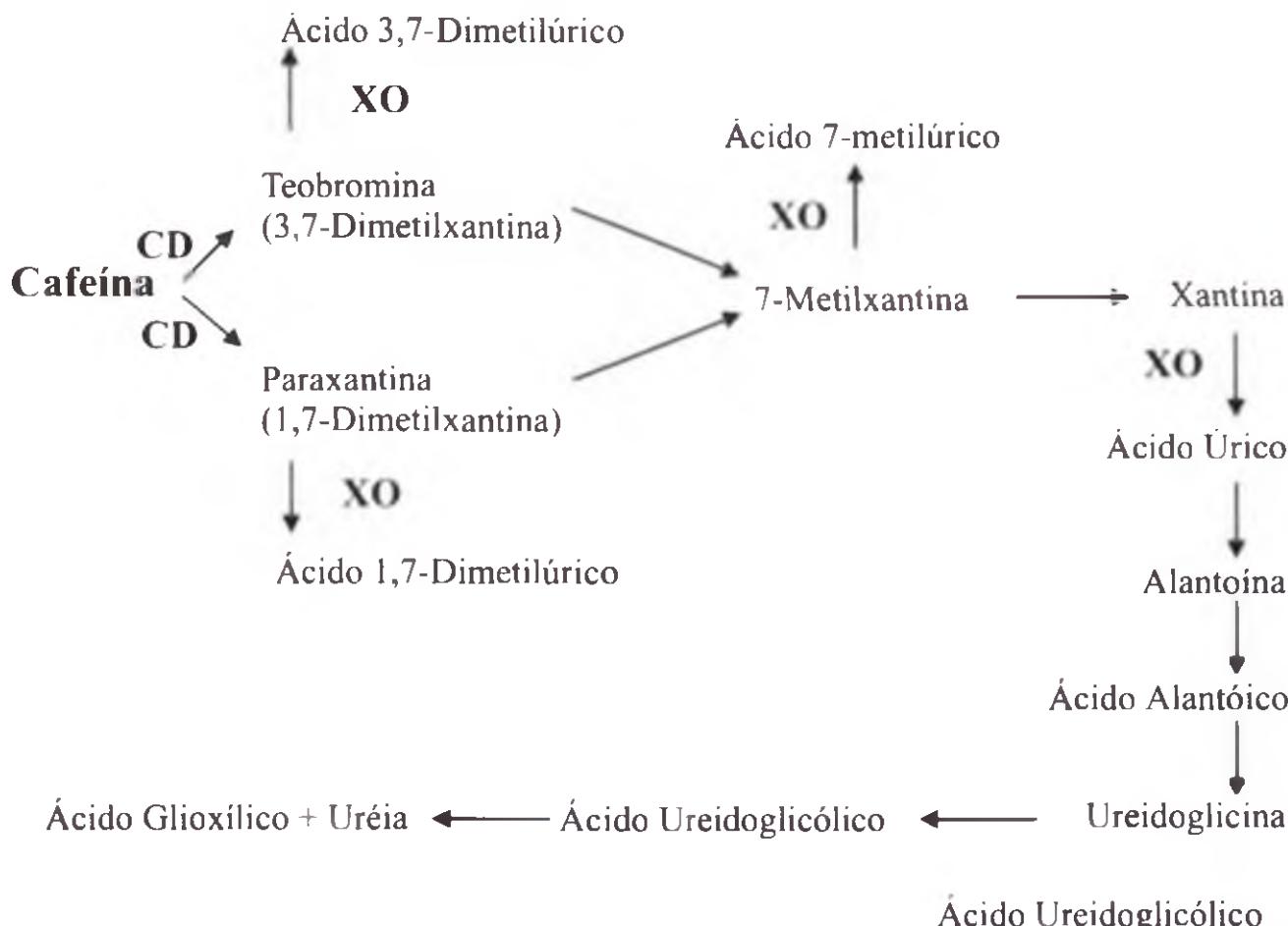


FIGURA 4. Rota de degradação de cafeína em *Pseudomonas putida* linhagem L, isolada por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1999). XO = Xantina oxidase, CD = Cafeína demetilase.

a NADH ou NADPH, sendo teobromina e paraxantina produzidas a partir de cafeína como substrato. Paraxantina era melhor substrato que teobromina. Também foi observado que a atividade de cafeína demetilase era liberada no meio de cultura que tinha somente cafeína como fonte de carbono e nitrogênio. A adição de Zn ao meio de reação inibiu a degradação através de teobromina, mas não de paraxantina. Atividades ótimas foram obtidas com temperaturas entre 20 e 30°C, e com pH 7.0. Uma vez que análises de proteínas do meio de cultura SDS-PAGE (explicar) mostraram a presença de poucas proteínas, proteínas de 2L de meio de cultura foram concentradas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (explicar), desalinizadas por diálise e separadas em coluna de troca aniônica. A atividade de demetilase era detectada como um pico único em um gradiente de eluição com NaCl, e que quando incubado com cafeína originava teobromina e paraxantina. Qualquer outro passo de purificação levava à completa perda de atividade e a enzima não pode ser purificada à homogeneidade.

Blecher & Lingens (1977) e Gluck & Lingens (1987) isolaram mutantes de *P. putida* com habilidade para degradar cafeína e tentaram bloquear a degradação, com a finalidade de produzir derivados de cafeína para aplicação comercial. Ao contrário desses autores, Asano *et al.* (1993) obtiveram sucesso no isolamento de uma linhagem de *P. putida*. O bloqueio da degradação foi feito pela adição de Zn no meio de cultura, acumulando teobromina. Esta metilxantina era excretada no meio de cultura, precipitando no fundo do frasco devido à sua baixa solubilidade.

Sideso *et al.* (2001) tentaram purificar a cafeína demetilase de uma linhagem de *P. putida*, mas também não tiveram sucesso devido à instabilidade da enzima. Apesar disso, notaram que adição de criopreservantes e liofilização estabilizavam significativamente a atividade da enzima. No mesmo estudo observou-se que as xantinas resultantes da ação enzimática eram teobromina, 7-metilxantina e xantina.

Usando um ensaio com a redução de CO, Ogunseitan (2002) verificou que a atividade de P450 aumentava em células de *P. putida* ATC 700097 exposta à cafeína. No entanto, o autor não obteve sucesso na tentativa de isolar a P450 responsável pela degradação de cafeína usando “primers” desenhados a partir da seqüência de nucleotídeos de P450 específica na degradação de cânfora, isolada de *P. putida* ATCC 17453.

4. A cafeína no solo: incorporação, comportamento químico e alelopatia

Como para qualquer alcalóide, cafeína é sintetizada somente por plantas. Deste modo, a sua presença no solo é condicionada à presença de plantas crescendo sobre ele. Ao se desprenderem, folhas, frutos e outras partes da planta são os principais “fornecedores” de cafeína ao solo. Também, deve-se considerar a possibilidade da lavagem da cafeína das folhas, feita pela água das chuvas.

Não existem informações precisas sobre a incorporação de cafeína em solo cultivado com plantas que possuam este alcalóide. Em uma estimativa grosseira, pois não consistia de uma situação normal, Waller *et al.* (1986) cortaram um cafeeiro

adulto em várias partes e colocaram-nas sobre uma tela suspensa a uma certa distância de um recipiente. Sempre após uma chuva a quantidade de cafeína era estimada na água coletada no recipiente. Desta maneira, chegou-se ao valor de incorporação anual de 1-2 g/m² de solo.

Uma vez no solo, a cafeína é fortemente adsorvida por argilas, posicionando-se entre as camadas de sílica (LAILACH *et al.*, 1968). A estrutura planar da cafeína permite a formação de camadas únicas, com as moléculas inclinadas, ou ainda de camadas duplas, havendo a formação de forças de van der Walls - London com ambas as camadas de sílica. Isto faz com que a retenção da cafeína pela matrix do solo seja bastante forte, sendo baixa sua recuperação, mesmo sob condições extremas de extração, tal como o uso de ácido sulfúrico ou fluorídrico concentrados (WALLER *et al.*, 1986). O emprego de bases fortes (NaOH), como recomendado por Griffith *et al.* (1976), também não melhorou a recuperação de cafeína (Mazzafera, dados não publicados).

Desta forma, a cafeína adsorvida pela matrix do solo seria indisponível para os microrganismos do solo, como também para ter qualquer efeito sobre plantas. Portanto, o efeito alelopático atribuído à cafeína em vários trabalhos (ver referências em RICE, 1984; RIZVI & RIZVI, 1992), como também a autotoxicidade do cafeeiro, causada pela liberação de sua própria cafeína, como alegado por Waller *et al.* (1986), seria possível somente devido à cafeína livre, não adsorvida. Considerando, porém, que esta cafeína disponível poderia ser degradada por microorganismos, como tem sido indicado acontecer (MAZZAFERA *et al.*, 1994; YAMAOKA-YANO & MAZZAFERA, 1995), o efeito alelopático de cafeína em condições de campo e a própria autotoxicidade sobre o cafeeiro devem ser questionados.

Até o presente, os trabalhos sobre o efeito alelopático de cafeína sempre foram feitos em condições artificiais de laboratório e sempre se desconsiderou que em condições de campo há a possibilidade da degradação de cafeína por microrganismos do solo. Há a evidência para a degradação de cafeína em diferentes solos, com diferentes composições em argila (textura), foram dadas por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995), que adicionaram cafeína a amostras de solo que foram esterilizadas ou não. Após um certo período de incubação, muito menos cafeína foi recuperada no solo não esterilizado. A Tabela 2 mostra os resultados de dois experimentos independentes, sobre a incorporação de cafeína em solo esterilizado e não esterilizado.

TABELA 2. Recuperação de cafeína adicionada em amostras de solos estéreis e não estéreis, após uma semana de incubação a temperatura ambiente.

Tipo de Solo	Tratamento	% Cafeína Recuperadaa	
		Experimento 1	Experimento 2
Londrina - PR (textura argilosa)	estéril	69	79
	não estéril	42	53
Marília - SP (textura arenosa)	estéril	62	80
	não estéril	27	41
Campinas - SP (textura intermediária)	estéril	51	87
	não estéril	15	60

^a% da cafeína adicionada.

5. Aplicações tecnológicas para bactérias e outros microrganismos com capacidade de degradar cafeína

As principais possibilidades de aplicação tecnológica de microrganismos que apresentam capacidade para degradar cafeína têm sido a descafeinação da palha de café para uso posterior como ração animal, a produção de compostos derivados de cafeína e a remoção de cafeína de alimentos e de produtos de descarte.

Asano *et al.* (1993), utilizando uma linhagem de *P. putida* que crescia em cafeína como única fonte de carbono e nitrogênio, verificaram que a adição de Zn²⁺ ao meio líquido de cultura resultou em acúmulo de teobromina, sendo a dimetilxantina liberada no meio. Concluíram que o íon atuava como um inibidor seletivo de uma das enzimas que demetilam a teobromina. Sem a adição de Zn²⁺ quase não havia acúmulo de teobromina, devido à contínua demetilação do alcalóide. Sob condições ótimas de cultivo, com 20 g/L cafeína, obteve-se um rendimento de 92% na produção de teobromina. Este foi primeiro trabalho mostrando a viabilidade na produção de derivados de cafeína, utilizando-se bactérias com degradadoras do alcalóide.

Mazzafera *et al.* (1994) observaram que um isolado de *S. marcescens* liberava teobromina, paraxantina e 7-metilxantina no meio de cultura quando cultivada em meio com cafeína. Entretanto, devido à baixa taxa de degradação de cafeína e crescimento lento, o seu emprego para a produção de derivados de cafeína foi descartado.

No beneficiamento do fruto do café, a semente, que é o produto de interesse econômico, é retirada e a palha aparece como subproduto, correspondendo a pouco mais de 60% do peso do fruto seco (COSTE, 1959).

Na maioria das propriedades rurais, a palha gerada pelo benefício dos frutos do café é geralmente utilizada como adubo na própria lavoura. Entretanto, apesar de apresentar boa composição em relação a outros adubos orgânicos, principalmente no conteúdo de nitrogênio e potássio, a palha tem o inconveniente de ocupar bastante volume, dificultando sua incorporação no solo (ELÍAS, 1987). Este mesmo problema, ou seja, o volume, dificulta o uso da palha para a extração de cafeína (BRESSANI, 1987b).

Além do uso como fertilizante, vários trabalhos têm investigado o emprego da palha de café como alimento animal, principalmente para bovinos, equinos, suínos e aves (BRAHAM, 1987; BRESSANI, 1987b; CABEZAS *et al.*, 1987, JARQUÍN 1987). Apesar de suas qualidades nutricionais, principalmente o teor de proteínas (ELIAS, 1987), dois fatores, o alto conteúdo de taninos e cafeína, limitam seu uso para este fim (BRESSANI, 1987a; CLIFFORD & RAMIREZ-MARTINEZ, 1991).

A limitação causada pelos taninos reside no fato de provocar sabor amargo à palha de café, afetando a palatabilidade, e também por complexarem proteínas, formando compostos insolúveis e diminuindo a absorção do nitrogênio pelo trato digestivo dos animais. Estudos realizados por Menezes *et al.* (1993) mostraram que uma linhagem de *Lactobacillus plantarum* era capaz de degradar

perto de 90% do tanino encontrado na palha de café. O processo de fermentação foi simples, no qual a palha de café foi homogeneizada e incubada a 32°C por oito dias na presença de inóculo de *L. plantarum*, com adição de sacarose 1%. Apesar de não ter sido testado, os autores sugeriram o uso dessa palha na alimentação animal.

Quanto às limitações impostas pela cafeína, são listadas desde o gosto amargo, também afetando a palatabilidade, até uma série de distúrbios fisiológicos que podem surgir quando ingerida em grande quantidade. James (1991) apresenta excelente revisão sobre o excesso no consumo de cafeína em animais de laboratório e suas consequências fisiológicas. Estudos com animais de médio e grande porte foram revistos por outros autores (BRAHAM, 1987; BRESSANI, 1987b; CABEZAS *et al.*, 1987; JARQUÍN, 1987).

De modo geral, os estudos do uso da palha de café como alimento animal foram feitos colocando-a como um componente de silagem, tendo já sido observada uma redução, não acentuada, no teor de cafeína (MURILLO, 1987). De certa forma, esta redução natural seria esperada, uma vez que vários tipos de bactérias podem ser isolados de frutos de café e certamente que algumas delas devem apresentar alguma capacidade para consumir cafeína como fonte de energia (SILVA *et al.*, 2000). Estudos mais recentes com um isolado do fungo *Penicillium roqueforti* mostraram a potencialidade do emprego de microrganismos para a redução significativa desse alcalóide em palha de café (ROUSSOS, *et al.*, 1989). Outros fungos como *Aspergillus* sp e *Rhizopus delemar* têm sido usados para remoção de cafeína da palha de café (TAGLIARI *et al.*, 2003; HAKIL *et al.*, 1998). Uma ampla revisão sobre o uso de microrganismos para degradar cafeína da palha de café foi recentemente publicada (MAZZAFERA, 2002).

Devido à alta capacidade do isolado L de *P. putida* em degradar cafeína, Yamaoka-Yano & Mazzafera (1996) realizaram ensaios preliminares para averiguar a possibilidade do seu emprego na descafeinação da palha de café, para uso na alimentação animal. Inóculo (1 mL) de cultura de 24 horas foi adicionado à palha de café (20 g), que havia sido umedecida a 40, 60 e 80% de seu peso, e a intervalos de 10 dias foram tiradas amostras para dosagem de cafeína. Antes da inoculação a palha foi esterilizada em autoclave. Após 30 dias de incubação a cafeína havia sido drasticamente reduzida (Figura 5), demonstrando o potencial de aplicação desse isolado.

Alguns estudos têm verificado a possibilidade de se usar bactérias para remover cafeína de alimentos e bebidas, usando-se bioreatores (BABU *et al.*, 2005). Ainda que os resultados tenham mostrado ainda uma grande limitação para esta aplicação tecnológica, é uma área que tem recebido atenção e mostrado potencial de aplicação (GOKULAKRISHNAN *et al.*, 2005).

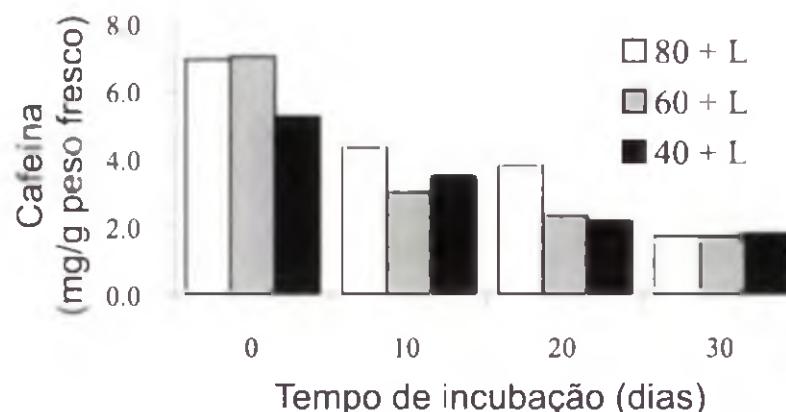


FIGURA 5. Redução no conteúdo de cafeína em palha de café após inoculação com o isolado L de *Pseudomonas putida*.

6. Considerações finais

Além do uso potencial de bactérias para a produção de derivados de cafeína, na descafeinação da palha de café e também de alimentos e bebidas, deve-se ressaltar que muito pouco ainda se conhece sobre as enzimas envolvidas e os genes que as codificam. O isolamento desses genes tornaria possível aumentar a eficiência do processo de descafeinação, e também de serem utilizados na produção de plantas transgênicas, mais especificamente, café e chá, sabidamente possuidoras de cafeína e com amplo consumo de suas bebidas. O mercado para o café descafeinado atualmente representa aproximadamente 25% de todo o café comercializado no mundo. Recentemente, cafeeiros da espécie *C. canephora* com menor teor de cafeína foram produzidos utilizando-se tecnologia de RNAi, onde bloqueou-se a biossíntese do alcalóide (OGITA *et al.*, 2003). Porém, uma estratégia poderia ser aumentar a degradação de cafeína, utilizando-se um gene bacteriano. Portanto, ao invés de bloquear a síntese de cafeína no tecido vegetal, seria estimulada a sua degradação a partir do gene bacteriano. Uma empresa farmacêutica japonesa depositou em 1997 duas seqüências de cafeína demetilase de *P. putida* no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Referências

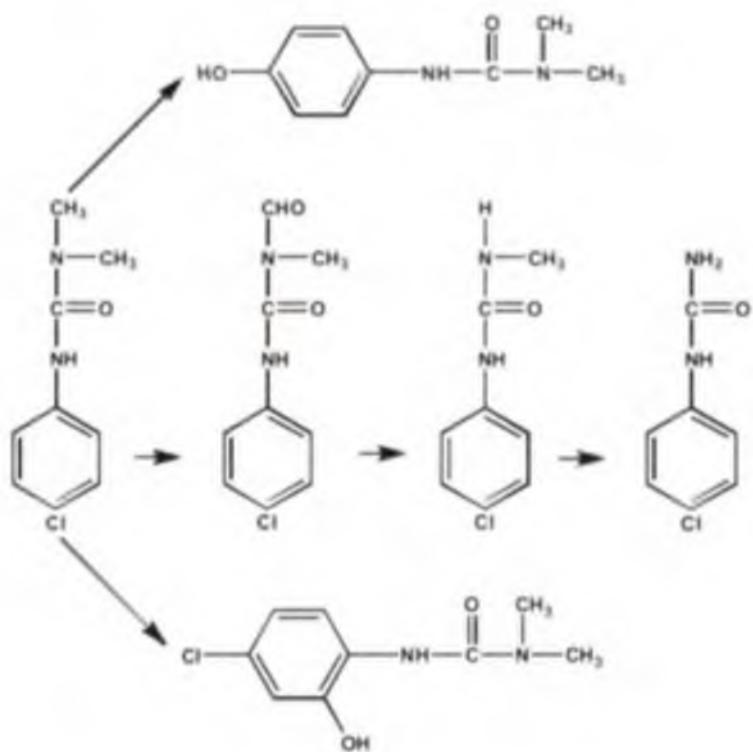
- ASANO, Y.; KOMEDA, T.; YAMADA, H. Microbial production of theobromine from caffeine. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. Tokyo, v.57, p.1286-1289, 1993.
- BABU, V.R.S.; PATRA, S.; THAKUR, M.S.; KARANTH, N.G.; VARADARAJ, M.C. Degradation of caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708. *Enzyme and Microbial Technology* v.37, p.617-624, 2005.
- BERGMANN, F.; UNGAR-WARON, H.; KWIETNY-GOVRIN, H. Action of 8-azaguanine and 8-azaxanthine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*. Liverpool, v.91, p.270-276, 1964.
- BERKELEY, R.C.W. Microbiology of soil. p.479-514. In: HAWKER, L.E.; LINTON, A.H., ed. *Micro-organisms. function form and environment*. London: Edward Arnold, 1971.
- BLECHER, R.; LINGENS, F. The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* Bd., Strassburg, v.358, p.807-817, 1977.
- BRAHAM, J.E. Coffee pulp in other species. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.51-54.
- BRESSANI, R. Antiphysiological factors in coffee pulp. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. Institute of Nutrition of Central America and Panamá, 1987a. p.83-88.
- BRESSANI, R. Potential uses of coffee berry by-products. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. Institute of Nutrition of Central America and Panamá, 1987b. p.17-25
- CABEZAS, M.T.; FLORES, A.; EGANA, J.I. Use of coffee pulp in ruminant feeding. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. Panamá: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.25-38.
- CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry*. New York, v.40, p.35-42, 1991.
- COSTE, R. *Les cafiers et les cafés dans le monde*. Paris, Editions Larose, 1959. t. 2, v.1.
- DIKSTEIN, S.; BERGMANN, F.; HENIS, Y. Studies on uric acid and related compounds. IV. The specificity of bacterial xanthine oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.224, p.67-77, 1957.
- ELÍAS, L.G. Chemical composition of coffee-berry by-products. In: BRAHAM, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. Panama: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.11-16.
- GLUCK, M.; LINGENS, F. Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Heidelberg, v.25, p.334-340, 1987.

- GOKULAKRISHNAN, S.; CHANDRARAJ, K.; GUMMADI, S.N. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.37, p.225-232, 2005.
- GRIFFITH, S.M.; SOWDEN, F.J.; SCHNITZER, M. The alkaline hydrolysis of acid-resistant soil and humic acid residues. **Soil Biology and Biochemistry**, Victoria, v.8, p.529-531, 1976.
- HAKIL, M.; DENIS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; AUGUR, C. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.22, p.355-359, 1998.
- HOHNLOSER, W.; OSSWALD, B.; LINGENS, F. Enzymological aspects of caffeine demethylation and formaldehyde oxidation by *Pseudomonas putida* Cl. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologie und Chemie**, Strassburg, v.361, p.1763-1766, 1980.
- JAMES, J.E. **Caffeine and Health**. San Diego: Academic Press, 1991.
- JARQUÍN, R. Coffee pulp in swine feeding. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp: composition, technology, and utilization**. Panama: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.39-49.
- LAILACH, G.E.; THOMPSON, T.D.; BRINDLEY, G.W. Absorption of pyrimidines, purines, and nucleosides by Li-, Na-, Mg-, and Ca-Montmorillonite (clay-organic studies XII). **Clays and Clay Mineralogy**, London, v.16, p.286-293, 1968.
- MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, p.815-821, 2002.
- MAZZAFERA, P.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. **Microbial Ecology**, New York, v.31, p.199-207, 1994.
- MENEZES, H.C.; SAMAAN, F.S.; CLIFFORD, M.N.; ADAMS, M.R. The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LA CHIMIE DU CAFÉ, 15., Montpellier. **Resumos**. Montpellier, Association Scientifique International du Café, s.d. p.858-860.
- MIDDELHOVEN, W.J.; BAKKER, C.M. Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* strain C3024. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.15, p.214-217, 1982.
- MORITA, R.Y. Survival and recovery of microorganisms from environmental samples. In: LEVIN, M.A.; SEIDLER, R.J.; ROGUL, M. ed. **Microbial Ecology**. principles, methods, and applications. New York, McGraw-Hill, Inc.. 1992. p.435-453
- MURILLO, B. Coffee-pulp silage. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. **Coffee pulp: composition, technology, and utilization**. Panamá: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987. p.55-62.
- OGITA, S.; UEFUJI, H.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, London, v.423, p.823-823, 2003.
- RICE, E.L. **Alelopathy**. 2. ed. Orlando, Academic Press, 1984.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. ed. **Alelopathy**. London: Chapman & Hall, 1992. p.443- 472.
- ROUSSOS, S.; AQUIAHUATL, A.; CASSAIGNE, J.; FAJELA, E.; GUTIERREZ, M.; HANNIBAL, L.; HUERTA, S.; NAVA, G.; RAIMBAULT, M.; RODRIGUEZ, W.; SALAS, J.-A.; SANCHEZ, R.; TREJO, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Detoxicacion de la pulpa de café por fermentacion solida. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA EN LA AGROINDUSTRIA CAFETALERA, I., Xalapa, México. **Resumos**. Xalapa: Instituto Mexicano del Café, s.d.. p.123-143.
- SCHWIMMER, S.; KURTZMAN, R.H., JR.; HEFTMANN, E. Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.147, p.109-113, 1971.
- SIDESO, O.F.P.; MARVIER, A.C.; KATERELOS, N.A.; GOODENOUGH, P.W. The characteristics and stabilization of a caffeine demethylase enzyme complex. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, p.693-698, 2001.
- SILVA, C.F.; SCWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.251-260, 2000.
- TAGLIARI, C.V.; SANSON, R.K.; ZANETTE, A.; FRANCO, T.T.; SOCCOL, C.R. Caffeine degradation by *Rhizopus delemar* in packed bed column bioreactor using coffee husk as substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, (Suppl.1), 102-104, 2003.
- VOGELS, G.D.; DRIFT, C.v.d. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. **Bacteriological Review**, Baltimore, v.40, p.403-468, 1976.

- WALLER, G.R.; KUMARI, D.; FRIEDMAN, J.; FRIEDMAN, N.; CHOU, C.-H. Caffeine autotoxicity in *Coffea arabica* L. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.-S. ed. **The Science of Allelopathy**. New York: John Wiley. 1986. p.243-269.
- WOOLFOLK, C.A. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on the caffeine as sole source of carbon and nitrogen. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v.123, p.1088-1106, 1975.
- YAMAOKA-YANO, D.M.; MAZZAFERA, P. Descafeinação da palha de café por bactérias. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, AGUAS DE LINDOIA, SP, BRASIL. **Resumos**. 1996.
- YAMAOKA-YANO, D.M.; MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by *Pseudomonas putida* isolated from soil. **Allelopathy Journal**, v.5, p.23-34, 1998.
- YAMAOKA-YANO, D.M.; MAZZAFERA, P. Catabolic pathway of caffeine and purification of a xanthine oxidase responsible for methyluric acid production in *Pseudomonas* L. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.70-78, 1999.

*Degradação Abiótica de
Xenobióticos*

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



I. Introdução

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

De todos os compostos que atingem o solo intencionalmente, os pesticidas merecem atenção especial, pois seu desaparecimento, persistência e transformação indicam sua eficácia como produto e seu perigo potencial para a microbiota, a qualidade do ambiente e a vida no planeta. Além disso, existem mais de 1.000 xenobióticos registrados como pesticidas, com uma grande variação na estrutura química das moléculas. Dos xenobióticos empregados como pesticidas 65% são herbicidas, 25% inseticidas e 7% fungicidas. Os restantes 3% incluem nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscicidas e outros. Em função da importância econômica dos pesticidas e da degradação ambiental que causam, alguns estudos têm sido feitos para o estabelecimento de características estruturais da molécula, que permitam a biodegradação desses químicos de modo a evitar danos ecológicos.

A degradação de uma substância em outra pode ser promovida por processos físicos, como o calor ou a irradiação ultravioleta, por reações químicas decorrentes do pH ou da ação de certas substâncias no ambiente, e por processos biológicos, através de enzimas existentes em animais, plantas e microrganismos. A biodegradação é o único processo que permite a degradação de um xenobiótico até CO_2 , H_2O , NO_3^- , e outros compostos inorgânicos, eliminando assim os produtos de transformação intermediária, muitas vezes tóxicos (ATLAS & BARTHA, 1993). As propriedades dos produtos originados da degradação dos pesticidas são geralmente diferentes das propriedades dos parentais, tanto na atividade biológica como em características de toxicidade, volatilidade e adsorptividade. Portanto, em relação aos compostos pesticidas, é necessário saber quanto do composto parental ou de sua atividade biológica permanece no solo ou na água, após determinados períodos de sua aplicação. Também é necessário identificar e quantificar os produtos da degradação. A não degradação de muitos xenobióticos acarreta seu acúmulo gradativo no ambiente com impacto a longo prazo, resultando na adaptação da biota com o estabelecimento de um novo equilíbrio no ambiente. Em função dos grupos funcionais, a estrutura química mais do que a quantidade aplicada do pesticida é de primordial importância para a degradação não biológica. Além disso, poucas

substâncias foram estudadas em relação à sua degradação não biológica no ambiente, tendo este capítulo a função de discorrer sobre a degradação abiótica através de uma vasta busca da literatura disponível.

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

2. Degradação química

São extremamente difundidos os fenômenos de transformações químicas que ocorrem no solo. Essas reações são mediadas pela água, que funciona como meio de reação, como reagente ou ambos. A hidrólise e a oxidação são fenômenos comuns nesse tipo de degradação, porém são pouco relatadas as reações químicas de isomerização. As reações de substituição nucleofílica, outras que não a hidrólise, podem ocorrer nos reagentes dissolvidos na solução do solo ou com grupos reativos do húmus do solo. Podem ocorrer também dismutações e reações com radicais livres (GORING *et al.*, 1975). Entende-se por dismutação o processo químico em que um elemento com um número de oxidação se transforma originando compostos em que o elemento tem dois ou mais números oxidação.

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

3. Reações hidrolíticas

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

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

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

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

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

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

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

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

do solo em volume e, muitas vezes, possa estar quase totalmente ausente, a fração orgânica também é muito importante para os processos de degradação. Ela adsorve e retém preferencialmente a maioria dos

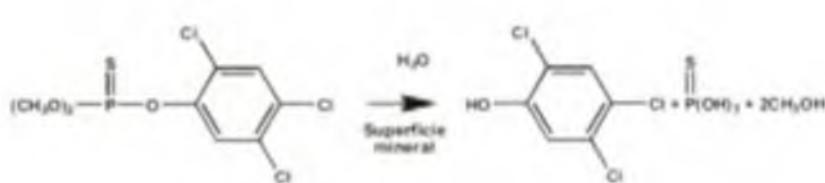


FIGURA 1. Hidrólise catalisada por argila.

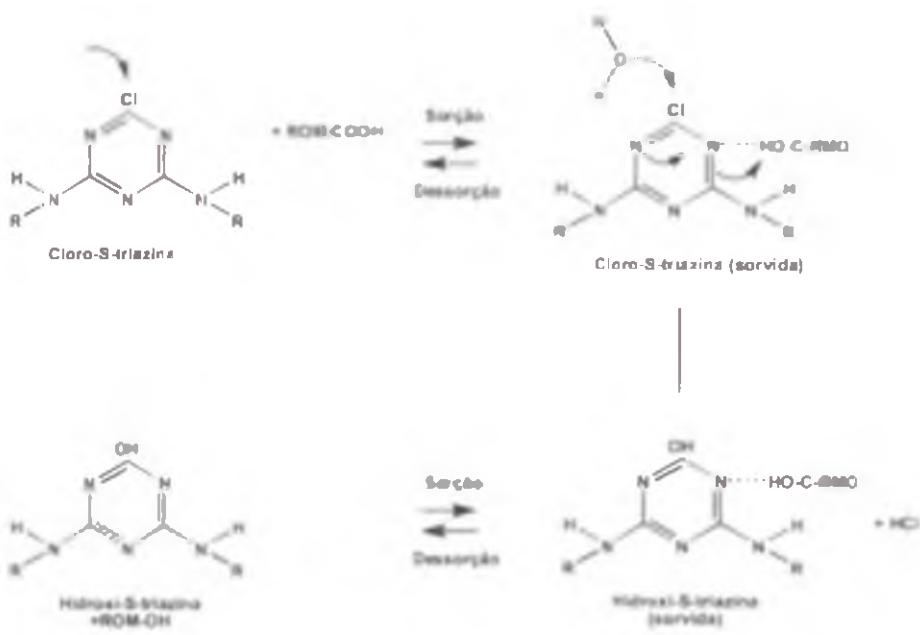


FIGURA 2. Modelo proposto para a hidrólise catalisada pela sorção em cloro-s-triazinas no solo (ARMSTRONG & KONRAD, 1974).

triazinas tem papel importante na degradação desses pesticidas (Figura 2). Armstrong *et al.* (1967) observaram a formação de hidroxiatrazina como produto de degradação da atrazina em percolados de colunas de solo. Essa hidrólise ocorreu em solo esterilizado a pH 3,9. A velocidade da hidrólise, ao mesmo pH, foi dez vezes maior na presença de solo do que em sua ausência, o que indicou que a hidrólise da atrazina foi catalisada pelo contato com o solo. Em pesquisas paralelas, Harris (1967) observou que a conversão parcial de atrazina, simazina e propazina a seus hidroxiderivados ocorreu durante a incubação do solo a 30°C por 8 semanas. Os hidroxiderivados não foram afetados pela adição de 200 ppm de azida de sódio, que é um inibidor microbiano.

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

pesticidas e torna disponível uma grande variedade de grupos funcionais reativos, além de ser o principal local de atividade microbiana. O carbono orgânico é importante adsorvente para os pesticidas no solo e há indicativos de que tem efeito nos processos bióticos e abióticos (WOLFE *et al.*, 1989).

No solo as reações catalisadas pela sorção envolvem, principalmente, dois grupos de pesticidas: os herbicidas cloro-s-triazinas e os inseticidas organofosforados. A hidrólise química das s-

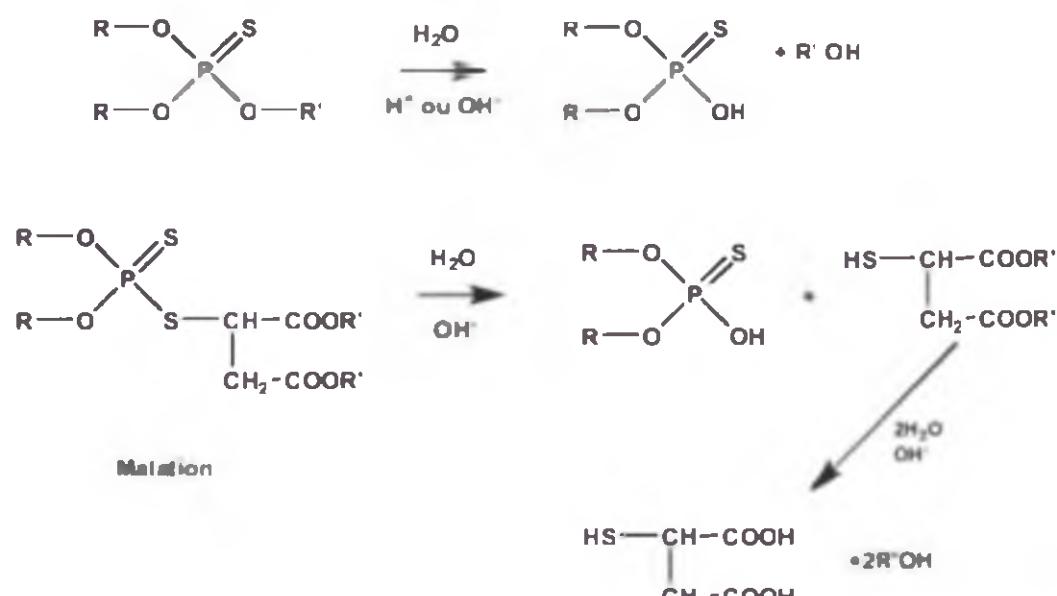


FIGURA 3. Rotas de degradação química de inseticidas organofosforados no solo.

são influenciados por fatores como sorção, temperatura, pH e a força iônica do sistema. Aparentemente os fatores mais importantes são o pH e a sorção (ARMSTRONG & KONRAD, 1974). Os organofosforados sofrem comumente hidrólise alcalina, o que resulta na detoxificação desses pesticidas. Além disso, a suscetibilidade desses compostos à hidrólise alcalina está relacionada à sua atividade biológica (KHAN, 1980).

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

4. Degradação fotoquímica

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

Pelos dados da literatura, a fotólise é dependente do compartimento do ambiente onde está o pesticida durante a irradiação. Os produtos formados pelas transformações induzidas pela luz solar são chamados de fotoproductos ou produtos da fotólise

O mecanismo de degradação química dos organofosforados envolve principalmente a hidrólise catalisada pela sorção das ligações éster. Essa hidrólise leva a uma degradação parcial, embora seus produtos exibam propriedades pesticidas (COWART *et al.*, 1971). A velocidade e os produtos da hidrólise dos organofosforados

(SOMASUNDARAM, 1991). A fotólise é primariamente um fenômeno de superfície e extremamente significante na vegetação, na superfície do solo, na água e na atmosfera. Dentro da faixa de comprimento de onda da luz ultravioleta emitida pelo sol (290 a 450 nm) existe energia suficiente para agir sobre os compostos químicos, provocando transformações. Portanto, fotólise direta só ocorrerá, se a molécula absorver radiações com comprimento de onda acima de 290 nm (PIERZYNSKI *et al.*, 1994).

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

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

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

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

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

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

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



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

A extensão da fotodegradação depende do tempo de exposição, da intensidade do comprimento de onda da luz, do estado físico do pesticida, da natureza do suporte sólido ou sol vente, pH da solução e presença de água ou fotossensibilizadores (KHAN, 1980). A irradiação se modifica com a latitude, estação do ano e hora do dia. A Figura 4 apresenta o espectro de distribuição da irradiação solar (E_0) em quatro diferentes épocas do ano (40° N) e demonstra como a luz solar varia estacionalmente, principalmente para curtos comprimentos de onda.

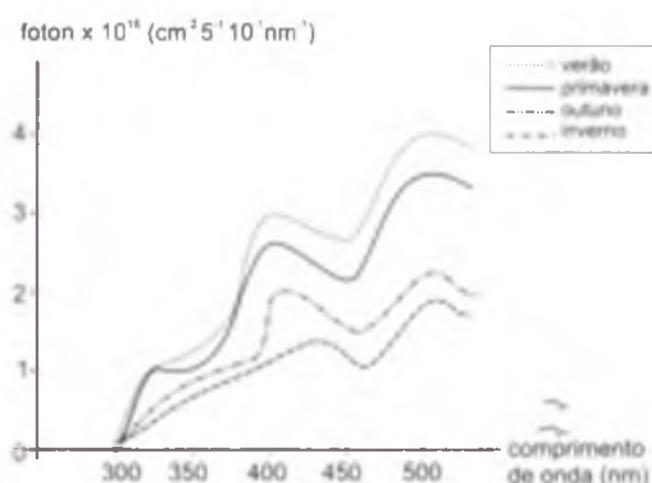


FIGURA 4. Irradiação solar que alcança a terra em quatro diferentes épocas do ano (WOLFE *et al.*, 1990).

Também os produtos microbianos podem promover reações fotoquímicas de dois modos: o primeiro é pela atuação dos produtos microbianos como fotossensibilizadores, isto é, que absorvem energia da luz e a transmitem à molécula do pesticida, e o outro modo é pela função dos produtos microbianos como doadores e aceptores de elétrons, ou grupos reagentes de compostos químicos, como, por exemplo, H^+ e HO^- , que são freqüentemente necessários para as reações fotoquímicas.

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

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

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

5. Hidrólise: reação nucleofílica

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

Na faixa da luz solar acima de 280 nm, a ligação H-OH não é quebrada para

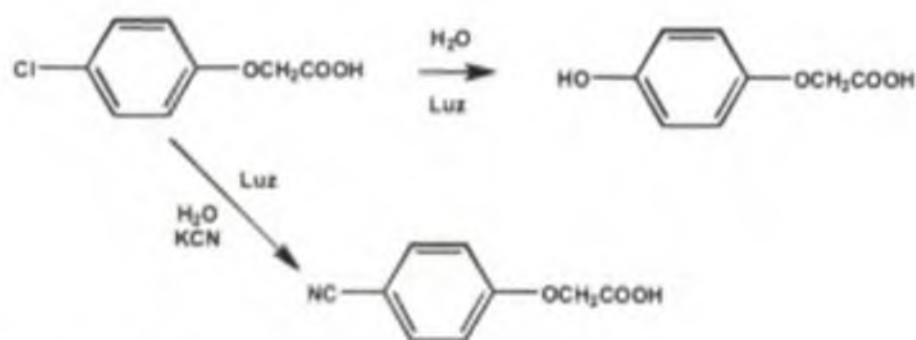


FIGURA 5. Reações fotoquímicas nucleofílicas.

fornecer o agente nucleofílico necessário para a reação (CASTRO, 1964). A fonte mais comum de agentes nucleofílicos neste caso é o íon hidroxila (OH⁻), o qual pode ser substituído pelo íon cianeto (CN⁻) para produzir o produto correspondente p-cianofenol.

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

6. Dealogenação

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

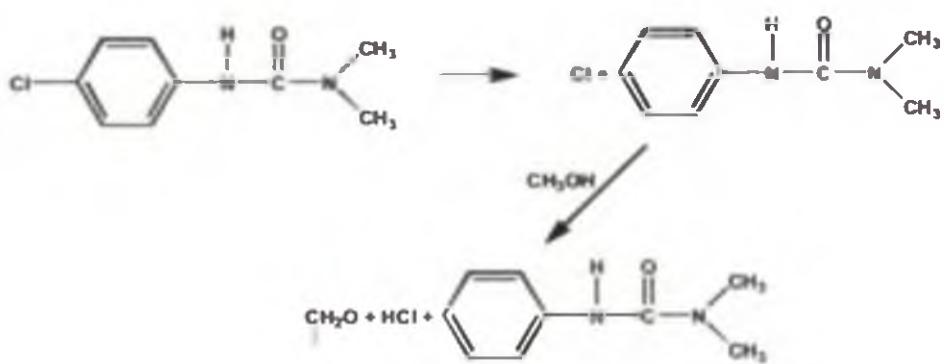


FIGURA 6. Decloração catalisada por reação fotoquímica.

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

7. Oxidação

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

As reações fotoquímicas de oxidação ocorrem normalmente como resultado das reações entre moléculas de pesticida fotoativadas e o oxigênio. Assim, essas reações ocorrem mais facilmente na atmosfera do que em soluções aquosas, apesar de que o oxigênio dissolvido em alguns casos pode reagir com os pesticidas para dar produtos oxidados. Talvez a reação fotooxidativa mais freqüentemente encontrada no campo dos pesticidas seja a conversão de P = S para P = O no caso dos organofosforados. Um processo de oxidação com significância toxicológica é essa

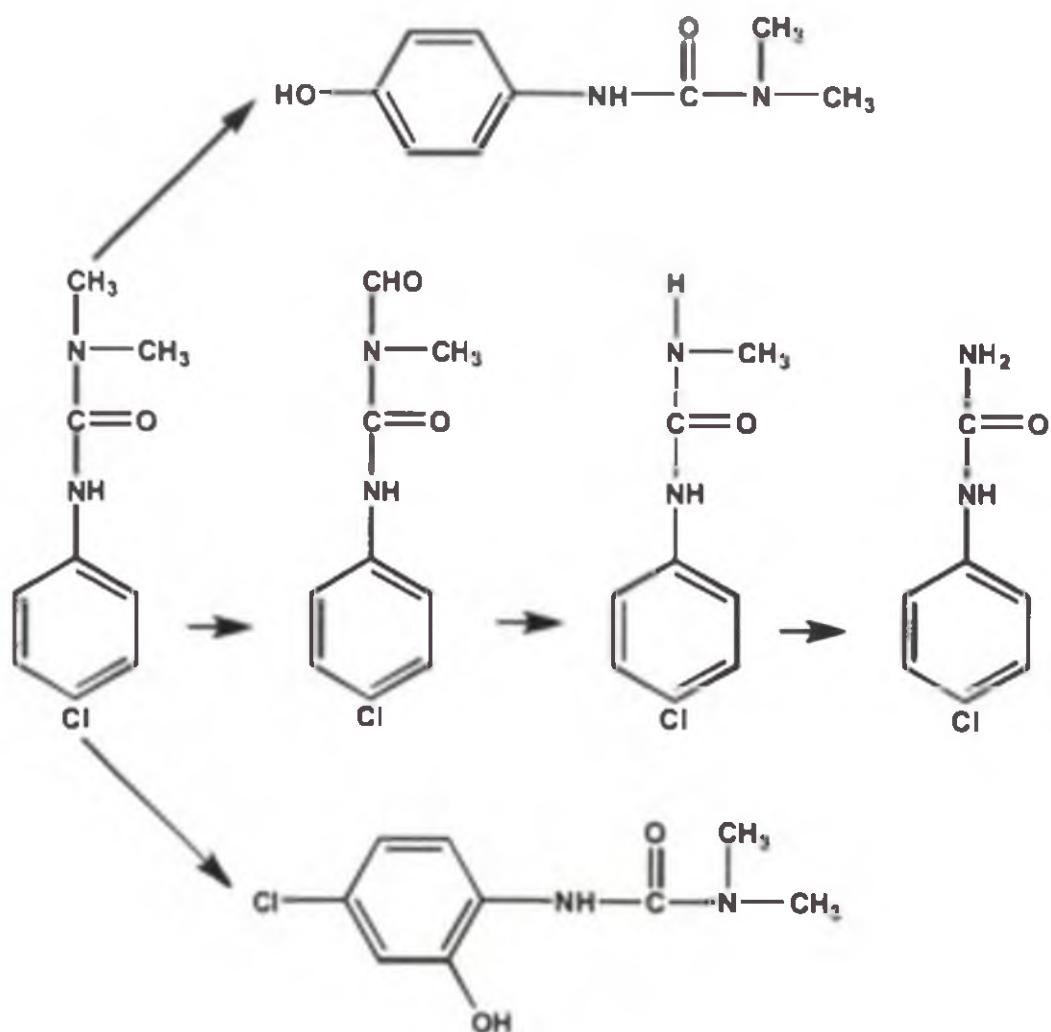


FIGURA 7. Fotooxidação do monuron.



FIGURA 8. Reação de conversão de paration a paraoxon.

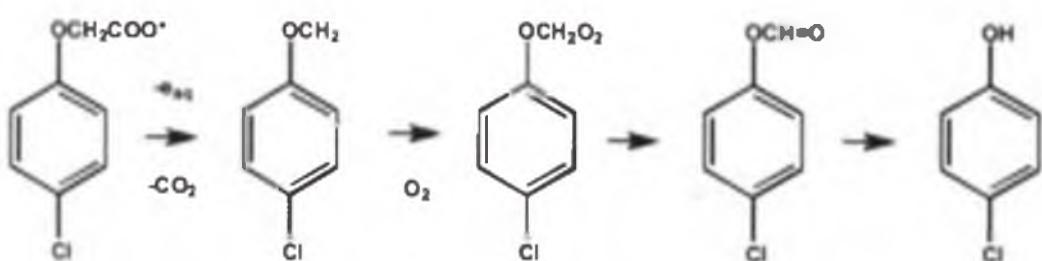


FIGURA 9. Fotooxidação de fenoxiherbicidas.

oxidativas, embora nesse caso as reações sejam complexas, e somente pode-se supor a natureza das reações envolvidas, através dos produtos formados. Por exemplo, a partir do resmetrin formam-se benzaldeído, ácido benzólico e 5-hidroxi-3-oxo4-fenil-1-ciclopentenil metanol. As piridinas também sofrem reações fotooxidativas, e como exemplo pode-se citar a reação de diquat e paraquat, dando carbonil e ácido carboxílico, respectivamente.

conversão de tiofosfatos para fosfatos, que geralmente resulta em compostos de maior toxicidade. O paration, por exemplo, é diretamente fotoxidado a paraoxon assim como o é indiretamente nas partículas do solo na presença de ozônio e luz UV (Figura 8) (WOLFE *et al.*, 1990). Isso é análogo ao processo de ativação por organismos superiores para compostos mais tóxicos (= potência anticolinérgica) (GRUMWELL & ERICKSON, 1973).

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

Os piretróides sofrem reações foto-

oxidativas, embora nesse caso as reações sejam complexas, e somente pode-se supor a natureza das reações envolvidas, através dos produtos formados. Por exemplo, a partir do resmetrin formam-se benzaldeído, ácido benzólico e 5-hidroxi-3-oxo4-fenil-1-ciclopentenil metanol. As piridinas também sofrem reações fotooxidativas, e como exemplo pode-se citar a reação de diquat e paraquat, dando carbonil e ácido carboxílico, respectivamente.

Os fenoxiherbicidas sofrem oxidação, redução e substituição, principalmente hidrólise, em soluções aquosas, quando ativados pela luz solar (Figura 9) (CROSBY, 1976).

8. Isomerização e Polimerização

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

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

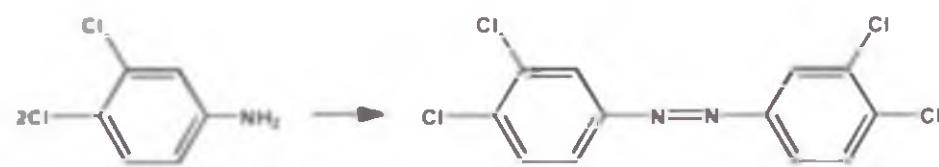


FIGURA 10. Dimerização de dicloroanilina.

9. Considerações finais

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

Referências

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1994. 302p.
- ARMSTRONG, D.E.; CHESTERS, G. Adsorption catalysed chemical hydrolysis of atrazine. **Environmental Science & Technology**, v.2, p.683-689, 1968.
- ARMSTRONG, D.E.; CHESTERS, G.; HARRIS, R.F. Atrazine hydrolysis in soil. **Proceedings of the Soil Science Society of America**, v.31, p.61-66, 1967.
- ARMSTRONG, D.E.; KONRAD, J.G. Nonbiological degradation of pesticides. In: GUENZ, W.D., ed. **Pesticides in soil and water**. Madison: Soil Science Society of America, 1974. p.123-131.
- ATLAS, M.R.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundaments and applications**. 3.ed. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993. 583p.
- BROWN, C.B.; WHITE, J.L. **Agronomy Abstract**, p.89. 1969.

- CASTRO, C.E. The rapid oxidation of iron (II) porphyrines by alkyl halides. A possible mode of intoxication of organisms by alkyl halides. *Journal of the American Chemical Society*, v.86, p.2310-2311, 1964.
- COWART, R.P.; BONNER, F.L; EPPS J.R., E.A. Rate of hydrolysis of seven organophosphate pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.6, p.231-234, 1971.
- CROSBY, D.G. Non-biological degradation of herbicides in the soil. In: AUDUS, L. J. ed. *Herbicides: physiology, biochemistry, ecology*. London: Academic Press, 1976. v.2, p.65-97.
- CROSBY, D.G.; LEITIS, E.J.J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.17, p.1036-1040, 1969.
- GORING, C.A.I.; LASKOWSKI, D.A; HAMAKEN, J.W.; MEIKLE, R.W. Principles of pesticide degradation in soil. In: HAQUE, H.; RIZWANUL; FREED, V.H., ed. *Environmental dynamics of pesticides*. New York: Plenum Press, 1975. p.135-172.
- GRUMWELL, J.R.; ERICKSON, R.H. Photolysis of parathion, o, o-diethyl,o-(4-nitrophenyl) thiophosphate new products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.21, p.929, 1973.
- HARRIS, C.I. Fate of two S-triazine herbicides in soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.15, p.157-162, 1967.
- KHAN, S.U. *Pesticides in the soil environment*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1980. 240p.
- MANAHAN, S.E. *Environmental chemistry*. 6 ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 811p.
- MATSUMURA, F. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In: MATSUMURA, F.; KRISHNA MURTI C.R., ed. *Biodegradation of pesticides*. New York: Plenum Press, 1982. p.67-87.
- MILLER, G.C.; HERBERT, V.R.; MILLER, W.W. Effect of sunlight on organic contaminants at the atmo-sphere-soil interface. In: SAWHNEY, B.L. BROWN, K., ed. *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p.99-110.
- MOILANEN, K.W.; CROSBY, D.G.; SODERQUIST, C-J.; WONG, A.S. Dynamic aspects of pesticide photo-decomposition. In: HAQUE.R.; FREED, V.H., ed. *Environmental dynamics of pesticides*. New York: Plenum Press, 1975. p.45-60.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T; VANCE, G.F. *Soils and environmental quality*. Boca Raton: Lewis Publishers: CRC Press, 1994. 313p.
- ROSEN, J.D. The photochemistry of several pesticides. In: MATSUMURA, F.; BOUSH, G.M.; MISATO, T. (Ed.). *Environmental toxicology of pesticides*. New York: Academic Press, 1972. p.435-447.
- RUZO, LO Photochemical reactions of the synthetic pyrethroids. In: HUTSON, D.H.; ROBERTS, TR. (Ed.). *Progress in pesticide biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1972. v.2, p.1-33.
- SOMASUNDARAM, L; COATS, J.R. Pesticide transformation products in the environment. In: SOMASUNDARAM, L; COATS, J.R. (Ed.). *Transformation products: fate and significance in the environment*. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. p.2-9.
- WOLFE, N.L; METWALLY, M.S.; MOFTAH, A.E. Hydrolitic transformations of organic chemicals in the environment. In: SAWHMY, B.L; BROWN, K., ed. *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Madison: Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1989. p.229-242.
- WOLFE, N.L; MINGELGRIN, U.; MILLER, G.C. Abiotic transformations in water, sediments and soils. In: CHENG, H.H., ed. *Pesticides in the soil environmental Processes: impact and modeling*. Madison, Soil Science Society of America, 1990. p.103-168.

Biodeterioração no Ambiente Construído

**Márcia A. Shirakawa, Vanderley M. John e
Maria Alba Cincotto**



Foto: Itaipu Binacional

I. Introdução

Nós, humanos, vivemos em ambiente construído. Embora transformar a natureza de forma a criar um ambiente mais adequado às condições seja prática comum a muitas outras formas de vida, são certamente os humanos os que levam mais longe esta prática: cidades, rodovias, aeroportos, hotéis na floresta, são espaços profundamente transformados, em uma tentativa de inclusão (ou exclusão) controlada do ambiente natural.

A natureza, no entanto, busca constantemente recuperar o espaço perdido. Conseqüentemente esta exclusão/inclusão controlada só é mantida à custa de vigilância permanente. As “pestes urbanas”¹ como aves, ratos, insetos diversos, tais como cupins, formigas, mosquitos, abelhas, escorpião, cobras e lagartos são uma preocupação constante em cidades. O uso de biocidas em larga escala tem sido a solução mais comum nestes casos, mas a introdução recente de conceitos como manejo integrado de pestes² aplicado a áreas urbanas começa a reconhecer a influência de soluções de engenharia e arquitetura no ambiente urbano, e até a influência de hábitos que os humanos exercem no desenvolvimento destes invasores (BRENNER *et al.*, 2003). A busca de uma compreensão maior destes processos e o estudo da ecologia deste novo ambiente, rapidamente mutável – o ambiente construído - levou ao surgimento de uma nova área de estudos, a ecologia urbana (COLLINS *et al.*, 2000).

A área de biodeterioração do ambiente construído é, portanto, uma área de interface entre engenharia, arquitetura e biologia, com grande necessidade de pesquisa interdisciplinar. Este capítulo discute as inter-relações da microbiologia com a engenharia a partir da literatura disponível e da experiência dos autores.

2. Biodeterioração e desempenho do ambiente construído

Todos os materiais, em contato com o meio ambiente, sofrem transformações. Estas transformações podem causar uma diminuição na capacidade que os mesmos têm de cumprir as funções a eles destinadas em uma construção particular e afetar o desempenho da construção como um todo. Neste sentido, a durabilidade de um material é a capacidade que ele tem de resistir a um processo de deterioração³, preservando a capacidade de desempenhar as funções a eles atribuídas.

Tal como definido, durabilidade não é uma propriedade do material. Isto quer dizer que não existe material muito durável ou pouco durável, dependendo a durabilidade

¹Urban pests. ²Integrated Pest Management. ³Na Engenharia o termo “degradação (ISO 15686)” é mais freqüentemente utilizado para descrever esta perda de capacidade do material de cumprir a sua função. Neste trabalho, destinado prioritariamente a microbiologistas, será utilizado o termo deterioração, empregado freqüentemente como sinônimo de degradação na área de engenharia.

da sua interação com os agentes de deterioração a que está sujeito, e da função que ele desempenha numa aplicação específica. Os agentes de deterioração incluem parâmetros ambientais como radiação, temperatura, água, o uso da construção, outros materiais presentes no edifício, e os seres vivos.

Para a engenharia moderna uma construção apresenta bom desempenho quando cumpre a função a ela destinada. E a função fundamental de qualquer construção é o atendimento das necessidades dos usuários, diretos ou indiretos. Estas necessidades variam de acordo com as funções de cada construção. Para o caso de edifícios as necessidades dos usuários usualmente adotadas estão apresentadas na Tabela 1.

A biodeterioração é um dos resultados da interação ambiente construído-natureza. É uma das interfaces entre a engenharia e a biologia. Associado a biodeterioração, está surgindo a área de biorremediação, que procura explorar as possibilidades de utilização benéfica de microrganismos no reparo de construções deterioradas.

Tradicionalmente, as pesquisas de biodeterioração investigam as transformações físicas e químicas (deterioração) provocadas por seres vivos, particularmente os microrganismos, nos materiais pétreos e metálicos. A biocorrosão de metais, o ataque ácido promovido por microrganismos em rochas calcárias e concretos são alguns dos exemplos de processos estudados. No entanto, a biodeterioração pode reduzir o desempenho do ambiente construído sem alterar fisicamente os materiais.

A simples colonização de superfícies por microrganismos causa, freqüentemente, grandes prejuízos à capacidade de desempenho dos edifícios, porque a presença de microrganismos e seus biofilmes alteram propriedades como cor, refletância, e capacidade de transporte de massa das superfícies (Figuras 1 e 2).

A Figura 1 apresenta o efeito da biodeterioração de domos zenitais confeccionados com poliéster e fibras de vidro. A presença de biofilme reduz a transparência do componente prejudicando a iluminação natural. A colonização da superfície é facilitada pela degradação da camada superficial (“gel coat”) do compósito pela ação combinada de radiação ultravioleta e temperatura, gerando uma superfície rugosa (FLAUZINO, 1988).

TABELA 1. Necessidades dos usuários, adaptada da ISO 6241.

Segurança	Adaptação ao uso
Estrutural	Conforto
Ao fogo	Acústico
No uso	Tátil
Estanqueidade	Antropodinâmico
Ao ar	Higrotérmico
Água	Economia
Pureza do ar	Durabilidade
Higiene	Preservação ambiental



FIGURA 1. Biodeterioração de iluminação zenital confeccionada em poliéster reforçado com fibras de vidro com aproximadamente 30 anos de idade. A presença de biofilme reduz a transparência do produto, afetando a sua função principal no edifício de propiciar iluminação natural, além de prejudicar a estética.



FIGURA 2. A foto da esquerda ilustra uma fachada cujo aspecto é freqüente em edifícios brasileiros; a superfície sobre a alvenaria é mais suscetível à colonização do que a superfície sobre o concreto. A foto da direita mostra o escurecimento de telhado de fibrocimento.

A alteração da cor das superfícies pelos biofilmes tem também impactos importantes no desempenho das construções. Inicialmente eles afetam a estética dos edifícios e são, no Brasil, responsáveis pela repintura dos edifícios muito antes da degradação da película de pintura. O escurecimento das fachadas e dos telhados afetam, também, a eficiência energética de edifícios ou o conforto de seus usuários: superfícies escuras absorvem mais radiação, aumentando as cargas térmicas e, na ausência de equipamento de refrigeração mecânica, aumentam a temperatura interna. Como os edifícios brasileiros são responsáveis por aproximadamente 50% do consumo da energia elétrica, a colonização de telhados e fachadas aumenta ainda mais o consumo de energia.

Além dos impactos econômicos – repintura e maior custo para climatização dos ambientes internos – estes processos de biodeterioração que alteram fundamentalmente apenas a superfície do material apresentam importante impacto ambiental, pois os biocidas, produtos tóxicos que a indústria de tintas acrescenta à formulação para controle da biodeterioração de superfícies pintadas, são lixiviados para o meio ambiente (TOGERÖ, 2004).

Assim sendo, a definição mais adequada aos modernos conceitos de engenharia é: biodeterioração é um dos processos que podem reduzir a capacidade de um produto atender às necessidades dos usuários, mesmo sem causar transformações físicas no material mensuráveis.

3. O estudo de durabilidade e a biodeterioração

Nos anos recentes um grande avanço foi conseguido no estudo da durabilidade de materiais de construção, com definição de uma metodologia geral capaz de gerar informações úteis para a engenharia atuar já na etapa de projeto, ou ainda antes, a produzir materiais mais adequados e desta forma prevenir o processo de degradação. Esta metodologia foi consolidada em uma série de normas ISO 15686 - *Buildings and Constructed Assets - Service Life Planning*.

Um avanço importante foi a constatação de que condições necessárias para o crescimento de microrganismos, ilustrado na Figura 3, como presença de água, temperatura e nutrientes, dependem tanto do clima quanto da solução de engenharia adotada, particularmente das propriedades dos materiais e de detalhes do edifício. A presença de água depende de condições climáticas, mas também de decisões de projeto, hábitos e atividades dos usuários e das propriedades dos materiais. A poluição, particularmente em ambientes urbanos, e os próprios materiais empregados, podem ser fonte de nutrientes.

O material de que se constitui o substrato, também tem um papel complexo e importante na influência do crescimento microbiano. Ele pode fornecer nutrientes, como é o caso dos filme de tintas à base de água, onde a presença de plastificantes, estabilizadores à base de amônia e de éteres de celulose podem ser fonte de nutrientes. A madeira é em si uma rica fonte de nutrientes. A rugosidade e porosidade dos materiais também podem influenciar o tempo que a superfície permanece úmida, pois podem alterar a capacidade de acúmulo de água e a deposição de poluentes atmosféricos. Superfícies pintadas sobre madeira tendem a criar um ambiente mais ácido, enquanto que materiais à base de cimento e cal produzem superfícies mais

alcalinas. As algas requerem altos níveis de umidade e condições favoráveis de luz e, em geral, desenvolvem-se em pH mais alcalino que os fungos que preferem pH ácido, na faixa de 4 a 7 (DENHAM, 1987).

Embora a presença de água seja imprescindível, não é necessário que o material permaneça úmido de forma contínua, pois muitas espécies, como *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium herbarum*, podem ficar latentes por longos períodos secos e recomeçar o crescimento após a reumidificação do material (DENHAM, 1987). Muitas espécies podem formar esporos de

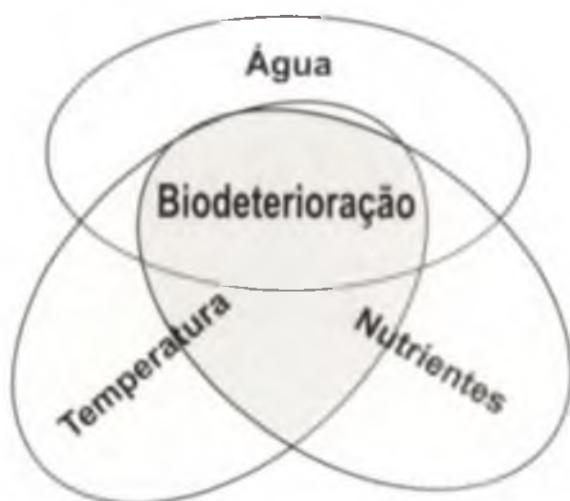


FIGURA 3. Condições para ocorrência de biodeterioração de materiais.



FIGURA 4. Mapa de risco relativo de biodeterioração da madeira nos EUA (SCHEFFER, 1971). O índice de risco varia entre 0 a 130.

resistência e manterem-se latentes por um período prolongado de tempo, que pode chegar a muitos meses, germinando quando as condições tornam-se favoráveis.

Apesar da influência do micro-clima propiciado por detalhes do edifício na biodeterioração, são extremamente úteis mapas que indiquem, a partir de dados climáticos, o risco de biodeterioração de determinados materiais expostos ao ambiente externo (Figura 4). Scheffer (1971), em trabalho pioneiro combinou resultados de estudo de laboratório que mostraram a influência da temperatura na velocidade de crescimento de fungos apodrecedores de madeira, com estudos de deterioração natural de amostras expostas em diferentes climas norte-americanos numa escala ampla de variáveis climatológicas. Os resultados tornaram possível produzir um mapa que apresenta o risco relativo de biodeterioração da madeira nos EUA, atribuindo índices que variaram entre 0 e 130, dependendo do clima local. FOLIENTE et al. (2001) apresentam modelo similar para o risco de apodrecimento de casas de madeira australianas, considerando inclusive detalhes de projeto.

4. Métodos de pesquisa

4.1 Estratégia de pesquisa

No estudo de construções existentes as amostras podem ser coletadas segundo um planejamento. Shirakawa *et al.* (2004), por exemplo, descrevem a coleta de

amostras retiradas de fachadas de dois edifícios no campus da USP, capital, acompanhando a colonização ao longo do tempo. A coleta de amostras foi realizada pela técnica do carpete adaptada a partir de Mariat e Adan-Campos (1967). Este método permitiu acompanhar diferentes fatores influenciando a biodeterioração, embora requeira ainda análise ao longo do tempo.

Ao tratar-se de estudo da bio-receptividade⁴ de materiais, outra alternativa é a produção de corpos-de-prova que serão expostos ao meio ambiente (externo, interno), em procedimento conhecido como envelhecimento natural, ou através de envelhecimento acelerado em câmaras de atmosfera controlada, caso em que é comum a prévia inoculação do substrato com microrganismos em estudo.

Para efetuar avaliação do desempenho de diferentes materiais de construção ao ataque por microrganismos podem ser realizados testes acelerados em laboratório. Nestes testes os materiais são expostos em condições controladas em laboratório e inoculados com concentração conhecida de microrganismos. Exemplos de ensaios acelerados de biodeterioração são as normas ABNT NBR 14941 (2003): *Tintas para construção civil- Determinação da resistência de tintas, vernizes e complementos ao crescimento de fungos em placa de Petri*; e NBR 15301(2005) *Determinação da resistência de tintas e complementos ao crescimento de fungos em câmara tropical* que avalia tintas em câmara tropical com temperatura e umidade controladas. Shirakawa *et al.*, (2003) desenvolveram teste acelerado para avaliar a bio-receptividade de argamassas a fungos. A Figura 5 ilustra o desempenho de duas argamassas industrializadas e duas argamassas convencionais inoculadas com *Cladosporium sphaerospermum*.

Um dos problemas dos testes que envolvem inoculação é que nem sempre estão disponíveis em coleções de cultura os microrganismos importantes no ambiente de uso. O gênero *Cladosporium* é o mais freqüente em superfícies de construções brasileiras. No entanto, até o momento, a manutenção de culturas em laboratório que possuem a mesma capacidade de colonização do encontrado no ambiente natural tem se revelado difícil. A existência de uma seqüência de colonização e a sinergia com outros parâmetros ambientais são fatores que explicam esta dificuldade.

Outras vezes, microrganismos existentes no ambiente não conseguem se desenvolver e se reproduzir em condições de laboratório da mesma forma que eles o fazem no ambiente natural.

A vantagem dos testes acelerados é a rapidez de execução. No entanto, não reproduzem condições reais de exposição como, por exemplo, a incidência de radiação ultravioleta que pode comprometer o crescimento de microrganismos, as taxas reais de lixiviação dos biocidas, além de não reproduzirem os ciclos de secagem e molhagem

⁴Bio-receptividade - Na área médica, o termo suscetibilidade é usado para descrever a vulnerabilidade de um organismo para doenças, especialmente doenças infecciosas. O termo bio-receptividade pode ser definido como a tendência de um material, ou outro objeto inanimado, para ser colonizado por um ou vários grupos de organismos, sem necessariamente sofrer biodeterioração. A colonização é importante porque ela está relacionada com as condições para ancoragem, desenvolvimento e multiplicação de microorganismos, favorecidas pelo material, excluindo a habilidade do mesmo de receber organismos de uma maneira fortuita. Este conceito implica numa relação ecológica entre o material e os organismos colonizadores. Em materiais rochosos, por exemplo, a bio-receptividade está relacionada, principalmente, às propriedades das áreas expostas aos elementos climáticos, tais como a rugosidade, porosidade, umidade e composição química da camada de superfície. A porosidade capilar é a principal propriedade do material que pode favorecer a colonização. Assim sendo, a bio-receptividade pode ser conceituada como a totalidade das propriedades dos materiais que contribuem para o estabelecimento, ancoragem e desenvolvimento de uma população de microorganismos, flora ou fauna (GUILLITTE, 1995).

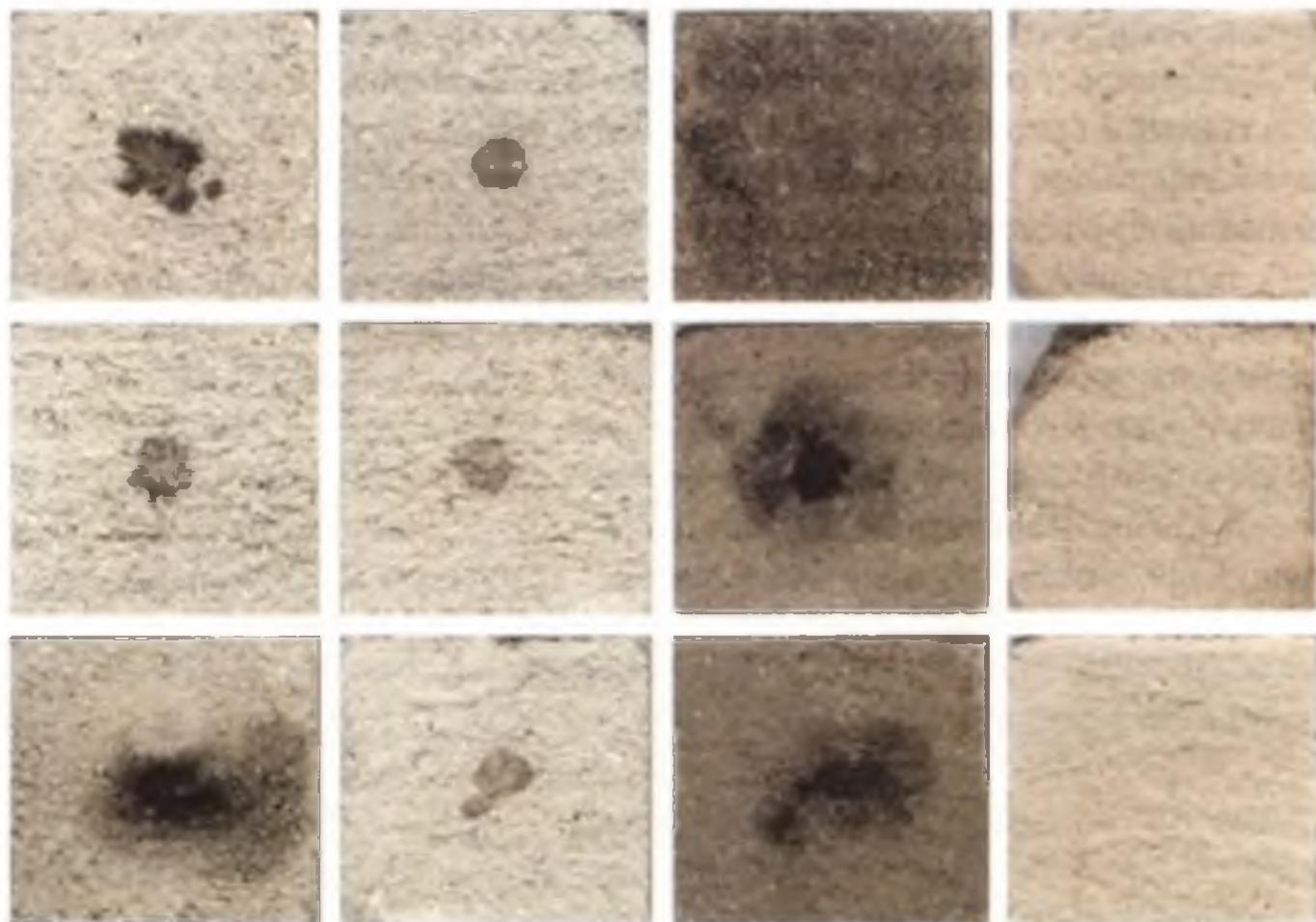


FIGURA 5 - Crescimento de fungo sobre diferentes argamassas. As argamassas 1 e 2 são misturadas, no laboratório, empregando cal, cimento e areia, e as argamassas 3 e 4 são industrializadas no mercado brasileiro, de composição desconhecida (SHIRAKAWA *et al.*, 2003 a).



FIGURA 6 - Visão geral da estação de envelhecimento natural em Belém do Pará (site). Ao fundo é possível observar a torre de registro de parâmetros meteorológicos.

representando quatro situações bastante diferentes, em termos de clima, poluentes do ar, isto é, condições muito variadas para a colonização de superfícies por microorganismos. A estação de Belém encontra-se próxima à área de floresta em região quente, úmida com chuvas muito freqüentes. A estação de Rio Grande, uma região subtropical de invernos frios e verões quentes, encontra-se à beira-mar. Nestas estações são monitoradas temperatura, vento (intensidade e direção), chuva (taxa de queda e pH), umidade relativa do ar, radiação total e UV, entre outros, permitindo o

que, junto com o tempo de superfície molhada, são fatores determinantes na velocidade da colonização microbiana e sua biodiversidade. Para execução de envelhecimento natural existe no Brasil a Rede DURAR – Rede Brasileira de Estações de Envelhecimento Natural para Estudo da Durabilidade que conta com quatro sítios para estudos de durabilidade por envelhecimento natural, que está disponível para a comunidade técnica, acadêmica ou industrial (<http://durar.pcc.usp.br>).

As estações estão localizadas em São Paulo, Rio Grande, Belém e Pirassununga. Em seu conjunto, constituem-se em climas típicos,



FIGURA 7 - Corpo-de-prova pintado com uma tinta acrílica 50% da área sem biocida e 50% com biocida após 18 meses de exposição. Aparentemente não há diferença na colonização das duas áreas.

estabelecimento de correlações entre parâmetros ambientais e o crescimento de microrganismos.

A Figura 6 apresenta uma visão geral da estação de envelhecimento em Belém do Pará e a Figura 7 apresenta uma tinta com e sem fungicida exposta por 18 meses na estação de Belém.

4.2 Detecção e identificação de microrganismos

Uma vez colhidas as amostras, é necessário identificar e quantificar microrganismos. Cada projeto tem exigências específicas quanto a este tema, existindo de forma geral algumas opções brevemente descritas a seguir.

4.2.1 Métodos de cultivo

Para avaliar o grau de contaminação microbiana de um material de construção, utilizam-se meios de cultivo específicos para selecionar os microrganismos de acordo com o seu metabolismo, se quimiolitolíticos, fototróficos, quimiorganotróficos, entre outros.

Sempre que possível os métodos quantitativos são preferíveis, uma vez que podem permitir a comparação do grau de contaminação em diferentes amostras. Podem ser utilizados meios líquidos de cultura, efetuando-se uma suspensão em agitação, diluições decimais seriadas e inoculação segundo a técnica dos tubos múltiplos para amostras desagregadas. Também é possível efetuar a técnica de “pour plate” para contagem de Unidades Formadoras de Colônias. Em amostras de superfícies a quantificação de fungos coletados pela técnica do carpete, por exemplo, permite diferenciar amostras de tintas com e sem fungicidas expostas ao ambiente e assim avaliar o desempenho de diferentes fungicidas ou formulações (GAYLARDE *et al.*, 2004; SHIRAKAWA *et al.*, 2002; SHIRAKAWA *et al.*, 2004).

4.2.2 Análise do ergosterol

O ergosterol é um indicador específico para quantificar biomassa fúngica. O uso deste método em ambientes internos permite que todos os fungos filamentosos e leveduras sejam determinados. Porém, ao contrário dos métodos clássicos de cultura, não fornece informação sobre a identificação dos fungos, fator importante para determinação de riscos à saúde, uma vez que alguns deles podem ser alergênicos. Entre as vantagens de ensaios por ergosterol podemos citar: rapidez, automação, sensibilidade e avaliação de fungos não viáveis. Este tipo de ensaio torna possível

determinar o grau da contaminação fúngica de materiais de construção danificados pela presença de água Hippelein & Rugamer (2004). Saad *et al.*, (2004) realizaram análise de ergosterol para determinar a contaminação fúngica em pinturas de tinta de base água.

4.2.3 Técnicas moleculares

Hernandez *et al.*, (2002) efetuaram determinação *in situ* de espécies ativas de *Thiobacillus* em concreto deteriorado em tubulações de esgoto com sondas fluorescentes de RNA. Através da hibridação fluorescente *in situ* (FISH) os pesquisadores quantificaram e identificaram bactérias sulfo-oxidantes de amostras de biofilme coletadas de concreto de tubulações de esgoto de Houston, Texas. A extração e amplificação de DNA genômico é um importante passo no desenvolvimento de métodos rápidos para a identificação de fungos em biofilmes de pinturas. O método desenvolvido por Saad (2004), por exemplo, é aplicável em amostras de pintura expostas ao ambiente.

4.3 Interação dos microrganismos com os materiais

Gaylarde *et al.*, (2003) publicaram uma revisão sobre o impacto ambiental dos materiais de construção na qual, também, são discutidas as técnicas utilizadas para análise da biodeterioração, entre as quais cita-se: espectroscopia de absorção atômica, microscopia de força atômica, análise química convencional, análise térmica diferencial, espectroscopia de dispersão de raios X, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica ambiental, microscopia de varredura a laser confocal, espectroscopia de infra-vermelho com transformadas de Fourier, análise por difração de raios X e fluorescência de raios X.



FIGURA 8. Micrografia da superfície da argamassa de cimento-cal-areia após três meses de incubação com *Cladosporium sphaerospermum* observando-se as hifas e cristais de um sal de cálcio (SHIRAKAWA *et al.*, 2003)

Algumas destas técnicas permitem caracterizar os biofilmes, enquanto outras permitem caracterizar as transformações ocorridas no material devido à atividade microbiana. A seleção das melhores combinações de técnicas depende da natureza do material e das características do biofilme. A Figura 8 ilustra uma micrografia da superfície da argamassa de cimento-cal-areia após três meses de incubação com *Cladosporium sphaerospermum*: observam-se as hifas do fungo e cristais depositados, provavelmente de carbonato de cálcio, uma vez que a espectroscopia por dispersão de raios X identificou somente a presença de cálcio. Como o fungo pode liberar ácido orgânico no seu metabolismo, admite-se que este tenha lixiviado o cálcio para a superfície da argamassa. A

carbonatação ocorreu pela reação com o CO₂ atmosférico-ambiente, ou pelo liberado do próprio fungo ou ambos.

5. Biodeterioração do resíduo da indústria de fertilizantes - fosfogesso

O fosfogesso é um importante resíduo industrial composto, principalmente, do sulfato de cálcio resultante do beneficiamento da apatita para geração de ácido fosfórico. Milhares de toneladas deste rejeito são geradas por ano e se somam aos grandes depósitos existentes no Brasil e no mundo. Sua acumulação em aterros é indesejável, pois os seus efluentes possuem caráter ácido e alteram a água do subsolo.

Como ocorre freqüentemente em resíduos industriais, a presença de contaminantes dificulta o processo de reciclagem. É sabido que fosfogessos podem ser radiativos, por exemplo. O produto em questão apresentava como contaminantes matéria orgânica, oriunda do processo de beneficiamento, e fósforo originado da rocha matriz, dentre outros.

Apesar destes problemas, a utilização de fosfogesso para confecção de componentes pré-moldados para revestimentos de interiores é uma alternativa ecológica descrita em outros países (NOLHIER, 1986). No Brasil, uma destas tentativas não obteve sucesso; este material apresentou crescimento de microrganismos após colocação *in loco* já nas edificações. Pesquisas realizadas por Shirakawa *et al.* (2002) indicaram que o fosfogesso analisado teve maior susceptibilidade ao crescimento de fungos que o gesso natural, provavelmente devido à presença de matéria orgânica remanescente do processo de beneficiamento da apatita.

Trichoderma foi o gênero de fungos mais encontrado neste material em pilhas de acondicionamento a céu aberto. Testes acelerados em laboratório utilizando uma cepa de *Cladosporium* spp. isolada de forro de banheiro de gesso, com colonização evidente, indicaram que este fungo comum em edificação úmida foi mais adequado a avaliação de diferentes fungicidas que um “pool” de fungos de coleção de cultura recomendados por norma americana para análise de tintas. A Figura 9 apresenta corpos-de-prova de gesso natural e fosfogesso analisados conforme norma ASTM



FIGURA 9. Corpos-de-prova de gesso natural e fosfogesso analisados conforme norma ASTM D3273 (1986) com pequenas modificações, utilizando uma cepa de *Cladosporium* isolada em São Paulo de forro de banheiro de gesso embolorado. Os dois corpos-de-prova da esquerda são de gesso natural e os dois da direita de fosfogesso.

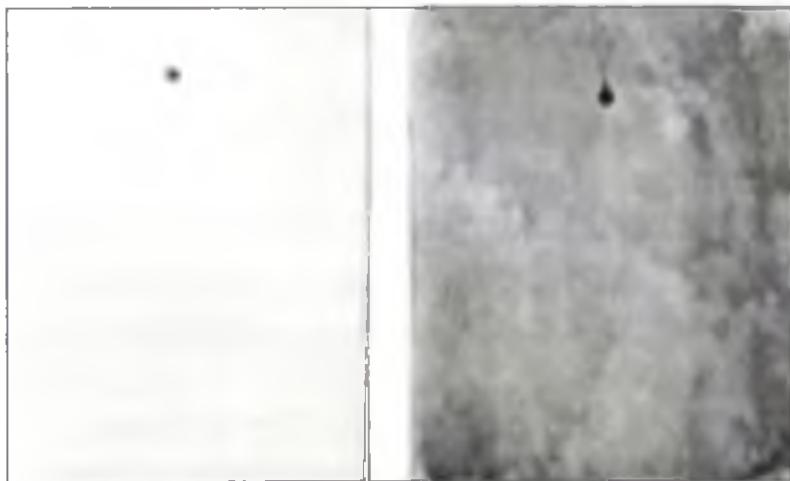


FIGURA 10. Na esquerda, corpo-de-prova de fosfogesso inoculado com fungos preconizados pela norma ASTM D3273 (1986) e *Cladosporium* spp. isolado de forro de banheiro de gesso embolorado.

econômica e que a eventual aplicação deste produto no mercado de gesso de construção dependeria de mudança do processo industrial com retirada da matéria orgânica utilizada.

6. Biodeterioração de fachadas pintadas

A biodeterioração de pinturas de tintas de base aquosa pode ocorrer nas fachadas de edifícios ou no seu interior em paredes e tetos com infiltração de água ou locais úmidos, com baixa ventilação, como tetos de banheiros.

A colonização de pintura externa de base aquosa por microrganismos como bactérias, fungos e algas é um fenômeno bastante freqüente em diversas regiões do planeta, sendo este um dos motivos da adição de biocidas em tintas. Os fungos são considerados os agentes mais deteriogênicos (GRANT, 1986; BRAVERY, 1988).

No Brasil a pintura representa cerca de 4% do total do custo de um edifício, cuja manutenção deve contar com re-pintura no máximo a cada de 5 anos, dependendo das características do edifício e da região geográfica (CONSTRUÇÃO MERCADO, 2001).

Em fachadas a colonização por microrganismos depende da freqüência com que a superfície permanece molhada, já que no meio urbano os poluentes podem servir comumente de fonte de nutrientes. Chuva e condensação superficial controlam o tempo no qual a superfície de um determinado material permanece úmida gerando uma intensidade de colonização variável, que muitas vezes segue padrões geométricos ditados por particularidades do substrato. As regiões mais altas das fachadas apresentam maior rapidez na colonização por fungos, indicando que a chuva contribui para o teor de água necessário à colonização microbiana (SATO *et al.*, 2002; SHIRAKAWA *et al.*, 2003).

A condensação na fachada depende do substrato do edifício, grau de exposição ao céu noturno e propriedades térmicas da superfície. A Figura 11 ilustra a colonização de fungos em partes da fachada, particularmente sobre camada onde parte do painel

D3273 (1986) com pequenas modificações, utilizando uma cepa de *Cladosporium* isolada de forro de banheiro de gesso embolorado; e a Figura 10 ilustra corpos-de-prova de fosfogesso inoculados com fungos preconizados pela norma ASTM D3273 (1986) e *Cladosporium* spp. isolado de forro de banheiro de gesso embolorado.

Os resultados permitiram concluir que o controle da biodeterioração por biocidas existentes no mercado brasileiro, na ocasião (1995), não se revelava solução



FIGURA 11. Intensa colonização por fungos, principalmente do gênero *Cladosporium*, em fachada de edifícios confeccionados com painéis pré-moldados em São Paulo (SATO *et al.*, 2002). Áreas escuras são as colonizadas mais intensamente e estão sobre isolamento térmico, favorecendo a condensação superficial.

mecânica, que não envolve necessariamente a utilização de componentes do filme de tinta. Em segundo lugar, a produção de metabólitos microbianos, principalmente ácidos orgânicos complexos, podem solubilizar o material. Por fim, a atividade enzimática também pode favorecer a deterioração. As tintas à base de água são particularmente suscetíveis ao ataque por fungos devido aos éteres de celulose, usados como agente de espessamento (GILLATT & TRACEY, 1987).

Segundo Gaylarde & Gaylarde (2005) os biofilmes de superfícies incluem algas, bactérias e fungos. Com relação às superfícies pintadas os fungos são prevalentes. A identificação dos fungos como biomassa das pinturas tanto na Europa quanto na América Latina tem uma importante implicação para as indústrias de tintas. Os fungicidas são importantes componentes das formulações de tintas. No entanto, a duração dos antifúngicos modernos é menor que a vida útil da película da pintura em si (GAYLARDE *et al.*, 2004). Este é um grande desafio para a cadeia industrial de tintas imobiliárias e passa pelo desenvolvimento de fungicidas para tintas que apresentem baixa taxa de lixiviação e boa estabilidade no filme de tintas, além de rápida degradação uma vez liberado no ambiente (GAYLARDE & GAYLARDE, 2005).

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que hifas de fungos filamentosos (Figura 12a) atravessam a película de pintura, mas não esclarece se a perfuração foi realizada pela hifa ou por outro mecanismo. Também foi confirmado o crescimento de fungos em região de interface entre a pintura e a argamassa (Figura 12b) (SHIRAKAWA *et al.*, 2004). Quando se trata de re-pintura foi observado que os fungos podem colonizar a superfície da pintura nova, a interface entre a pintura nova e a velha e a interface entre a pintura velha e a argamassa de revestimento. Assim, um procedimento adequado de desinfecção de pinturas velhas com fungos é

de concreto pré-moldado continha isolamento térmico em poliestireno expandido (isopor). Estas áreas apresentavam menor inércia térmica e, durante o período noturno apresentavam condensação intensa, resultando em maior tempo de superfície úmida, aumentando a taxa de crescimento de microrganismos. Em estruturas de concreto com paredes de blocos ou tijolos cerâmicos furados os microrganismos se desenvolvem inicialmente sobre os tijolos, onde a condensação é mais freqüente, gerando um retrato que parece uma imagem de Raios X do edifício (Figura 2). Somente em um estágio muito avançado colonizam a superfície sobre o concreto. A orientação da fachada também é decisiva, pois as fachadas que recebem menos sol são bem mais suscetíveis aos microrganismos.

O efeito dos microrganismos na pintura é ainda objeto de discussão, esta pode sofrer deterioração por várias vias. Primeiro, pela ruptura

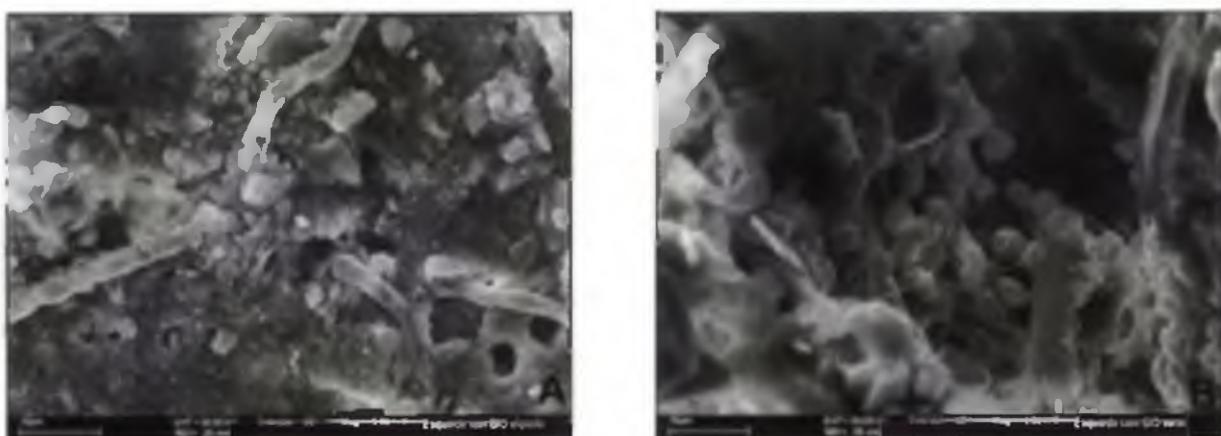


FIGURA 12. Crescimento de hifas com ruptura mecânica da pintura (a) e crescimento de fungos com produção de esporos na interface entre a pintura e o revestimento de argamassa (b) (SHIRAKAWA *et al.*, 2004).

importante no retardamento do aparecimento de fungos na pintura nova. Ao se comparar a colonização de dois edifícios diferentes, pintados com a mesma tinta Shirakawa *et al.*, (2004) observaram que detalhes construtivos e presença de água são fatores mais importantes que a simples adição de biocidas nas tintas.

7. Biodeterioração em ambiente interno e síndrome dos edifícios doentes

A qualidade do ar de interiores tem se tornado extremamente importante, uma vez que as pessoas, no mundo moderno, passam mais de 90% do seu tempo em ambientes fechados, muitas vezes em edificações hermeticamente seladas, mal ventiladas e, nos países frios, aquecidas. Além disso, problemas de umidade interna em decorrência da condensação, infiltrações de água através da parede e má ventilação são comuns tanto em residências como em locais de trabalho, podendo atingir, em países como Estados Unidos, na Europa e especialmente na Escandinávia, mais de 50% do total das edificações. Na Finlândia, acredita-se que existam mais de 80% de casas com problemas de umidade (REIJULA, 1996).

Os microorganismos que colonizam substratos em ambientes internos são aqueles provenientes do ar exterior que conseguem se desenvolver em materiais de construção ou outros materiais, no interior das edificações (LACEY, 1994; REIJULA, 1996).

Os fungos estão sempre presentes no ar externo, mas sua variação depende do período do dia, do clima, da estação do ano, da localização geográfica e da presença de fontes locais de esporos. Em climas temperados, os esporos de *Cladosporium* predominam em dias secos no verão, ficando *Alternaria* em segundo lugar (LACEY, 1994). O gênero *Cladosporium* foi também o mais freqüente, encontrado em 100% dos casos de investigação do ar interior de 28 bibliotecas da Universidade de São Paulo (GAMBALE *et al.*, 1993).

Os fungos têm um arsenal enzimático muito amplo, quase não existindo substrato que eles não possam colonizar. Em qualquer lugar da América do Norte os fungos *Cladosporium* sp. e *Alternaria* sp. apresentam-se como dominantes. O gênero

Cladosporium foi isolado com maior freqüência em amostras do ar e de superfícies de vários substratos e em casas com ar condicionado em comparação àquelas com ventilação natural. Condições particulares de certos cômodos favorecem a sobrevivência de alguns gêneros. Banheiros e quartos apresentam a maior diversidade de fungos. *Cladosporium* sp. foi o mais abundante em todos os cômodos, exceto em porão (COMTOIS & GARCIA, 1994). No Japão, Moriyama (1992) pesquisou a ocorrência de fungos em materiais de construção de banheiros de residências de diferentes cidades e encontrou *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp. em 100% das casas amostradas, seguidos por *Penicillium* sp. (95%), *Alternaria* sp. (75%). Em residências de indivíduos com alergia respiratória em São Paulo e São Bernardo do Campo, também foi detectado *Cladosporium* como gênero mais freqüente, seguido por *Penicillium* e *Aspergillus* (SHIRAKAWA *et al.*, 1998).

Gases emitidos durante o metabolismo de fungos em crescimento no interior de edificações podem ser uma fonte significativa de compostos orgânicos voláteis, causadores de problemas relativos à qualidade do ar de interiores. Muitos dos compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos foram idênticos àqueles originários de materiais de construção baseados em solventes orgânicos. Entre estes, incluem-se compostos como hexano, cloreto de metileno, benzeno e acetona (BAYER, 1996). SUNESSON *et al.*, (1996) observaram que culturas de *Penicillium commune* e *Paecilomyces variotti* em madeira, em combinação com painel de gesso e lã de vidro, liberam para a atmosfera álcoois, cetonas, éter e compostos terpenóides. Ainda se discute a contribuição dos voláteis liberados pelos microrganismos na poluição do ar do interior dos edifícios.

Durante a década de 90, tanto na Europa quanto na América do Norte, foi evidenciada a ocorrência de sintomas não específicos, relacionados à baixa qualidade do ar, freqüentes em pessoas que trabalhavam em escritórios, havendo uma diferença considerável na ocorrência dos sintomas em diferentes edifícios. Os modelos similares nos sintomas em diferentes áreas têm levantado o conceito de “Síndrome dos Edifícios Doentes”. De acordo com a Organização Mundial de Saúde esta síndrome é caracterizada pelos seguintes sintomas: irritação nos olhos; nariz e garganta; sensação de secura nas mucosas e na pele; eritema; fadiga mental; dor de cabeça; alta freqüência de infecções de vias aéreas e tosse; rouquidão; coceira e hipersensibilidade não específica; náusea e vertigem (JAAKKOLA, 1995).

8. Biodeterioração do concreto

O concreto – uma mistura de cimento Portland e agregados pétreos (os mais comuns são areia e brita), água e outros aditivos, é o material artificial mais utilizado pelo homem.

O primeiro caso histórico de biodeterioração de concreto foi registrado em 1945 no concreto de tubulações de esgoto de Melbourne - Austrália (PARKER, 1945). Esse autor comprovou a influência de bactérias quimiolitolíticas no processo de biodeterioração do concreto, com produção de ácido sulfúrico por oxidação de gás sulfídrico. Em 1983, na cidade de Hamburgo - Alemanha, vários quilômetros de

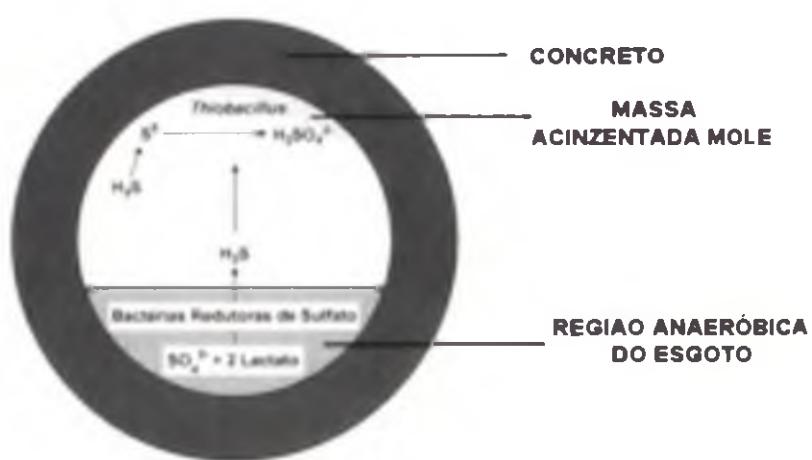


FIGURA 13. As bactérias redutoras de sulfato ao utilizarem matéria orgânica do esgoto como fonte de energia reduzem os sulfatos com produção de gás sulfídrico. O H_2S pode ser sofrer auto-oxidação a enxofre elementar, ambos os compostos podem ser oxidados por bactérias do gênero *Thiobacillus* com produção de ácido sulfúrico.

aos municípios milhões de dólares em todo o mundo. A teoria da biodeterioração do concreto descrita pela literatura explica os aspectos químicos e microbianos, mas ainda não apresenta informações necessárias para um modelo de previsão do ciclo de vida do concreto para este fim e nem determina procedimentos de manutenção e reparo (ROBERTS *et al.*, 2002). Os danos em tubulações de concreto para coleta de esgoto custa aos municípios milhões de dólares em todo o mundo (ROBERTS *et al.*, 2002).

No Brasil, a primeira evidência da ocorrência de microrganismos em concreto foi observada por Ribas (1990) através de técnicas de microscopia eletrônica, em amostras de concreto coletadas em Brasília-DF. O primeiro trabalho de quantificação em cultura e isolamento de microrganismos em concreto foi realizado por Shirakawa *et al.*, (1992), no qual foram encontradas bactérias heterotróficas, bactérias do gênero *Thiobacillus*, bactérias redutoras de sulfato e fungos em amostras de concreto de um reservatório de água na cidade de São Paulo.

A participação dos fungos nos fenômenos de biodeterioração de concreto tem assumido crescente relevância mostrando que não somente bactérias quimiolitotróficas são preponderantes neste processo. GU *et al.* 1998 evidenciaram que a presença de uma linhagem de *Fusarium* sp. acelerou o processo de deterioração do concreto; em experimentos de laboratório foi observado que este fungo pode penetrar no material e produzir ácidos orgânicos. Também, em experimentos de laboratório, Mc Cormack *et al.*, (1996) encontraram altos níveis de liberação de cálcio em amostras de concreto inoculadas com *Aspergillus glaucus*.

O caso mais grave de biodeterioração de concreto, registrado no Brasil, ocorreu em um túnel subterrâneo de concreto projetado na cidade de São Paulo por contaminação do solo com óleo diesel. Outro caso discutido é o da biodeterioração do concreto da marquise do anexo do Teatro Nacional, em Brasília, tombado pela

concreto de tubulações de esgoto necessitaram de restauração por sofrerem ataque ácido causado pelo desenvolvimento sucessivo de diferentes espécies de bactérias do gênero *Thiobacillus*, sendo que também foram encontradas bactérias heterotróficas e fungos (MILDE, 1983).

De modo geral, a fonte de enxofre é decorrente do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato. A redução do sulfato ocorre com a utilização da matéria orgânica presente no esgoto e consequente produção de gás sulfídrico. A Figura 13 ilustra este fenômeno.

Os danos em tubulações de concreto para coleta de esgoto custa aos municípios milhões de dólares em todo o mundo. A teoria da biodeterioração do concreto descrita pela literatura explica os aspectos químicos e microbianos, mas ainda não apresenta informações necessárias para um modelo de previsão do ciclo de vida do concreto para este fim e nem determina procedimentos de manutenção e reparo (ROBERTS *et al.*, 2002). Os danos em tubulações de concreto para coleta de esgoto custa aos municípios milhões de dólares em todo o mundo (ROBERTS *et al.*, 2002).

UNESCO como patrimônio histórico da humanidade. Finalmente, nesta seção será abordado um estudo de caráter preventivo, o monitoramento da água de drenos da barragem de Itaipu.

8.1 Contaminação por óleo diesel provoca biodeterioração de obra subterrânea

A contaminação do solo e de águas subterrâneas por hidrocarbonetos derivados do petróleo tem sido um problema freqüente em grandes cidades como São Paulo. A corrosão de tanques subterrâneos em postos de abastecimento, com conseqüente vazamento de combustível para o meio ambiente, tem sido a principal fonte deste tipo de poluente.

Um dos casos mais severos de biodeterioração do concreto no Brasil ocorreu em um túnel subterrâneo na cidade de São Paulo, cujas obras haviam sido paralisadas durante 5 anos. O túnel foi construído em um aquífero contaminado por hidrocarbonetos de petróleo decorrente de vazamento de óleo diesel em posto de combustível localizado próximo à obra. A análise da água coletada na região de colonização mais intensa revelou a presença de benzeno, tolueno e xileno, respectivamente 5.072, 5.718 e 1.532ppb. As análises também confirmaram a presença de óleo diesel.

Como a obra ainda não estava concluída, existiam inúmeros locais onde a água contaminada permeava a camada de concreto atingindo o interior da construção. Como o ambiente encontrava-se permanentemente fechado, com baixas condições de ventilação, formou-se um ambiente de elevada umidade relativa (98%), de temperatura amena (em torno de 22°C) e com concentração significativa de frações voláteis de hidrocarbonetos que serviam de fonte de nutrientes para alguns microrganismos.

Após 5 anos de exposição, as superfícies encontravam-se cobertas por biofilmes de aparência diversificada e em algumas regiões o concreto apresentava-se com baixa resistência mecânica, com textura gelatinosa ou completamente desagregadas. A Figuras 14 e Figura 15 ilustram situações de colonização do túnel por microrganismos.

Observadas em microscopia eletrônica, a presença de biofilme é também evidente. A Figura 16 é típica de uma região de concreto não contaminado que pode ser comparada com a área coberta por biofilme, apresentada na Figura 17, e com maior magnificação na Figura 9. O tipo de base e a fonte de nutrientes influenciaram a natureza do biofilme de maneira importante. A Figura 10 apresenta a superfície de um arame de aço presente no ambiente. Esta superfície,



FIGURA 14. Região do concreto na qual havia um foco de infiltração de óleo diesel proveniente do aquífero contaminado. A seta indica colonização por fungos sobre região na qual amostra de cerca de 10 cm de concreto já havia sido retirada e cujo vazamento ainda permanecia.



FIGURA 15. Colonização de fungos em aço de armaduras expostas. Como o aço não contém matéria orgânica, a provável fonte de nutrientes são os hidrocarbonetos voláteis.

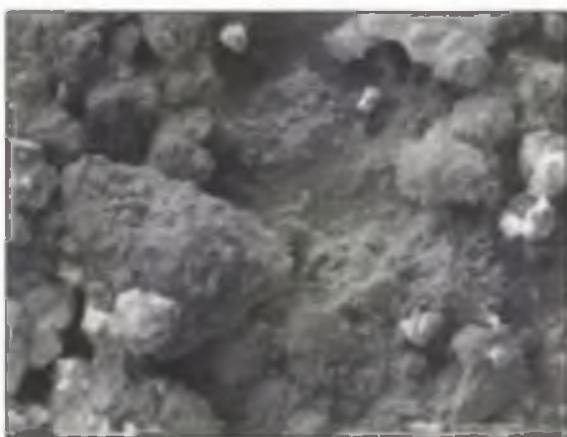


FIGURA 16. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura em região do concreto sem biofilme.



FIGURA 17. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura em região do concreto com biofilme.

microrganismos, que precisavam ser resolvidos antes das equipes de trabalho entrarem no túnel.

não porosa, extremamente lisa e sem contato direto com a água infiltrada apresenta biofilme totalmente diferente do encontrado no concreto (Figuras 18 e 19) exposto à água de infiltração.

Shirakawa *et al.*, (2000), encontraram elevadas concentrações de bactérias heterotróficas, bactérias redutoras de sulfato, *Thiobacillus* neutrofílicos e fungos do gênero *Scedosporium* em regiões com biofilme evidente. Superfícies acima no nível do lençol freático e armaduras expostas apresentaram-se colonizadas por fungos do gênero *Penicillium*.

O pH da água em equilíbrio com o concreto, que inicialmente se encontra em torno de 13, apresentava valores que indicavam tendência à neutralização em ambos os lados do túnel e acidificado, com pH 6,5 em região com biofilme aparente e intensa contaminação por óleo diesel.

Baseado em hipótese de Karavaiko (1989), o mecanismo de biodeterioração proposto por este pesquisador incluía a infiltração de água ácida com pH 5 iniciando o processo de redução de pH na superfície do concreto pela lixiviação de minerais alcalinos, facilitando a colonização por microrganismos. Nesse caso supõe-se que os primeiros colonizadores tenham sido os fungos e bactérias heterotróficas capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, com consequente consumo de oxigênio e formação de micro-regiões anaeróbias. Na ausência de oxigênio as bactérias redutoras de sulfato são favorecidas, produzindo gás sulfídrico e este por sua vez pode ser oxidado por bactérias do gênero *Thiobacillus* produzindo ácido sulfúrico.

Embora em nenhum momento a estabilidade do túnel tenha sido ameaçada, a presença de biofilme na superfície inviabilizava a continuidade da obra, pois impedia a aderência da camada de concreto de acabamento. Havia, também, problemas de contaminação do ar por

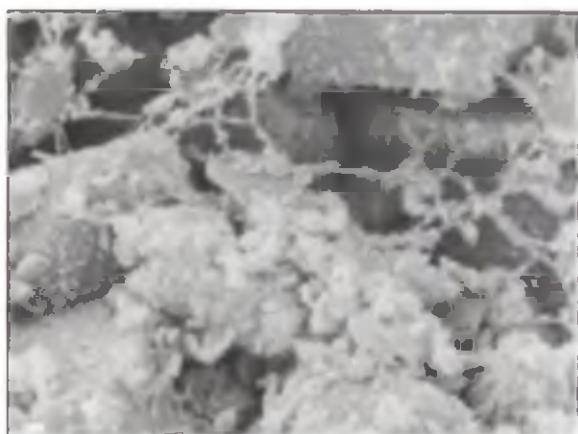


FIGURA 18. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura em região do concreto com biofilme. Na região superior, à esquerda, observa-se material cimentício suspenso por bactérias.

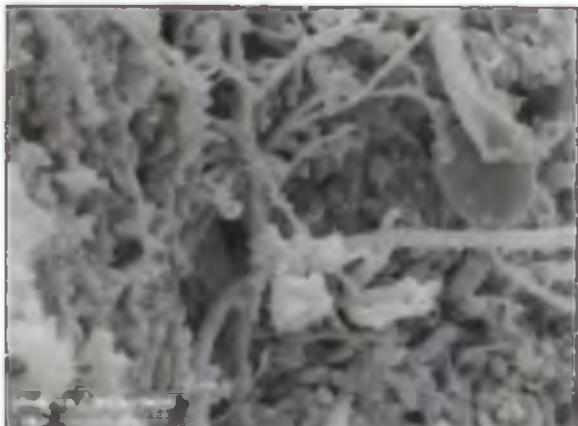


FIGURA 19. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura em região de metal com biofilme exposto no túnel.



FIGURA 20. Vista do anexo do Teatro Nacional, sob o jardim e a rua, as amostras foram coletadas no teto da marquise abaixo da rua (RIBAS *et al.*, 2004).

A solução passou por diferentes etapas: a) eliminação da contaminação das superfícies pelos microrganismos, por combinação de hidrojateamento e aplicação de produtos clorados; b) eliminação dos pontos de infiltração de água contaminada – fonte de nutriente e de umidade necessários ao desenvolvimento dos microrganismos; e, c) remoção mecânica dos concretos contaminados seguida de reparo. A descontaminação do solo embora necessária do ponto de vista ambiental e da saúde, não estava sob controle da empresa proprietária da obra.

8.2 A biodeterioração da marquise do anexo do Teatro Nacional em Brasília

Os monumentos de concreto armado de Brasília foram considerados pela UNESCO em 1987, como patrimônio cultural da humanidade. O Teatro Nacional de Brasília foi um dos monumentos de concreto armado objetos de pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em projeto de cooperação internacional entre Brasil e Alemanha (RIBAS *et al.*, 2004). Entre vários monumentos de concreto armado, o da marquise do Teatro Nacional (Figura 20) foi o que apresentou maior deterioração evidente. As análises microbiológicas indicaram teste presuntivo positivo para *Thiobacillus* neutrofílicos e ocorrência de *Cladosporium* spp. Este fungo também foi observado através da microscopia eletrônica em amostra cujo teor de cálcio estava diminuído no concreto. A capacidade de produção de ácidos por estes microrganismos e consequente dissolução de compostos cálcicos pode ser um dos fatores que explicariam a depleção de cálcio nas amostras de concreto analisadas. As Figura 21 e Figura 22 mostram imagens de bacilos e bactérias filamentosas em amostras analisadas por microscopia eletrônica de varredura.



FIGURA 21. Bactérias na forma de bacilos sobre amostra coletada apresentando regiões do quartzo solubilizado (RIBAS *et al.*, 2004).

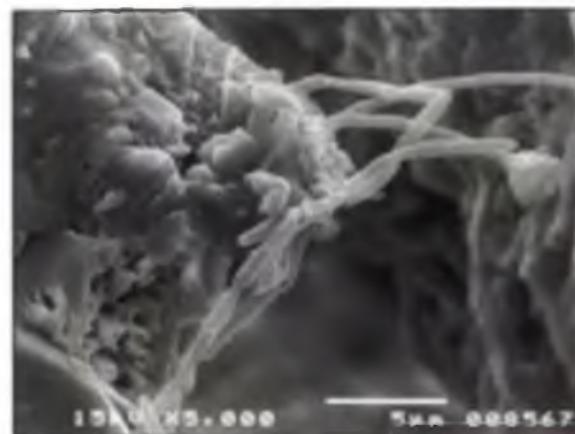


FIGURA 22. Bactéria filamentosa próxima a região com carbonato de cálcio solubilizado (RIBAS *et al.*, 2004).

8.3 Monitoramento microbiológico de água em drenos em barragem de concreto

A construção de barragens hidroelétricas traz consigo uma série de impactos ambientais. O represamento da água causa a alteração da flora e da fauna, mas as transformações biogeoquímicas ocorridas nas áreas inundadas em países tropicais, com biodiversidade extremamente rica como o Brasil, são desconhecidas. Rotineiramente são realizadas apenas análises de índice de coliformes fecais da água represada para investigar possível contaminação por esgoto clandestino.

Sabe-se que os ciclos biogeoquímicos na natureza transformam os compostos inorgânicos e orgânicos produzindo ora substâncias oxidadas, ora reduzidas, em algumas etapas, com geração de ácidos em meio aquoso. O represamento de grandes áreas de florestas, contendo vegetação diversificada, animais e insetos, produz um sistema aquático com a morte de diferentes organismos que irão sofrer decomposição ao longo do tempo, aumentando a matéria orgânica dissolvida. Santos (2002) realizou estudo quantitativo automatizado no monitoramento de microrganismos ambientais em amostras de água de drenos da barragem de Itaipu (Figura 23). Foram efetuadas quantificação de bactérias

heterotróficas, fungos e *E. coli*. Também foram determinados o valor de pH das mesmas amostras. A água represada no reservatório apresentou em média pH 7,3, enquanto as amostras coletadas nos drenos após percolar o concreto, por ser este alcalino, apresentou em média pH 8,3. De um total de 372 amostras, 3,5% apresentaram pH entre 7,0 e 7,5 após 18 anos de exposição. Neste contexto não é possível efetuar qualquer afirmação sobre a biodeterioração do concreto, mas ressalta-se a importância de se registrar e monitorar estes parâmetros associados à biodiversidade microbiana e pH da água percolada em obras cuja durabilidade está prevista para 100 anos.



FIGURA 23. Vista da usina de Itaipu, onde a preocupação com a prevenção da biodeterioração foi objeto de pesquisa (Foto: Itaipu Binacional).

Referências

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. ASTM D3273 1986 (2000). Standard Test Method for Resistance to Growth of Mold on the Surface of Interior Coatings in an Environmental Chamber.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR14941 (2003). Tintas para construção – Determinação da resistência de tintas, vernizes e complemento ao crescimento de fungos em placa de Petri.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.NBR 15301 (2005) Determinação da resistência de tintas e complementos ao crescimento de fungos em câmara tropical.
- BACHMANN, M.O.; TURCK, W.A.V.; MYERS, J.E. Sick building symptoms in office workers: a follow-up study before and after changing buildings. *Occupational Med.* v.45, n.1, p.11-5, 1995.
- BAYER, C. Moulds, fungi cause sick building syndrome. *Occupational Health SOF*. v.65, n.1, p.13-4, 1996.
- BRAVERY, A.F.: Biodeterioration of paint – a state-of-the-art comment. In: HOUGHTON, D.; SMITH, R.N., EGGIN, H.O.W. (Ed.). *Biodeterioration*. Barking: Elsevier, 1988. p.466-485.
- BRENNER *et al.* Integrated Pest Management in an Urban Community: A Successful Partnership for Prevention. *Environmental Health Perspectives* v.111, n.13, p.1649-1653, 2003.
- COLLINS, J.P.; KINZIG, A.P.; GRIMM, N.B.; FAGAN, W.F.; HOPE, D. Wu, J.; BORER, E. T. A new urban ecology. *American Scientist*. v.88, p.416-425, 2000.
- COMTOIS, P.; GARCIA, B.E. Indoor Mycology: The North American experience. In: SINGH, J. (Ed.). *Building Mycology*. London: Chapman & Hall, 1994. p.260-79.
- CONSTRUÇÃO MERCADO, Custos de Construção. Pini, São Paulo, v.54, n.3, p.360, 2001.
- DENHAM, K. Microbial spoilage of surface coating and its control. *Paint & Resin*. June, p.14-41, 1987.
- FLAUZINO, W.D. Durabilidade de materiais e componentes das edificações. *Tecnologia de Edificações*. São Paulo, Pini/IPT, p.79-84, 1998.
- FOLIENTE, G.C., LEICESTER, R.H. WANG, C.; MACKENZIE, C.; COLE, I. Durability design for wood construction. *Forest Products Journal* v.52, n.111, p.10-19, 2002.
- GAMBALE, W.; CROCE, J.; COSTA MANSO, E.; CROCE, M.; SALES, M. Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. *Journal of Investigative Allergology and Clinical Immunology*. v.3, n.1, p.45-50, 1993.
- GAYLARDE, C.C., SILVA, M.R., WARSCHIED, T. Microbial impact on building materials: an overview. *Materials and Structures*, v.36, June, p.342-352, 2003.
- GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration & Biodegradation* v.55, p.131-139, 2005.
- GAYLARDE, P.M.; SHIRAKAWA, M.A.; JOHN, V.; GAMBALE, W.; GAYLARDE, C.C.; Statistical analysis of fungicidal activity in paint film in two buildings. *Surface Coatings International Part B - Coating Transactions*. v.87, n.4, p.261-264, 2004.
- GILLATT, J.W.; TRACEY, J.A. The biodeterioration of applied surface coatings and its prevention. (Proceedings of the summer meeting of the Biodeterioration Society held at TNO Division of Technology for Society, Delf, The Netherlands 18-19 September, 1986). In: MORTON, L.H.G. *Biodeterioration of Constructional Materials. Proceedings of the Summer Meeting*. U.K Biodeterioration Society, 1987. p.103-112.
- GUILLITTE, O. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of the Total Environment*. v.167, p.215-30, 1995.
- GRANT, C. Fouling of terrestrial substrates by algae and implications for control - a review. *International Biodeterioration Bulletin*. v.18, p.57-65, 1986.
- GU, Ji-Dong; FORD, T.E.; BERKE, N.S.; MITCHELL, R. Biodeterioration of concrete by fungus *Fusarium*. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, v.41, p.101-109, 1998.
- HERNANDEZ, M.; MARCHAND, E.A.; ROBERTS, D.; PECCIA, J. *In situ* assessment of active *Thiobacillus* species in corroding concrete sewers using fluorescent RNA probes. *International Biodeterioration & Biodegradation* v.49, p.271-276, 2002.
- HIPPLELEIN, M.; RUGAMER, M. Ergosterol as an indicator on mould growth on building materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. v.207, p.379-385, 2004.

- JAAKKOLA, J.J.K.; MIETTINEN, P. Type of ventilation system in office buildings and Sick Building Syndrome. **American Journal of Epidemiology**, v.141, p.755-65, 1995.
- KARAVAICO, G.I.; ZHEREBYAT'EVA, T.V. Bacterial corrosion of concrete. **Dokl. Akad. Nauk. SSSR**, v.306, n.2, p.477-481, 1989.
- LACEY, J. Indoor aerobiology and health. In: SINGH, J. (Ed.). **Building Micology**. London, Chapman & Hall, 1994. p.77-129.
- MARIAT, F.; ADAN-CAMPOS, C. La technique du Carré de tapis méthode simple de prévention dans mycoses superficielle. **Annales de l'Institut Pasteur**, v.113, p.666-8, 1967.
- McCORMAK, K.; MORTON, L.H.G., BENSON, J., OSBORNE, B.N.; McCABE, R.W. A preliminary assessment of concrete deterioration by microorganism. In: **Labs 2 - Biodegradation and biodeterioration in Latin America**. Gaylarde, C.C.; de Sá, E.L.S.; Gaylarde, P.M. Porto Alegre : MIRCEN, Mar 1996 p.68-70.
- MILDE, K.; SAND, W.; WOLFF, W.; BOCK, E. *Thiobacilli* of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. **Journal General of Microbiology**, v.129, p.1327-33, 1983.
- MORIYAMA, Y.; NAWATA, N.; TSUDA, T.; NITTA, M. Occurrence of Moulds in Japanese Bathrooms. **International Biodegradation and Biodegradation**, v.30, p.47-55, 1992.
- NOLHIER, M. Construire en la plâtre. L'Harmattan, Paris, 1986.
- PARKER, C.D. The corrosion of concrete. The isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmosphere containing hydrogen sulphide. **Journal Biology Experimental Medicai Science**, v.23, p.81-90, 1945.
- REIJULA, K. Buildings with moisture problem. **Scand. Journal of Work and Environmental Health**, v.22, p.1-3, 1996.
- RIBAS SILVA, M. Étude de la microstructure du béton sous l'influence de variations hygrométriques importantes. Paris, 1990. Thèse doctorat de L'ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉS. Paris.
- RIBAS SILVA, M.; SILVA, E.F.; SHIRAKAWA, M. Biodeterioration of reinforced the concrete of the National Theatre of Brasília – A preliminary study. **Cemento Hormigon**, 867, p.14-24, 2004.
- ROBERTS, D.J.; NICAS, D.; ZUO, G.; DAVIS, J.L. Quantifying microbially induced deterioration of concretes: initial studies. **International Biodegradation & Biodegradation**, v.49, p.227-234, 2002.
- SAAD, D.S.; KINSEY, G.C.; KIMB, S.; GAYLARDE, C.C. Extraction of genomic DNA from & filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings. **International Biodegradation & Biodegradation**, v.54, p.99-103, 2004.
- SAAD, D.S. Ergosterol as a quantitative indicator or biodeterioration materials. In: **Fifth LABS**, 2004, Campeche. Fifty Latin American Biodegradation and biodegradation Symposium, 2004. v.01, p. 09-11
- SANTOS, L.C. Estudo quantitativo automatizado no monitoramento de microorganismos ambientais em drenos da barragem de concreto de Itaipu. 2002. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná,
- SATO, N.M.N.; UEMOTO, K.L.; SHIRAKAWA, M.A.; SAHADE, R.F. Condensação de vapor de água e desenvolvimento de microrganismos em fachadas de edifícios - Estudo de Caso. In: **Encontro Nacional de Tecnologia do Ambiente Construído**. IX Foz do Iguaçu. Pr. Brasil, 2002. Anais. [CD ROM].
- SCHEFFER, T.A. Climate Index for Estimating Potential for Decay in Wood Structures Above Ground Forest Products Journal, v.21, n.10, p.25-71, 1971
- SHIRAKAWA, M.A.; TAPPER, R. BEECH, I.B.; CINCOTTO, M.A.; GAMBALE, W. The development of a method to evaluate bio-receptivity of indoor mortar plastering to fungal growth. **International Biodegradation and Biodegradation**, v.51, p.83-92, 2003(a).
- SHIRAKAWA, M.A.; GAMBALE, W.; GAYLARDE, C.; GAYLARDE, P.; SATO, N.; JOHN, V. Acompanhamento da colonização de fungos em pinturas de fachadas durante 22 meses em São Paulo. In: **Congresso Internacional de Tintas**, 8, São Paulo, 2003. Anais. São Paulo. Abrafati, p.403-412, 2003(b).
- SHIRAKAWA, M.A.; JOHN, V.M.; GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M.; GAMBALE, W. Mould and phototroph growth on masonry facades after painting. **Materials and Structure**, v.37, (271), 2004.
- SHIRAKAWA, M.A.; GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M.; JOHN, V., GAMBALE, V. Fungi Colonization and succession on newly painted building. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, n.2, 165-173, 2002.
- SHIRAKAWA, M.A.; JOHN, V.M.; CINCOTTO, M.A.; GAMBALE W. Concrete biodeterioration associated to diesel fuel oil contamination and selecting test attempt for repairing material. In: **International Rilem Workshop Microbial Impact on Building Materials**, 1. São Paulo, Julho 2000. Proceedings... Rilem, Cachan, 2000 [CD ROM].

- SHIRAKAWA, M.A.; SELMO, S.M.; CINCOTTO, M.A.; GAYLARDE, C.C.; BRAZOLIN, S.; GAMBALE, W. Susceptibility of phosphogypsum to fungal growth and the effect of various biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.49 n.4, p.293-298, 2002.
- SHIRAKAWA, M.A.; SATO, M.I.; SANCHES, P.S.; CINCOTTO, M.A.; RZYSKI, B.M. Deterioração do concreto associada a ocorrência de *Thiobacillus*. In: LATORRE, W.C. & GAYLARD, C.C. (Coords.). **Biodeterioração: Anais do 1º Simpósio Latino Americano de realizado em Campos do Jordão, 30 de Agosto, 02 de setembro, 1992**. p.200-10.
- SHIRAKAWA, M.A.; CINCOTTO, M.A.; MOHOVICK, J.; GAMBALE, W. Airborne fungi isolated from mortar finishes undergoing biodeterioration – São Paulo. In: **Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium, 3. Proceedings...** Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina [CD ROM].
- SUNESSON, A. L.; NILSSON, C.A.; ANDERSSON, B.; BLOMQUIST, G. Volatile metabolites produced by two fungal species cultivated on building materials. **Annals of Occupational Hygiene**, v.40, n.4, p.397-410, 1996.
- TOGERÖ, Å. **Leaching of Hazardous Substances from Concrete Constituents and Painted Wood Panels**. 2005 115p. Tese de doutorado (nº 2209) Chalmers Tekniska Högskola, Gotenburgo.

Biodeterioração de Monumentos Históricos

Maria Aparecida de Resende



Foto: I.S. Melo - Fachada em mármore da antiga biblioteca
em Ejeus, Turquia

I. Introdução

Rochas e minerais sofrem processo natural de desgaste por condições ambientais que levam à perda substancial de material. Esse desgaste pode ser causado por fatores físicos, como chuvas e vento, químicos, como poluição atmosférica, e fatores biológicos, assim como pela associação dos três tipos. As chamadas “pedras artificiais”, como concreto, ladrilho e argamassa, também podem sofrer alterações por ação desses fatores.

Entre os agentes biológicos que participam da degradação das pedras estão as bactérias quimilitrotóficas e quimiorganotróficas, cianobactérias, algas, líquens e os fungos. Entre os mecanismos típicos de biocorrosão está a excreção de ácidos inorgânicos, como o ácido nítrico e o ácido sulfúrico, produzidos pelas bactérias quimiolitrotóficas e os ácidos orgânicos, liberados pelas bactérias quimiorganotróficas e pelos fungos, na superfície das rochas. Os filmes microbianos ou biofilmes, constituídos de algas, líquens, fungos e bactérias, que crescem praticamente em todas as pedras expostas a condições atmosféricas variadas, também podem modificar a composição química e mineralógica da pedra original.

A pressão causada pela formação de sais ou de cristais de gelo e liquefação nas camadas superficiais das rochas, sendo este último um fenômeno típico de países temperados, está incluída entre os fatores físico-químicos que provocam danos nas construções em pedra.

2. Situação ecológica e poluição

O clima e as condições de poluição atmosférica também influenciam os processos biológicos de degradação das rochas. Assim é que a situação ecológica dos microrganismos e sua conexão relativa com o tipo de pedra (pedra-sabão, calcária ou arenito, ácida, entre outros.) e muitos outros fatores ambientais têm um importante papel nos processos de intemperização das rochas. Além do mais, essa situação depende, em grande parte, da exposição da pedra a diferentes condições climáticas e de poluição. Ainda, de acordo com Krumbein (1988b), enquanto as rochas das áreas desérticas têm uma velocidade de decomposição de 10 mm a cada 100 anos, nas cidades o fenômeno apresenta velocidade quatro vezes maior.

A microflora de materiais inorgânicos representa um complexo ecossistema que se desenvolve de diversas maneiras, dependendo das condições geográficas e climáticas, da presença de partículas inorgânicas e/ou orgânicas do ar, assim como das propriedades físico-químicas do material em questão. Em muitos casos, a poluição do ar aumenta consideravelmente o crescimento dos biofilmes e, consequentemente,

a biodeterioração, como no caso da amônia ou matéria orgânica fornecida pelo vento e chuva nas áreas de indústrias e de agricultura intensiva. A amônia também, assim como a matéria orgânica, pode ser originada de fertilizantes secos ou úmidos (pó de amônia ou adubo líquido). Algas e cianobactérias podem suprir as rochas com grandes quantidades de limo e amônia, via processos de deterioração quimiorganotróficos. Além disso, o limo bacteriano se comporta como adesivo e suporte para deposição de partículas de carvão e fuligem na superfície das rochas.

Sabe-se que a atmosfera antropogênicamente poluída tem contribuído para um aceleramento da corrosão dos monumentos históricos de pedra nos últimos 100 anos. Devido ao uso intensivo de combustíveis derivados do petróleo, milhões de toneladas de gases poluentes são liberados na atmosfera, especialmente SO₂ e NO_x (NO e NO₂). Sabe-se, desde longa data, que o SO₂, sozinho ou combinado com a água, ataca e dissolve a superfície das pedras. Outro poluente bem conhecido é o NO₂. O monóxido de nitrogênio e o dióxido de nitrogênio são originados principalmente da emissão de gases dos automóveis (60%) e do solo. O NO₂ reage com a água e forma ácido nitroso e ácido nítrico, conforme a equação:



3. Deterioração de monumentos construídos de pedra

A decomposição das rochas apresenta dois aspectos principais: por um lado, é indispensável e, portanto, necessária para a formação do solo e, por outro lado, causa inestimável dano nas pedras usadas na construção dos monumentos e esculturas da nossa herança cultural.

A degradação biológica das rochas inclui e é estreitamente associada a processos químicos e físicos. Os processos bioquímicos e biofísicos de degradação das pedras incluem a ação direta e indireta de organismos que modificam as propriedades e estabilidade das rochas e das construções de pedras.

A degradação das rochas e pedras utilizadas nas construções de monumentos históricos foi, durante muito tempo, considerada um processo estritamente físico-químico. Krumbein (1966, 1968, 1972, 1983) e Krumbein & Schonborn-Krumbein (1987) foram os primeiros pesquisadores a descrever o fenômeno da biodeterioração da pedra e eles o definiram como uma troca ou biotransferência de material e energia entre dois sistemas heterogêneos abertos: o substrato sólido (rocha, mineral, concreto etc.) e a atmosfera. Antes dessas publicações, o significado da influência microbiana nos processos de deterioração das pedras era praticamente ignorado e, na maioria das vezes, não era levado em consideração nos processos de análise e conservação dos materiais. Mais recentemente, a participação dos processos de biodeterioração nas alterações que ocorrem nas pedras tem sido ressaltada e descrita em muitos casos, conforme artigo de revisão de May *et al.* (1993). A separação entre deterioração físico-química (abiótica) e biológica (biótica) é praticamente impossível, uma vez que

cada processo, químico ou físico, é influenciado ou controlado pela atividade microbiana. Os processos de biodeterioração e outros processos ambientais de deterioração estão intimamente relacionados, uma vez que a presença de um deles torna o outro mais efetivo.

4. Mecanismos de ação dos microrganismos nos processos de biodeterioração das pedras

Os microrganismos estão fortemente envolvidos nos processos de degradação de pedras dos monumentos históricos. Entretanto, os mecanismos de deterioração e a inter-relação entre organismos, assim como entre organismos e pedras, não estão ainda satisfatoriamente explicados. Sabe-se que a colonização e contaminação das rochas são basicamente controladas pelos impactos ambientais, tais como tipo de pedra, condições climáticas e fatores edáficos (relativos ao solo). Poluentes antropogênicos orgânicos e inorgânicos do ar, especialmente hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, aceleram os processos quimiorganotróficos de biodeterioração em pedras expostas em monumentos históricos. A interação entre a poluição do ar e os microrganismos da pedra interferem significativamente no aumento da população microbiana e, consequentemente, influencia diretamente o processo de biodeterioração.

Microrganismos, tais como as algas, líquens, fungos, assim como bactérias quimilitrotróficas e quimiorganotróficas influenciam os processos de degradação das rochas, principalmente através de duas diferentes maneiras, de acordo com Silverman (1979):

- 1) A excreção de ácidos inorgânicos (acidólise) ou orgânicos (complexólise) causa lixiviação, com perda de material ligante da rocha, levando, como consequência, ao enfraquecimento da estrutura cristalina do mineral da rocha. A liberação biogênica de ácidos corrosivos é um dos mecanismos de destruição biogeoquímica mais conhecidos e estudados.
- 2) A excreção de substâncias poliméricas extracelulares que absorvem água (SPE) forma os chamados biofilmes, que levam, como consequência, a mudanças na porosidade e permeabilidade das rochas. A presença dos biofilmes na camada superficial das rochas, em associação com a liberação de substâncias surfactantes, modifica também a absorção e difusão da água nesses materiais. Em adição, a absorção de gases poluentes da atmosfera parece também aumentar na superfície coberta com o biofilme.

Resumindo, de acordo com Krumbein (1987), os processos microbianos mais importantes envolvidos no biotransporte e biotransferência de material mineral e, portanto, na biodeterioração de construções, monumentos ou objetos de arte em pedras são identificados como:

- 1) Produção de ácidos (prótons).

- 2) Produção de compostos complexos.
- 3) Produção de substâncias adesivas e surfactantes.
- 4) Produção de substâncias minerais tais como óxidos, fosfatos, carbonatos, oxalatos, entre outros.
- 5) Produção de nichos ecológicos (perfurações, formação de crostas, alargamento de fissuras e criação de reservatórios de água).

A importância dos processos biológicos e outros fatores na deterioração das pedras usadas em construção de monumentos históricos tem sido repetidamente questionada. Porém, não existem mais dúvidas de que a composição da atmosfera, assim como a agressividade das soluções formadas na superfície da pedra, são sempre determinadas pelos processos biológicos. O fenômeno biológico é, sem dúvida, o fator chave no processo de intemperização das rochas e, portanto, das pedras usadas nas construções dos monumentos.

Qualquer organismo ou produto gerado por seres vivos é capaz de acelerar a destruição de material mineral e exemplos dessas atividades são numerosos. Segundo Krumbein (1988), os efeitos biogênicos nas construções de pedra podem variar conforme o agente:

- 1) Causados pelo homem (antropogênicos): guerra, vandalismo, negligência, poluentes.
- 2) Causados pelas plantas e animais: crescimento direto, influências indiretas como crescimento de raízes, produção de excreções diversas etc.
- 3) Causados pelos microrganismos e outros organismos: crescimento de líquens, musgos, algas, fungos, bactérias e actinomicetos, produção de metabólitos etc.
- 4) Causados por fatores biofísicos: transferência de prótons, transferência de elétrons, força de Van der Waals etc.

Berthelin (1983) divide o processo microbiano de degradação das rochas em dois mecanismos: de **solubilização** e **insolubilização**.

Solubilização: inclui os processos de acidólise, complexólise e alcalinólise, assim como os outros enzimáticos e não enzimáticos.

- Acidólise: é definida como o processo de ação do próton de complexação fraca de ácidos com metais das rochas. Como exemplo de ácidos podemos citar o carbônico, nítrico, fórmico, acético, lático, glucônico, e as reações que ocorrem conforme esquema geral abaixo:



onde R = NO_3^- , R_1COO^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , entre outros.

- Complexólise: leva à constituição de complexos organo-metálicos ou quelatos. Cátions monovalentes são extraídos por prótons (H^+) dos ácidos biogênicos e, dessa maneira, são facilmente lavados. O mesmo acontece com os cátions di e trivalentes, que

após processo de redução podem ser incorporados em complexos-quelatos e são também lavados pela água.

- Alcalinólise: grande número de microrganismos toma parte na de-gradação de compostos nitrogenados. O produto dessas reações (amônia) aumenta o pH e induz a solubilização da sílica.

Insolubilização (imobilização): os microrganismos podem absorver elementos minerais, precipitá-los fora de suas células ou incorporá-los em seu interior. Portanto, agem como sequestradores de íons, imobilizando-os.

5. Organismos envolvidos nos processos de biodeterioração das pedras

Os principais organismos envolvidos na degradação das rochas podem ser agrupados da seguinte maneira:

5.1 Líquens

Os líquens formam uma associação simbiontica entre um fungo (micobionte) e uma alga ou uma cianobactéria (ficobionte). Os fungos recebem nutrientes orgânicos das algas fotosintéticas e, por outro lado, suprem as algas de substâncias minerais retiradas da pedra através da penetração mais profunda das hifas no material pétreo. Os líquens, juntamente com as algas e cianobactérias, são considerados organismos pioneiros na colonização das superfícies de rochas e pedras trabalhadas. Como são organismos fotolitotróficos, não dependem de suprimento exterior de substrato orgânico. Os líquens, especialmente, toleram condições extremas de umidade e temperatura. Os líquens e outros organismos “epilíticos” (que crescem na superfície das pedras) podem formar um carpete cobrindo a superfície das rochas e, dessa maneira, regular a estabilidade da umidade. Muitas vezes, os líquens podem se estabelecer apenas na superfície das pedras, mas em algumas circunstâncias a hifa do fungo micobionte pode penetrar na rocha e a deterioração da rocha pode dever-se a:

- a) expansão da hifa na matriz da pedra;
- b) sucessiva expansão e contração da colônia de líquen em diferentes situações de umidade e de seca;
- c) absorção de água em torno da colônia do líquen, que pode levar a danos por congelamento da mesma nos países de clima temperado e ao aumento da absorção de ácidos atmosféricos na pedra.

As crostas biogênicas mantêm um balanço entre a atmosfera e a litosfera, o que pode proteger a pedra contra fatores destrutivos físico-químicos. Entretanto, esses organismos podem tomar parte no processo de deterioração, através da produção

de ácidos. Esses organismos também produzem ácidos orgânicos, que podem quelar metais e formar complexos solúveis na água. A água da chuva pode, dessa maneira, causar erosão na pedra.

O crescimento maciço de líquens, como ocorre em países de clima tropical, pode tornar escura a superfície de esculturas e monumentos de pedra e os nichos formados podem levar ao acúmulo de detritos carreados pelo vento, nutrientes e água, favorecendo o estabelecimento de musgos e plantas nesses locais. A colonização da pedra pelos líquens pode ser facilitada pela presença de fezes de pássaros, que podem fornecer nutrientes extras.

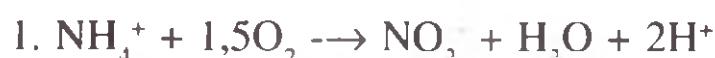
5.2 Fotolitotróficos

São as algas e cianobactérias, que usam a luz do sol como fonte de energia para o crescimento e liberam oxigênio durante o processo fotossintético. O requerimento de carbono é suprido pelo CO₂ da atmosfera.

As algas podem ser constituídas de uma única célula ou apresentar estrutura filamentosa. Elas podem, muitas vezes, ser encontradas na superfície de pedras, onde existem luz e umidade e causar dano mecânico pela colonização e dilatação de rachaduras na rocha. Também produzem ácidos, que podem dissolver o carbonato de cálcio. Além do mais, esses organismos podem secretar outros produtos, tais como aminoácidos, açúcares, antibióticos e outras substâncias estimuladoras do crescimento, que criam condições de nutrição propícias ao crescimento de algumas bactérias quimiorganotróficas específicas na superfície das pedras. Biodeterioração aestética ou produção de manchas é provavelmente o mais importante tipo de dano causado pelas algas.

5.3 Bactérias quimiolitoautotróficas

As bactérias quimiolitoautotróficas usam doadores inorgânicos de hidrogênio, tais como NH₄⁺, NO₂⁻, H₂S, tiosulfato ou enxofre elementar e são capazes de produzir energia a partir da oxidação destes compostos. Essas bactérias utilizam também o CO₂ como fonte de carbono. Esse processo resulta na liberação de ácido nitroso (*Nitrosomonas*), ácido nítrico (*Nitrobacter*) ou ácido sulfúrico (*Thiobacillus*). Os habitats naturais dessas bactérias são o solo, adubo, dejetos, rios, lagos e água do mar. Esses microrganismos participam do ciclo do nitrogênio pela formação biológica do nitrato ou nitrito a partir de compostos contendo nitrogênio reduzido. Este processo, chamado nitrificação é realizado por dois grupos diferentes de bactérias, o primeiro, das *Nitrosomonas*, que oxida amônia a nitrito, e o segundo das *Nitrobacter*, que converte nitrito a nitrato, por oxidação, conforme as reações abaixo:



Essas reações destroem material alcalino e o carbonato de cálcio formando nitratos, que são solúveis na água, levando à perda de material da pedra.

5.4 Bactérias quimiorganotróficas

As bactérias quimiorganotróficas, assim como os fungos, obtêm energia através da oxidação de substratos orgânicos (doadores de hidrogênio). Em alguns casos essas bactérias são capazes de produzir energia, através da oxidação de cátions metálicos, tais como Fe^{2+} e Mn^{2+} . Esses microrganismos também participam do processo de biodeterioração das pedras por processos semelhantes aos dos microrganismos quimiautolitotróficos.

5.5 Fungos

Os microrganismos pertencentes ao Reino Fungi que contaminam as rochas e os monumentos de pedra têm sua origem no solo, na água do solo e no ar. Somente no ar eles são encontrados em número acima de 10.000 esporos por m^3 . Sob condições favoráveis, esses microrganismos são capazes de crescer e influenciar fortemente o processo de biodeterioração das rochas. Entretanto, baixa disponibilidade de água e oxigênio, assim como baixos suprimentos de compostos orgânicos limitam enormemente seu número. Em pedras de monumentos fortemente intemperizadas o número de fungos filamentosos pode alcançar o mesmo encontrado em amostras de solo. Muitos autores têm relatado o encontro de grande quantidade de fungos na superfície das rochas e de monumentos e construções em pedra de números acima de 10⁴ a 10⁶ UFC (unidades formadoras de colônia) por grama de pedra.

A maioria dos gêneros de fungos encontrada nas rochas pertence à microbiota do solo e do ar. Os fungos isolados de diferentes locais, como rochas, monumentos e afrescos, pertencem a gêneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Aureobasidium* e *Torula*. Os fungos são considerados como o grupo de organismos que apresenta o maior potencial de destruição das pedras. A atividade dos fungos filamentosos representa o fator mais significativo na solubilização de rochas, minerais e silicatos, incluindo o quartzo.

Os fungos podem utilizar um largo espectro de nutrientes e até mesmo traços de matéria orgânica podem estimular seu crescimento. As camadas mais externas da superfície das rochas podem conter cerca de mais de 2% de material orgânico como pectina, celulose, lignina, amido e proteínas e o fungos são capazes de utilizar esses substratos com fonte de energia. As enzimas extracelulares podem decompor os mais complexos compostos orgânicos. Os fungos produzem e lançam no meio ambiente uma série de exoenzimas, como as pectinases, amilases, proteinases, ligninases, entre outras, além de ácidos orgânicos e inorgânicos.

A produção de ácidos orgânicos pelos fungos filamentosos contribui consideravelmente para a degradação natural das rochas e minerais contendo silicatos, assim como as pedras dos monumentos. De acordo com Petersen *et al.* (1988), fungos isolados freqüentemente da superfície de monumentos de arenito apresentam capacidade acidolítica, e Kuroczkin *et al.* (1988) demonstraram que 30% de amostras de fungos isoladas desse mesmo tipo de pedra eram capazes de produzir ácido a

partir de glicose e alguns polissacarídeos como o amido. O ácido glucônico e o oxálico foram os mais freqüentemente produzidos. O ácido oxálico apresenta maior poder de solubilização das rochas do que o ácido cítrico. Henderson & Duff (1963) observaram que a correlação entre um certo ácido e seu potencial de solubilização das rochas é difícil de ser avaliada, uma vez que um fungo pode produzir simultaneamente diferentes tipos de ácidos.

As hifas fúngicas podem penetrar nas rochas numa profundidade de até 1-4 mm e podem solubilizar minerais que contenham silicatos ou materiais calcários.

Os fungos não são suscetíveis aos extremos de temperatura e umidade e toleram larga faixa de pH, além de resistirem a baixos teores de umidade. O pigmento escuro melanina é produzido por muitos fungos e esse composto os protege contra a ação dos raios UV. Todas essas propriedades tornam os fungos os organismos dominantes nas superfícies das rochas.

6. Controle dos processos de biodeterioração

Em casos extremos, o controle dos processos de biodeterioração vem a ser necessário.

A preservação dos monumentos históricos é muito importante, pois são heranças culturais da humanidade e neles estão representados o momento social, político e cultural em que seu idealizador viveu e os traços desse artista. Torna-se necessário, portanto, preservá-los.

A análise microbiológica das rochas tem de ser adaptada a cada tipo de pedra e aos diferentes sítios onde estão localizadas. Uma série de investigações deve ser realizada antes de se chegar à anamnese, ao diagnóstico e ao tratamento das rochas danificadas que podem conter pigmentos negros, brancos verdes, vermelhos ou de outras cores.

Krumbein (1988) apresenta uma lista de substâncias mais comumente empregadas na preservação de monumentos e construções em pedra:

- 1) antibióticos;
- 2) enzimas;
- 3) biocidas (bactericidas, fungicidas, algicidas);
- 4) tensioativos e sabões;
- 5) taninos e fenóis (naturais e sintéticos);
- 6) gases (por exemplo, óxido de etileno);
- 7) irradiação (por exemplo, radiação UV).

A Tabela 1 apresenta uma lista de diferentes substâncias químicas usadas nas formulações dos biocidas.

Segundo Becker *et al.* (1994), medidas protetoras e de restauração de materiais pétreos danificados, no caso em que se ignoram ou se subestimam os efeitos

TABELA 1. Lista de substâncias químicas utilizadas na formulação de biocidas (Allsopp & Seal, 1986).

1. Compostos metálicos
Naftenato e quinolinato de zinco e cobre
Dimetilditiocarbamato de cobre e zinco
Óxido de tributiltina, fluoreto, cloreto e naftenato
Acetato fenilmercúrico
10,10-Oxibisfenoxarsina
Organobóricos
2. Fenólicos
Fenol e homólogos como ortofenil, cresci e timol
Triclorofenol, pentaclorofenol, paracloro-metacresol, dicloro-dihidroxifenil metano
Ácido paraidroxibenzóico, laurato de pentaclorofenilParanitro fenol, salicilanilida
3. Compostos quaternários de amônia
Cloreto de diacildimetilamônio
Cloreto de alquildimetilbenzilamônio
4. Compostos de nitrogênio
1 ,3,5-hexaidroxitriazina e derivados
Salicilato de dodecilamina
Oxazolidinas/Imidazolinas
5. Compostos sulfurados
Sulfeto de bis (2-hidroxi-5-clorofenil)
Hexaclorodimetilsulfona
6. Compostos de nitrogênio e enxofre
Dissulfeto de tetrametiltiourano
Tioftalimida de N-triclorometil e derivados fluorados
Sulfato de hidroxiquinoleína
Isotiazolina
7. Compostos inorgânicos
Sais de elementos metálicos de cobre, zinco, cobre/cromo, potássio e mercúrio.

microbianos, são de curta duração e podem mesmo levar a um aumento na degradação do material, assim como do processo de biodeterioração. Exemplo desse tipo de tratamento é aquele em que se usa jato de água sob alta pressão, que propicia um alívio temporário da infecção, mas com o tempo provoca um aumento da microflora contaminante devido ao aumento da umidade.

Organossilanos têm sido usados como agentes hidrofóbicos e profiláticos na superfície de monumentos de pedra e o processo resulta na diminuição da umidade nessas estruturas. Com isso, o suprimento de nutrientes para os microrganismos é dificultado, assim como o transporte de sais solúveis na estrutura do material. Na prática, no entanto, essas medidas protetoras demonstraram não apresentar eficiência a longo prazo. Os fungos conseguem crescer utilizando esses compostos como fonte de carbono, o que leva à perda de sua propriedade hidrofóbica, além da possibilidade de ocorrer a formação do biofilme superficial.

Nas medidas de controle e proteção contra a ação microbiana é necessário, inicialmente, garantir as condições de umidade e temperatura adequadas da rocha. Após a eliminação do potencial de destruição da microflora, a aplicação de agentes protetores tem que levar em conta as condições dominantes do objeto. A escolha do agente protetor, como uso de consolidantes, substâncias hidrofóbicas, fixativos

ou até mesmo a cobertura da superfície da pedra com lâminas, tem que ser realizada com muito cuidado. Os biocidas podem ser usados, a fim de aumentar a durabilidade do agente protetor. Diferentes produtos têm sido sugeridos, como os compostos quaternários de amônio, substâncias heterocíclicas e metalorganos. Mas, infelizmente, a eficiência dessas substâncias não tem sido comprovada em experimentos de laboratório. Devido à propriedade de adaptação metabólica e fisiológica dos microrganismos, assim como sua capacidade de integração em ecossistemas complexos e sua habilidade em se cobrir com camadas protetoras de biofilmes, os efeitos dos biocidas têm sido considerados de pouca eficácia.

Na escolha de um microbiocida deve ser levada em conta sua eficácia contra uma ampla gama de microrganismos específicos do material a ser protegido. Efeitos colaterais, como mudança da cor do objeto a ser protegido, corrosão ou cristalização interna, devem ser evitados. Além do mais, o biocida tem que ser ecologicamente sólido. O uso de metais pesados, como cobre, por exemplo, pode ser combinado com um composto orgânico, levando a um efeito sinergístico, com a vantagem de se usarem menores quantidades dos mesmos. Na prática, para se restaurar e conservar um monumento é necessário realizar o completo e cuidadoso diagnóstico da degradação do objeto cultural, levando em conta as influências biogênicas, os fatores climáticos e as condições de poluição atmosférica.

7. Definição dos termos envolvidos nos processos de destruição das rochas e pedras usadas em construções de monumentos

Abrasão: é um caso especial de erosão, definida como fricção ou efeito mecânico de qualquer espécie sólida ou de superfície dura em outra superfície sólida ou dura, levando à erosão.

Bioabrasão: ação de organismos nas rochas com seus cascos, bicos e línguas, raízes, galhos e folhas.

Alteração: mudança na composição mineral de uma rocha por qual quer meio químico.

Decomposição: em geologia, o termo é sinônimo de intemperização química, enquanto em biologia é usado para descrever o processo de formação de minerais provenientes de compostos orgânicos por via respiratória ou fermentativa.

Biodegradação: é definida como a propriedade que os microrganismos, utilizados pelo homem, têm de transformar um material em uma forma mais útil ou aceitável. Biodegradação se refere somente a materiais que geralmente são de valor baixo ou mesmo negativo, como os dejetos orgânicos (casca de arroz, bagaço de cana, farelo de trigo, por exemplo) e se distingue do processo de deterioração, porque este último se aplica a materiais já processados. Além do mais, o processo de biodegradação é considerado positivo, quando comparado com o de biodeterioração.

Biodeterioração: é definida como qualquer troca indesejável nas propriedades de um material, causada por atividade vital de um organismo. Tem sido definida também como a deterioração de materiais de importância econômica pelos microrganismos. Deterioração implica uma perda de material e, de certa maneira, do ponto de vista humano, é uma ação negativa.

Erosão: remoção ou transporte de substâncias por ação mecânica ou física.

Lixiviação e biolixiviação: lixiviação é um termo derivado da mineração e processamento de material. Esse processo pode ser efetuado por ação de ácidos ou bases ou por métodos eletroquímicos, levando à perda de íons metálicos e resulta, consequentemente, em um enfraquecimento da estrutura cristalina da rocha. No caso da biolixiviação, o processo ocorre pela ação de ácidos, como por exemplo, o sulfúrico, por ação de quelantes ou ainda por contato direto da rocha com a superfície de microrganismos, tais como fungos, cianobactérias e bactérias quimiorganotróficas.

8. Métodos e técnicas usadas na análise do estado e controle da biodeterioração de monumentos de pedras

8.1 Coleta das amostras

Após a seleção cuidadosa dos sítios caracterizados como os mais típicos na forma de intemperização, pequenos cubos de pedra, de aproximadamente 10 x 10 x 2 mm, são coletados, com auxílio de serraria elétrica ou bisturi, previamente desinfetados com etanol a 70%. As amostras são acondicionadas em placas de Petri estéreis e transportadas para o laboratório em caixas de isopor contendo gelo.

Os parâmetros ambientais e o aspecto de degradação são imediatamente registrados e fotografados, assim como as condições de exposição do sítio escolhido no objeto em estudo.

8.2 Análises de laboratório

A análise da microflora contaminante é realizada mediante o isolamento, a contagem e a identificação dos grupos microbianos, a investigação fisiológica dos mecanismos físico-químicos de deterioração e pela observação microscópica da formação e distribuição do biofilme na superfície da pedra.

8.2.1 Preparo das amostras e isolamentos dos microrganismos

As amostras de pedra são pulverizadas em gral de porcelana e 1 g do material é adicionado a 10 mL de solução de tween 80 em água destilada estéril a 0,001%. A

suspensão da pedra, depois de agitada em agitador durante 1 hora, é semeada nos meios adequados de cultura para contagem e isolamento dos microrganismos. Os meios usados com maior freqüência são os seguintes: de ágar Sabouraud e Czapek-Dox para fungos, de BR (BUNT & ROVIRA, 1955) para bactérias quimiorganotróficas e de GNCd (KÜSTER & WILLIAMS, 1964) para actinomicetos. As bactérias nitrificantes são quantificadas pelo método do NMP (número mais provável) por g de pedra. As bactérias amônia-oxidantes são isoladas em meio de BNM (KRÜMEL, 1978) enquanto as nitrito-oxidantes em meio de BNB (BOCK & ENGEL, 1966). As algas e cianobactérias são quantificadas também pelo método do NMP e isoladas no meio BG 11 (RIPKA *et al.*, 1979).

8.2.2 Testes fisiológicos

- a) Dosagem de proteína do biofilme: o teor de proteína do biofilme é usado como parâmetro da medida da biomassa. A dosagem de proteínas é determinada pela técnica de Lowry *et al.* (1951), a partir de 0,5 mL de suspensão da amostra (50 mg de pedra pulverizada em 0,45 mL de NaCl a 0,9%).
- b) Medida da atividade desidrogenase do biofilme: essa medida é realizada por um método rápido que fornece a avaliação da atividade microbiana. As amostras de pedra são pulverizadas e suspensas em 1 mL de tampão Tris-HCl 0,1M contendo 0,2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). As amostras, incubadas a 27°C por 24 horas, têm depois adicionados 4 mL de uma solução contendo acetona/tetrahidrocloreto de carbono (90:10, v/v). A mistura é agitada vigorosamente e colocada em repouso por 2 horas, no escuro. A suspensão é, então, filtrada em papel de filtro Schleicher & Schüll 595. O papel é lavado com a mesma solução e o volume do filtrado é completado para 5 mL. A dosagem do composto formado 1,3,5-trifenilformazana (TPF) é feita pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 546 nm e os dados obtidos são comparados com uma curva padrão e a atividade desidrogenase calculada em mg de TPF/kg de pedra.
- c) Coloração do biofilme pelo método de PAS: fragmentos das amostras de pedras são tratados com ácido periódico a 75%, sob agitação, por 8 minutos. Após, as amostras são lavadas por 5 minutos em etanol 70% e, por mais 5 minutos, em água gelada. As amostras são então tratadas com reagente de Schiff, sob agitação, por 20 minutos e, em seguida, agitadas em solução de sulfeto de sódio a 0,6% em água/HCl, 95:5 (v/v). Finalmente as amostras de pedra são lavadas duas vezes em água gelada e estocadas em etanol 70% para posterior análise microscópica.
- d) Pesquisa da produção de ácido pelos fungos: os fungos são cultivados em meio líquido de Czapek-Dox por 14 dias a 28°C. Depois as culturas são filtradas e o pH do filtrado é medido em pHmetro. Os ácidos produzidos são identificados por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) e GLC (cromatografia-gás-líquida).
- e) Investigação microscópica: a contaminação da parte interior das escamas de pedra contendo biofilme podem ser observadas ao microscópio eletrônico pela técnica da microscopia de varredura.

d) Medida da respiração *in situ*: a atividade microbiana pode ser medida através da respiração, diretamente, na superfície da pedra. Caixas hermeticamente fechadas, com soluções que podem absorver o CO₂, liberado durante a respiração são aderidas à superfície da pedra, contendo o crescimento microbiano. Posteriormente essas soluções são tituladas com uma base, como por exemplo o NaOH, e a quantidade de CO₂, formada é calculada e, quanto maior é o teor desse composto, maior é a contaminação microbiana desse local.

9. Exemplo de pesquisa sobre deterioração em pedras: deterioração de monumentos históricos de pedra-sabão e quartzito do estado de Minas Gerais

O projeto IDEAS (Investigação sobre degradação de materiais pétreos em monumentos históricos), envolvendo instituições brasileiras e alemãs, surgiu da necessidade de um maior aprofundamento das características e do estado de conservação do acervo em pedra, de Minas Gerais. Neste estado, as pedras foram largamente utilizadas pelos artistas e artífices setecentistas em suas criações. Considerando que o processo de desgaste e degradação vem se acentuando nos últimos anos, além da incipienteza das pesquisas na área de preservação das pedras de nosso país, conclui-se, após avaliação dos estudos existentes, da necessidade de dar continuidade aos processos de pesquisa iniciados anteriormente.

A preservação de monumentos históricos é muito importante, pois constituem em herança cultural da humanidade e neles estão representados o momento social, político e cultural em que seu idealizador viveu e os traços desse artista. Torna-se necessário, portanto, preservá-los.

TABELA 2. Resultados de análise microbiológica e físico-química de amostras de pedra-sabão do Santuário do Senhor *Bom Jesus* de Matosinhos, em Congonhas, coletadas em fevereiro de 1992.

Amostra	pH (H ₂ O)	Proteína mg/mL	TTC mg/kg/ pedra	Bactéria quimorga notrófica UFC/g	Nitrobacter NMP/g	Nitroso monas NMP/g	Fungos UFC/g	Algas NMP/g X106	Actinomicetos UFC/g
Co92/1	9,7	0,7	34	10700	17500	0	90	5,75	2900
Co92/2	8,0	2,6	196	17000	0	21500	7500	0,3	0
Co92/3	9,2	0,1	4,8	17000	7500	11500	170	0,137	3100
Co92/5	9,5	n.d.	6,4	3400	2000	0	1400	0	0
Co92/8	9,4	0,8	25	33000	46500	11500	0	5,75	20000
Co92/9	9,2	1,6	176	72000	465000	1500	170	0,575	4100
Co92/10	9,1	0,3	10	36000	46500	11500	170	0,057	4800

TABELA 3. Produção de ácido por fungos isolados da Igreja São Francisco de Assis em Ouro Preto, Igreja Bom Jesus de Matosinhos em Congonhas e Nossa Senhora Mãe dos Homens no Caraça, em fevereiro de 1992*.

Amostra	Fungo	pH	Amostra	Fungo	pH
OP92/1	<i>Aspergillus ochraceus</i>	6,97	OP92/7	<i>Aspergillus japonicus</i>	5,82
	<i>Penicillium expansum</i>	4,05		<i>Penicillium expansum</i>	4,68
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,46		<i>Aspergillus puniceus</i>	4,60
	<i>Penicillium sp.</i>	5,31		<i>Penicillium nigricans</i>	4,60
	<i>Phialophora richardsiae</i>	7,00		<i>Aureobasidium pullulans</i>	6,46
OP92/3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,99	OP92/8	<i>Penicillium sp.</i>	6,58
	<i>Curvularia paleescens</i>	6,74		<i>Aspergillus sp.</i>	7,93
	<i>Absidia cytidrosphora</i>	6,50		<i>Curvularia paleescens</i>	7,98
	<i>Penicillium expansum</i>	4,05		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,46
OP92/4	<i>Alternaria sp.</i>	6,60	CO92/1	<i>Chrysosporium sp.</i>	6,91
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	7,29	CO92/2	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6,89
	<i>Periconia sp.</i>	6,90		<i>Penicillium sp.</i>	6,91
	<i>Penicillium mineoluteum</i>	5,6		<i>Paecilomyces ilacinus</i>	5,00
	<i>Aspergillus flavipes</i>	6,46	CO92/3	<i>Phoma sp.</i>	7,33
	<i>Pyrenopspora sp.</i>	5,43		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,30
	<i>Penicillium expansum</i>	6,25		<i>Mucor hiemalis</i>	3,99
	<i>Aspergillus sp.</i>	6,64		<i>Fusarium oxysporum</i>	4,78
	<i>Curvularia paleescens</i>	6,10	CO92/4	<i>Acremonium sp.</i>	4,78
OP92/6	<i>Paecilomyces ilacinus</i>	6,71		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,46
	<i>Phialophora sp.</i>	7,17	CO92/5	<i>Cladosporium sp.</i>	6,66
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,99		<i>Haplosporangium sp.</i>	5,70
	<i>Penicillium sp.</i>	6,44	CO92/8	<i>Acremonium sp.</i>	4,33
	<i>Curvularia paleescens</i>	7,98		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6,53
	<i>Verticillium lecanii</i>	5,70	CO92/9	<i>Paecilomyces ilcinus</i>	6,43
	<i>Fusarium sp.</i>	7,23	CO92/0	<i>Penicillium expansum</i>	6,57
	<i>Aspergillus sydowii</i>	7,04		<i>Mycolecia sterma</i>	5,20
	<i>Penicillium sp.</i>	6,16	CA92/1	<i>Pleiochaeta sp.</i>	6,00
	<i>Paecilomyces ilacinus</i>	7,27		<i>Aspergillus versicolor</i>	6,40
OP92/17	<i>Penicillium sp.</i>	5,83		<i>Phialophora sp.</i>	6,13
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6,77		<i>Penicillium puberulum</i>	6,62
	<i>Mucor hiemalis</i>	4,87		<i>Cladosporium cladosporioide</i>	6,46
	<i>Cyndrocarpon sp.</i>	6,86		<i>Meio de Czapek-Dox</i>	6,26

OP92 = Amostras isoladas da Igreja São Francisco de Assis, em Ouro Preto. CO92 = Amostras isoladas da Igreja Bom Jesus de Matosinhos, em Congonhas. CA92 = Amostras isoladas da Igreja Nossa Senhora Mãe dos Homens, no Caraça. * Culturas a 28°C por 14 dias, em meio líquido de Czapek-Dox contendo 3% de glicose

O projeto IDEAS teve como objetivos o registro e a avaliação do processo de biodeterioração nos monumentos históricos de pedra do estado de Minas Gerais, a fim de se elaborar um processo prático no auxílio da restauração e conservação, envolvendo o tratamento das pedras com biocidas.

9.1 Objetos do Estudo

Os monumentos históricos, objeto das pesquisas, foram escolhidos *com base* nas diferentes condições climáticas a que se acham expostos. O Santuário Bom Jesus de Matosinhos, em Congonhas, situado numa área em fase inicial de industrialização, apresentando ainda alterações incipientes (Tabela 2); a Igreja São Francisco de Assis, em Ouro Preto, que vem há muito sofrendo os efeitos da poluição atmosférica, apresentando alterações em estágio bastante alterado; e o conjunto arquitetônico do Caraça, que, por situar-se em região pouco afetada pela degradação ambiental, serviu como controle para os estudos nos outros locais de escolha (Tabela 3).

Os resultados de pesquisa sobre deterioração de monumentos históricos são de grande importância na orientação de profissionais da área de preservação do patrimônio cultural, na medida em que permite estabelecer critérios e oferecer base científica para a conservação e restauração do material pétreo dos nossos monumentos históricos.

Referências

- ALLSOPP, D.; SEAL, K.J. **Introduction to Biodeterioration**. London: Edward Arnold, 1986. 136p.
- ARRIETA, L.; GREZ, R. Solubilization of iron-containing minerals by soil microorganisms. **Applied Microbiology**, v.22, p.487-490, 1971.
- ASCASO, C.; WIERZCHOS, J. New applications of microscopic techniques to biodeterioration produced by lichen thalli. **Microbiologia**, v.10, n.1/2, p.103-110, 1994.
- BECKER, T.W.; KRUMBEIN, W.E.; WARSCHIED, T.; RESENDE, M.A. Investigations into Microbiology. In: BIANCHI, H.K., ed. **IDEAS - Investigations into Devices against Environmental Attack on Stones**. Geethacht: GKSS Forsch. Geesthacht GmH, Geesthacht, 1994. p.147-190.
- BEECH, I.B.; GAYLARDE, C. Microbial polyssacharides and corrosion. **International Biodeterioration**, v.27, p.95-107, 1991.
- BERTHELIN, J. **Microbial weathering process** In: KRUMBEIN, W.E.,ed. London: Blackwell, 1983. p.223-262.
- BOCK, E.; HENGEL, H. Untersuchungen über die postoxidative CO₂-Fixierung bei Nitrobacter Winogradsky. Buch. **Archives of Microbiology**, v.54, p.191-198, 1966.
- BOCK, E.; SAND, W. The microbiology of masonry biodeterioration. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.403-514, 1993.
- BOYLE, J.R., VOIGT, G.K., SAWHNEY, B.L Biotite flakes: alteration by chemical biological treatment. **Science**, v.155, p.193-195, 1967.
- BOYLE, J.R., VOIGT, G.K.; SAWHNEY, B.L Chemical weathering of biotite by organic acids. **Soil Science**, v.117, p.42-45, 1974
- BRAAMS, J. Ecological studies on the fungal microflora inhabiting historical sandstone monuments. Oldemburgo, Universidade de Oldemburgo, 1991. 104p. Dissertação, Doutorado.
- BRAVERY, A.F. Schimmelpilzbefall in Gebäuden. **Holz-Zentralblatt**, v.109, p.587-588, 1983.
- BUNT, J.S.; ROVIRA, A.D. Microbiological studies of some subantarctic soils. **Journal of Soil Sciences**, v.6, p.119-128, 1955.

- DE LA TORRE, M.A.; GOMEZ-ALARCON, G. Manganese and iron oxidation by fungi isolated from building stone. *Microbial Ecology*, v.27, n.2, p.177-188, 1994.
- DEL MONTE, M.; SABBIONI, C.; ZAPPIA, G. The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. *The Science of the Total Environment*, v.67, p.17-39, 1987.
- DEL MONTE, M.; SABBIONI, C. Chemical and biological weathering of an historical building: Reggia Emilia Cathedral. *The Science of the Total Environment*, v.50, p.165-168, 1986.
- DOMASLOWSKI, W.; STRZELCZYK, A.B. Evaluation of applicability of epoxy resins to conservation of stone historic monuments. In: *INTERNATIONAL CONGRESS CASE STUDIES IN THE CONSERVATION OF STONE AND WALL PAINTINGS. Proceedings*, Bolonha, 1986. p.126-132.
- DOMSCH, K.H. Das Pilzspektrum einer Bodenprobe. I. Nachweis der Homogenität. *Archiv für Mikrobiologie*, v.35, p.181-185, 1960.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press London, 1980. v.1.
- DUKES, W. H. Conservation of stone: causes of decay. *Architects Journal*, v.156, p.422-429 1972.
- ECKEHARDT, F.E.W. Heterotrophic bacteria - potent allies of the filamentous fungi and yeasts on weathering building stones and monuments. In: *SCIENCE, technology and european cultural heritage. Proceedings of the European Symposium*, Bolonha, 1991. p.515-519.
- ECKEHARDT, F.E.W. Influence of culture media employed in studying microbial weathering of buildings stones and monuments by heterotrophic bacteria and fungi. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE*, 6., Torun, 1988. *Supplementary Acts*. Torun: Nicolaus Copernicus University, 1988. p.71-81.
- ECKEHARDT, F.E.W. Mechanisms of the microbial degradation of minerals in sandstone monument, medieval frescoes, and plaster. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE*, 5., Lausanne, 1985. *Proceedings*. p.643-652.
- ECKEHARDT, F.E.W. Microbial degradation of silicates. The release of cations from aluminosilicate minerals by yeasts and filamentous fungi. In: OXLEY, T.A.; ALLSOPP, D.; BECKER, G. ed. *Biodeterioration*. London, Pitman, 1980. p.107-116.
- ECKEHARDT, F.E.W. Microorganisms and weathering of a sandstone monument p.675-686. In: KRUMBEIN, W.E., ed. *Environmental biogeochemistry and geomicrobiology. The terrestrial environment*. Michigan: Ann Arbor, 1978. p.675-686.
- ECKEHARDT, F.E.W. Solubilization, transport, and deposition of mineral cations by microorganisms - efficient rock weathering agents. In: DREVER, J. I. ed. Dordrecht: Reidel, 1985a. p.161-173.
- FOGG, G.E. Extracellular products. In: LEWIN, R.A. ed. *Physiology and biochemistry of algae*. London: Academic Press, 1962. p.475-489.
- FOSTER, J.W. *Chemical activities of fungi*. New York, Academic Press, s.d.
- GOMEZ-ALARCON, G.; DE LA TORRE, M.A. Mechanisms of microbial corrosion on stone. *Microbiologia*, v.10, n.1/2, p.111-120, 1994.
- GORBUSHINA, A.A., KRUMBEIN, W.E., HAMMAN, E.H., PANINA, L., SOUKHARJEVSKI, S. & WOLLENZIEN, U. Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiology Journal*, v.11, n.3/4, p.205-221, 1993.
- HENDERSON, M.E.K.; DUFF, R.E. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks, and soils by fungal activity. *Journal of Soil Science*, v.14, p.236-246, 1963.
- HUECK VAN DER PLAS, E.H. The microbial deterioration of porous building materials. *International Biodeterioration Bulletin*, v.4, p.11-28, 1968.
- IONITA, I. Contributions to the study of the biodeterioration of the work of art and historic monuments. III. Species of fungi isolated from stone monuments. *Review Roumanian of Biology and Botany*, v.16, p.433-436, 1971.
- IONITA, I. Contributions to the study of the biodeterioration of the works of art and historical monuments. IV. Fungi involved in the deterioration of mural paintings from the monasteries of Moldavia. *Review Roumanian of Biology and Botany*, v.18, p.179-189, 1973.
- JACKS, G.V. Organic weathering. *Science Progress*, v.41, p.301-305, 1953.
- JONES, D., WILSON, M.J.; MCHARDY, W.J. Lichen weathering of rock-forming minerals: application of scanning electron microscopy and microprobe analysis. *Journal of Microscopy*, v.124, p.95-104, 1981.
- JONES, D.; WILSON, M.J. Biominerization in crustose lichens. p.91-105. In: LEADBEATER, B.S.e.; RIDIND, R., ed. *Biominerization in lower plants and animals*, Oxford: Clarendon Press, 1986.
- JORGENSEN, E.G. Antibiotic substances from cells and culture solutions of unicellular algae with special reference to some chlorophyll derivatives. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.530-544, 1962.
- KIEL, H.; SCHWARTZ, W. Leaching of a silicate and carbonate copper with heterotrophic fungi and bacteria, producing organic acids. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, v.20, p.627-636, 1980.

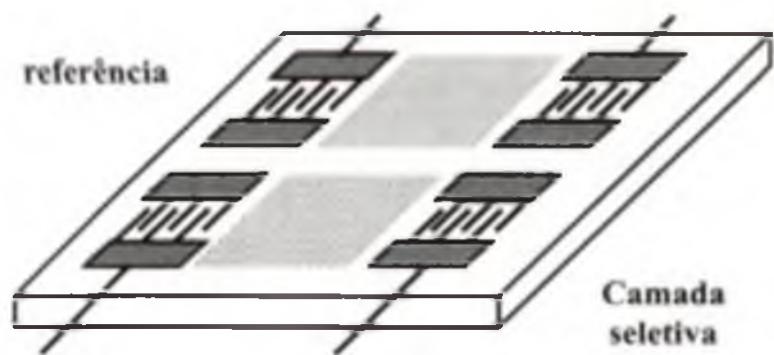
- KOESTLER, R.J., CHAROLA, A.E., WYPYSKI, M.; LEE, J.J. Microbiologically induced deterioration of dolomitic and calcitic stone as viewed by scanning electro microscopy. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 5, Lausanne, 1985. Proceedings. Lausanne, 1985, p.617-626.
- KOESTLER, R.J., SANTORO, E.D., DRUZIC, J., PREUSSER, F., KOEPP, L.; DERRICK, M. Status report: ongoing studies of the susceptibility to stone consolidants to microbiologically induced deterioration. In: HOUGHTON, D.R.; SMITH, R.N.; EGGIN, H.O., ed.. **Biodeterioration**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 441-448.
- KRASILNIKOV, N.A. Role of microorganisms in the weathering of rocks. **Microbiology**, v.18, p.318-323, 1949
- KRUMBEIN, W.E. Biotransfer in monuments - a sociobiological study. **Durability of Building Materials**, v.5, p.359-382, 1988b.
- KRUMBEIN, W.E. Damage caused by cyanobacteria and fungi in plasters and casting covering medieval frescos North German rural churches. **GP News Letter**, v.4, p.27-29, 1983.
- KRUMBEIN, W.E. Denkmalpflege und Konservierung in Einblicke. **Forschung an der Universität Oldenburg**, v.5, p.4-9, 1987.
- KRUMBEIN, W.E. Microbial interactions with mineral materials. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N.; Eggin, H.O.W. ed. **Biodeterioration**. 7.ed. London: Elsevier Applied Science, 1988a. p.78-100.
- KRUMBEIN, W.E. Role des microorganismes dans la genese, diagense et la deterioration des raches en place. **Revue de Ecologie et Biologie du Sole**, v.3, p.283-319, 1972.
- KRUMBEIN, W.E. Zur Frage der biologischen Verwitterung: Einflu der Mikroflora auf die Bausteinverwitterung und ihre Abhagigkeit von edaphischen Faktoren. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, 8, p.107-117, 1968.
- KRUMBEIN, W.E. Zur Frage der Gesteinverwitterung (Über geochemische und mikrobiologische Bereiche der exogenen Dynamik). Oldemburgo: Universidade de Oldemburgo, 1966.
- KRUMBEIN, W.E., PETERSEN, K.; SCHELLNHUBER, H.J. On the geomicrobiology of yellow, orange, red brown and black films and crusters developing on several different types of stone and objects of art. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM THE OXALATE FILMS :origin and significance in the conservation of works of art, Milão. 1989. **Proceedings**, Milão, 1989. p.337-347.
- KRUMBEIN, W.E., URZI, C.E.; GEHRMANN, C. On the biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass. **Geomicrobiology Journal**, v.9, p.139-160, 1991.
- KRUMBEIN, W.E.; DYER, B.D. The planet is alive. Weathering and biology, a multi-faceted problem. In: Drever,J.J.; Reidel, D., ed.. **The chemistry of weathering**. Dordrecht: J.J. Drever & D. Reidel, 1985. p.143-160.
- KRUMBEIN, W.E.; JENS, K. Biogenic rock varnishes of the Negev desert (Israel) an ecological study of iron and manganese transformation by cyanobacteria and fungi. **Oecologia**, v.50, p.25-38, 1981
- KRUMBEIN, W.E.; LANGE, C. Decay of plaster, painting and wall material of the interior of buildings via microbial activity. In: Krumbein, W.E. ed. **Environmental biogeochemistry and geomicrobiology: the terrestrial environment**. Michigan: Ann. Arbor Science Publ., 1978. p.687-697.
- KRUMBEIN, W.E.; SCHONBORN-KRUMBEIN, C.E. Biogene Bauschaden-Anamnese, Diagnose und Therapie in Bautenschutz und Denkmalpflege. **Bautenschut/Bausanierung**, v.10, p.14-23, 1987.
- KRÜMMEL, A. Dissertação de Doutorado, Universidade de Hamburgo, 1978.
- KUROCZIN, BODE, K., PETERSEN, K., KRUMBEIN, W.E. Some physiological characteristics of fungi isolated from sandstones. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 6, Torun, 1988. **Supplementary Acts**. Torun: Ed. Nicolaus Copernicus Univ. 1988. p.21-25.
- KÜSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v.202, p.928-929, 1964.
- KUTUZOVA, R.S. Possible ways of mineral weathering in alkaline soils. **Soviet Soil Science**, 5, p.111-116, 1973.
- LEWIS, F.J.; MAY, E., BRAVERY, A.F. Metabolic activities of bacteria isolated from building stone and their relationship to stone decay. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N. EGGIN, W.O.W., ed. **Biodeterioration**. ed. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.107-112.
- LEZNICKA, S., KUROCZKIN, KRUMBEIN, W.E., STRZELCZYK, A.B.; PETERSEN, K. Studies on the growth of selected fungal strains on limestones impregnated with siliconeresins (Steinfestiger H and Elastosil E-41). **International Biodeterioration**, v.28, p.91-111, 1991.
- LINDLEY, N.D., PEDLEY, J.F., KAY, S.P.; HEYDEMAN, M.T. The metabolism of yeasts and filamentous fungi which degrade hydrocarbon fuels. **International Biodeterioration**, v.22, p.281-287, 1986.
- LOWRY, O.H., ROSEN BROUGH, N.J., FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

- MARCHESINI, L.; BONORA, R. The use oil silicon resin in the conservation and protection of stone. In: LAZZARINI, L.; PIEPER, R., Ed **The deterioration and conservation of stone. Studies and documents on the cultural heritage.** Veneza: Unesco, 1987. p.317-328.
- MASON-WILLIAMS, M.A. The growth of fungi in caves in Great Britain. **Studies in Speleology**, v.1, p.96-99, 1965.
- MAY, E.; LEWIS, F.J.; PEREIRA, S.; TAYLER, S.; SEAWARD, M.R.D.; ALLSOPP, D. Microbial deterioration of building stone - a review. **Biodegradation Abstracts**, v.7, n.2, p.109-123, 1993.
- MILLER, J.D.A.; KING, R.A. Biodeterioration of metals. In: GILBERT, R.J.; LOVELOCK, D.W. **Microbial aspects of the deterioration of materials.** London: Academic Press, 1975. p.84-103.
- PALMER, R.J. Microbial communities involved in the weathering of three historic buildings in northern Germany. In: SCIENCE, technology and european cultural heritage. **Proceedings of the European Symposium**, Bolonha, 1989, p.478-480.
- PARBERY, D.G. Isolation techniques and identification of fungal biodeteriogens from soil. In: Walters, A.H., ed. **Biodegradation investigation techniques.** London: Applied Science, 1977. p.123-148.
- PETERSEN, K.; KUROCKIN, J.; STRZELCZYK, A.B.; KRUMBEIN, W.E. Distribution and effects of fungi on sandstones. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N.; EGGIN, H.O.W., EDS. **Biodegradation.** 7. ed. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.123-128.
- POCHON, J.; JATON, C. The role of microbial agencies in the deterioration of stone. **Chemistry and Industry**, v.9, p.1587-1589, 1967.
- RESENDE, M.A.; REZENDE, G.C.; VIANA, E.M.; BECKER, T.W.; WARSCHIED, T. Acid production of fungi isolated from stones of historical monuments of State of Minas Gerais Brazil. In: LABS 2 -Second Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium. **Abstracts Book.** Gramado, 1995. p.28.
- RESENDE, M.A.; LEITE, C.A.; WARSCHIED, T.; BECKER, T.W.; KRUMBEIN, W.E. In: LATORRE, W.C.; GAYLARDE, C., ed. Microbiological investigations on quartzite and soapstone of historical monuments in Minas Gerais. Brazil. **Anais do First IABS: Latin American Biodegradation Symposium**, Campos do Jordão, 1992. p.17-22.
- RIPPKA, R.; DERULLES, J.; WATRERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignment, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v.111, p.1-61, 1979.
- ROSSI-MANARESI, R.; TUCCI, A. Pore structure and the disruptive or cementing effect of sair crystallization in various types of stone. **Studies in Conservation**, v.36, p.53-58, 1991.
- SAIZ-GIMENEZ, C. Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. In: LLEWELLYN, G.C.; DASHEK, W.V.; OREAR, C.E., ed. **Fourth Meeting of the Pan American Biodeterioration Society.** New York: Plenum Press, 1991. 686p. p.587-604.
- SAVORY, J.G. Breakdown of timber by Ascomycetes and Fungi Imperfecti. **Annals of Applied Biology**, v.41, p.336-347, 1954.
- SAVULESCU, A.; IONITA, J. Contributions to the study of the biodeterioration of the works of art and historic monuments. I. Species of fungi isolated from frescoes. **Review Roumane of Biology and Botany**, v.16, p.201-206, 1971.
- SCHARTZ, A. Soil microorganisms and soil chelation. The pedogenic action of lichens and lichen acids. **Agricultural and Food Chemistry**, v.II, p.112-118, 1963.
- SCHARTZ, A.; SCHARTZ, V.; MARTIN, J.J. Chelation as a biochemical weathering factor. **Geological Society of America Bulletin**, v.68, p.1792-1793.
- SILVERMAN, M.P.; MUÑOZ, E.F. Fungal attack on rock: solubilization and altered infrared spectra. **Science**, v.169, p.985-987, 1970.
- SILVERMAN, M.P. Biological and organic chemical decomposition of silicates. In: TRUDINGER, P.A.; SWAINE, D.J., ed. **Studies in environmental science.** New York: Elservier, 1979. p.444-465.
- SILVERMAN, M.P.; EHRLICH, H.L. Microbial formation and degradation of minerals. **Advances in Applied Microbiology**, v.6, p.152-206, 1964.
- STEVENSON, F.J. Organic acids in soil. In: McLAREN, A.D.; PETERSON, G.H., ed. **Soil Biochemistry 1.** New York: Mareel Dekker, 1967. p.119-146.
- STOTZKY, G. Techniques to study interactions between microorganisms and clay minerals in vivo and in vitro. **Bulletins from the Ecological Research Committee**, v.17, p.17-28, 1973.
- STRZELCZYK, A.B. Microbial Biodeterioration: Stone. In: ROSE, A.H., ed. **Economic microbiology.** London: Academic Press, 1981. p.61-80.
- STRZELCZYK, A.B. Influence of antifungal vapors on spore germination of fungi isolated from deteriorated old books. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, p.901-906, 1968.
- UPSHER, E.J. Microbial attack on materials. In: **Proceedings of Royal Australian Chemical Institute**, v.43, p.173-176, 1976.

- URZI, C.E.; KRUMBEIN, W.E.; WARSCHIED, T. On the question of biogenic colour changes of mediterranean monuments (coating - crust - microstomatolite - patina - scialbatura-skin - rock varnish). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MONUMENTS IN THE MEDITERRANEAN BASIN, 2., Genebra, 1991. Proceedings, Genebra, 1991, p.397-420.
- VON PLEHWE-LEISEN, E., WENDLER, E., SNETHLAGE, R., KLEMM, D., CASTELLO BRANCO, E., SANTOS, A.E Summary of the interdisciplinary results of the working groups. In: BIANCHI, H. K., IDEAS - Investigations into Devices against Environmental Attack on Stones. Geesthaet: GKSS Forsch. Geesthaet GmH, 1994, p.17-42.
- WAINWRIGHT, M. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil - a review. *Transactions of the British Mycology Society*, v.90, p.159-170, 1988.
- WARSCHIED, T. Untersuehungen zur Biodegradation von Sandstein unter Besorender Berueksichtigung der Chemoorganotrophen Bakterien. Oldemburgo: Universidade de Oldemburgo, 1990. Tese, Doutorado.
- WARSCHIED, T.; OELTING, M.; KRUMBEIN, W.E. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *International Biodeterioration*, v.28, p.37-48.
- WARSCHIED, T.; PETERSEN, K.; KRUMBEIN, W.E. A rapid method to demonstrate and evaluate microbial activity on decaying sandstone. *Studies in Conservation*, v.35, p.137-147, 1990.
- WARSCHIED, T.; BECKER, T.W.; RESENDE, M.A. Biodeterioration of stone: a comparison between sub-tropical and moderate climate zones. In: LABS 2- Second Latin Ameriean biodegradation and Biodeterioration Symposium. *Abstracts Book*. Gramado, 1995, p.31.
- WARSCHIED, T.; PETERSEN, K.; KRUMBEIN, W.E. Physiological characterization of chemoorganotrophic bacteria isolated from sandstone. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 6., Torun, 1988. *Supplementary, Acts. Torun*: Nicolaus Copernicus Univ. 1988, p.26-32.
- WATCHMAN, A.L. Age and composition of oxalate-rich crusts in the northern territory, Australia. *Studies in Conservation*, v.36, p.24-32, 1991.
- WAZNY, J. The influence of rock-destroying fungi on concrete. In: OXLEY, T.A.; ALLSOPP, D.; BECKER, G. ed. *Biodeterioration*. London: Pitman, 1980, p.59-62.
- WEBLEY, D.M.; HENDERSON, M.E.L.; TAYLOR, I.E The microbiology of rocks and weathered stones. *Journal of Soil Science*, v.14, p.102-112, 1963.
- WILLIAMS, M.E.; RUDOLPH, E.D. The role of lichens and associated fungi in the chemical weathering of rock. *Mycologia*, v.66, p.648-660, 1974.
- WITTENBURG, C. Trockene Schadgas und Partikeldeposition auf verschiedene Sandsteinvarietäten unter besorender Berueksichtigung atmosphárischer Einflugrónen. Schriftenreihe Angewandte analytik n.22. Hamburgo: Universidade de Hamburgo, 1994. Tese, Doutorado.
- WOOD, P.A.; MACRAE, I.C. Microbial activity in sandstone deterioration. *International Biodeterioration Bulletin*, v.8, p.25-27, 1972.

*Monitoramento Químico de Áreas
Contaminadas: Tecnologias de
Campo*

René P. Schneider



I. Introdução

O grande desenvolvimento da indústria química desde o século 19 foi o principal fator que viabilizou o rápido avanço da sociedade humana em todos os campos da tecnologia. No século 20, a fabricação em massa barateou o preço de artigos de consumo tornando-os acessíveis a uma ampla faixa da população em países industrializados, o que causou uma expansão considerável da capacidade produtiva, principalmente nos países mais ricos. No final do século, a automação crescente da fabricação dos produtos de consumo e a transferência das fábricas dependentes de mão de obra numerosa para os países em desenvolvimento, disseminou os hábitos da sociedade de consumo para países mais pobres. O aumento da produção industrial correu em paralelo a uma vertiginosa expansão da contaminação ambiental em todas as etapas do processo produtivo. A indústria de recuperação de áreas degradadas nasceu nos EUA, na Europa e no Japão em meados da década de 70 do século 20, se expandiu vertiginosamente nestes países no final do século 20 com a implementação de legislação ambiental mais restritiva por parte dos governos destes países. No Brasil as atividades comerciais de recuperação de áreas industriais contaminadas foram iniciadas de forma mais consistente na década de 90 do século 20 e se encontram em rápida expansão desde no início do século 21.

A recuperação de uma área contaminada com produtos industriais ocorre em etapas, indicadas na Figura 1. O processo é desencadeado pela notificação, por um orgão de controle ambiental ou por decisão dos proprietários de um terreno potencialmente contaminado de vendê-lo ou de mudar o padrão de uso. Primeiro é feito um levantamento do histórico das atividades geradoras de poluentes conduzidas no local que envolve essencialmente pesquisa de arquivos e, no caso de unidades industriais, entrevistas com especialistas condecorados dos processos produtivos e

com funcionários ativos e aposentados da empresa. A dificuldade de obtenção de informações nesta etapa é variável. No caso de depósitos clandestinos de resíduos não há, geralmente, registros sobre a quantidade e o tipo de resíduos depositados. Em áreas industriais que estiveram em uso continuado por muitas décadas, a maior dificuldade é a perda da memória sobre os processos de produção e os insumos empregados em tempos

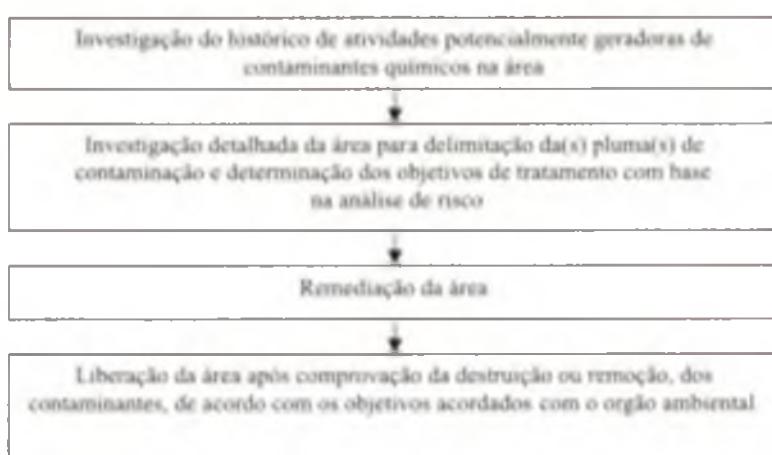


FIGURA 1. Representação esquemática do processo de análise e remediação de uma área contaminada.

anteriores aos da geração atual dos funcionários da empresa. O levantamento desta informação se torna mais difícil se ocorreu troca freqüente de donos da área no passado.

O principal resultado desta análise inicial é a elaboração de uma lista de contaminantes possivelmente presentes na área. Na etapa seguinte, a concentração e a distribuição destes contaminantes no solo e na água será determinada através da coleta e análise de amostras de campo. Estes dados serão empregados, entre outros, para conduzir uma análise de risco, que determinará se haverá ou não necessidade de remediação da contaminação. Em caso afirmativo, a próxima etapa consistirá na elaboração e implementação de um processo de remediação, que será concluído quando as concentrações de contaminantes no solo e na água tiverem sido reduzidas aos níveis acordados com os órgãos ambientais.

A análise de contaminantes é essencial para praticamente todas as etapas do processo de recuperação de uma área contaminada. Cerca de 25% dos recursos empenhados na recuperação de áreas contaminadas nos EUA, em 1996, foram gastos com análise química de poluentes. A estimativa sobre a proporção do custo total gasto com análise química nas diferentes etapas do processo no Brasil está indicada na Tabela 1.

TABELA 1. Estimativa dos custos das diversas etapas de caracterização de áreas contaminadas.

Etapa	Custo de análise química (em %) do total gasto na etapa			
	Plumas de baixa complexidade ¹			Plumas de alta complexidade ¹
	Pequenas	médias	grandes	
Estudo preliminar	-	-	-	-
Caracterização da área	50%	40%	30%	60%
Preparo do plano de remediação	-	-	-	-
Remediação		30%	30%	30%
Validação	80%	70%	70%	90%

¹Pluma de baixa complexidade: vazamento de combustível, entre outros. Pluma de alta complexidade: mistura de poluentes (metais pesados, hidrocarbonetos, organoclorados) como ocorre tipicamente em aterros clandestinos.

2. Monitoramento químico de poluentes

O objetivo da análise química de amostras de uma área contaminada é identificar os contaminantes presentes, delinear a zona afetada pela contaminação e, principalmente, fornecer as informações fundamentais para uma análise de risco e definição de uma estratégia para a redução deste risco. Apesar de sua aparente simplicidade, estas duas tarefas são, na verdade, extremamente complexas, e sujeitas a muitas incertezas. A análise de risco geralmente é baseada na média das concentrações de poluentes da área. A elaboração de planos de remediação para redução do risco depende da correta identificação dos segmentos mais poluídos, que deverão ser tratados prioritariamente. A minimização dos custos de remediação também depende da delimitação correta das áreas do terreno, com concentrações de poluentes abaixo dos limites de segurança que não necessitam de tratamento.

A distribuição de poluentes em uma área contaminada normalmente não é homogênea. No caso de vazamentos de líquidos de tanques enterrados, o material vazado pode não ser visível na superfície. Depósitos ilegais ou mesmo legais de resíduos, geralmente incluem áreas com grande quantidade de resíduos, por exemplo tambores com resíduos enterrados ou empilhados na superfície, intercaladas com zonas sem resíduos (áreas de passagem).

A ação da chuva e do vento sobre resíduos armazenados a céu aberto pode criar zonas de contaminação secundária ao longo de calhas de drenagem ou na superfície pelo espalhamento de poluentes pelo vento. Vazamentos de sólidos ou líquidos geram plumas onde a concentração de poluentes varia ao longo de um gradiente. A heterogeneidade geológica das camadas de solo pode criar bolsões descontínuos de poluentes de difícil detecção.

O desenvolvimento de protocolos que permitam um mapeamento correto e detalhado da distribuição de poluentes em uma área contaminada, a um custo aceitável, é um desafio ainda não resolvido pela ciência (CRUMBLING *et al.*, 2003). Erros ou inconsistências de análise nesta etapa podem comprometer profundamente a qualidade de todas as ações seguintes de remediação. As potenciais fontes de erros na caracterização de áreas contaminadas podem ser divididas em duas categorias: (a) erros produzidos por problemas na análise laboratorial dos poluentes, e (b) erros produzidos pela não representatividade das amostras coletadas e analisadas.

Efeitos de matriz e os limites muito baixos de contaminantes em amostras ambientais, comumente na faixa de poucos $\mu\text{g/L}$ de água ou $\mu\text{g/kg}$ de solo dificultam muito a análise de amostras, tornando necessário o emprego de equipamentos sofisticados para a extração dos poluentes das amostras e para a sua quantificação em equipamentos analíticos. O elevado custo de análises laboratoriais ((por amostra: R\$ 130 para análise de hidrocarbonetos aromáticos de petróleo do grupo do BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), R\$ 300 para PAH (hidrocarbonetos poliaromáticos) em solos, R\$ 2.300 para análise de dioxinas, R\$ 350 para análise de PCBs, entre outros.)) representa um forte incentivo para a minimização da quantidade de amostras analisadas de uma área contaminada, o que pode comprometer a caracterização da área e o planejamento adequado de etapas posteriores de remediação.

Os erros de análise laboratorial de poluentes podem ser quantificados com relativa facilidade através do emprego de métodos de controle da qualidade analítica dos procedimentos consolidados. Dificuldades de natureza mais fundamental se colocam, porém, na comprovação de concentrações de poluentes próximos dos limites muito reduzidos, próximos dos limites de quantificação, ou pior, de detecção dos métodos analíticos, comumente estipulados pelos órgãos ambientais. O primeiro fator importante que deve ser avaliado na análise de poluentes em níveis próximos dos limites da metodologia é a maior variabilidade estatística da análise de compostos na região das curvas de calibração (Figura 2).

Na análise de água, por exemplo, o desvio padrão na análise laboratorial de replicatas é de cerca de $\pm 20\%$ no caso de amostras com compostos com concentrações acima de $10 \mu\text{g/L}$, e de $\pm 40\%$ para concentrações abaixo deste limite. Uma segunda dificuldade é a interpretação de dados de replicatas que incluem resultados abaixo do limite de detecção.

Consideremos um caso hipotético onde o limite máximo permitido estipulado pelos órgãos ambientais para um poluente é de cerca de $2 \mu\text{g/L}$, e onde foram obtidos os seguintes resultados na análise de 5 amostras de água: $4 \mu\text{g/L}$, $3 \mu\text{g/L}$, $1,5 \mu\text{g/L}$ e 2 amostras abaixo do limite de detecção de $0,7 \mu\text{g/L}$. O problema que se põe neste caso é como computar os resultados das duas amostras com concentração abaixo do limite de detecção. Se estes resultados forem computados como 0, então a média de valores das 5 amostras será de $1,7 \mu\text{g/L}$, um resultado inferior ao limite estipulado pelos órgãos ambientais. Se os dois resultados abaixo do limite de detecção forem descartados da análise, a média será de $2,8 \mu\text{g/L}$, e se os resultados destas amostras forem considerados equivalentes ao limite de detecção do método, a média será de $2,5 \mu\text{g/L}$, ambos valores acima do limite máximo estipulado para o composto. Qual das abordagens é a correta? E como incluir nesta análise a consideração de que, na realidade, o desvio padrão de cada um destes valores é de cerca de $\pm 40\%$? O limite inferior deste valor de desvio padrão indicaria que 4 das 5 amostras estariam em conformidade com o limite estipulado.

Os desafios a serem vencidos para obter uma descrição adequada da distribuição de poluentes em uma área contaminada serão ainda maiores, quando for incluída na análise a heterogeneidade da distribuição de poluentes tipicamente encontrada em áreas contaminadas e a dificuldade de amostragem destes ambientes. A amostragem em campo pode ser feita por meio de coletas de pequeno volume do material, que deve ser acondicionado em pequenos frascos e transportado para o laboratório para posterior análise. Dessa maneira, evita-se perda da representatividade dos resultados (ROY & FOUILLAG, 2004).

A dificuldade de amostragem se dá pelas características próprias de solos e aquíferos contaminados, onde a contaminação, freqüentemente, é invisível porque poluentes podem ser extremamente tóxicos em quantidades muito reduzidas relativas à quantidade de solo, e pela impossibilidade de acessar o compartimento subterrâneo, que depende da instalação de poços de monitoramento, equipamentos relativamente caros que, na região de São Paulo, custavam, no final de 2005, cerca de R\$ 150/metro para a perfuração e R\$ 220/poço para o acabamento e desenvolvimento. O elevado custo da implementação de poços de monitoramento e de coleta de perfis de solo limita o emprego desta técnica de monitoramento a um número mínimo de poços. O desconhecimento sobre a posição exata de plumas no subsolo transforma a decisão sobre a localização dos poços em uma loteria. Procedimentos avançados de geofísica que permitem o delineamento remoto de anomalias do campo magnético ou da condutividade elétrica do subsolo através de, por exemplo, emprego de *ground penetrating radars*, permitem identificar com maior precisão a localização de pontos

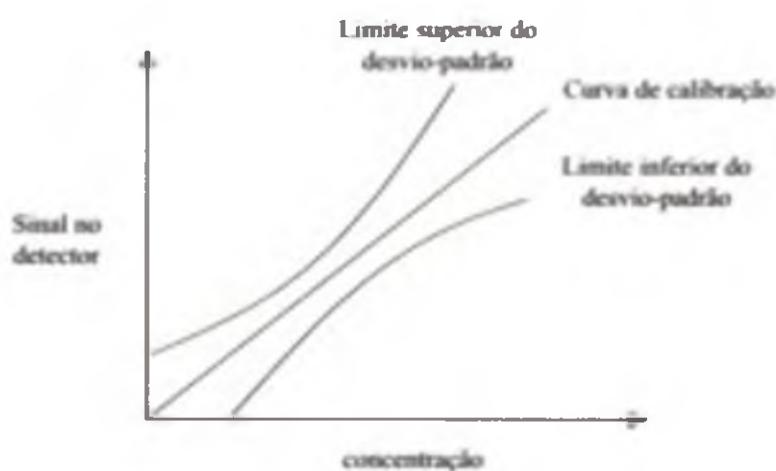


FIGURA 2. Representação esquemática do desvio-padrão de análises em diferentes pontos e uma curva de calibração.

impactados por grandes quantidades de poluentes no subsolo e reduzem, mas não eliminam, o risco de não-interceptação de plumas por poços de monitoramento. A perfuração de poços em áreas contaminadas, sem detalhamento geológico na microescala, está associado ao risco de contaminação cruzada de extratos limpos por poluentes percolados das zonas impactadas ao longo da parede do poço.

Outro grande desafio na caracterização de uma área contaminada é o problema da heterogeneidade da distribuição de poluentes no ambiente. Em um estudo comparativo da variabilidade analítica de métodos laboratoriais e de campo para a análise de explosivos, Jenkins *et al.* (1996) constataram que 95% da variabilidade dos resultados devia-se à heterogeneidade da distribuição do poluente no solo, e somente 5% a todos os outros fatores, que incluíam a variabilidade entre métodos analíticos (métodos laboratoriais e de campo). Neste estudo, 7 amostras de solo foram coletadas com amostradores cilíndricos de 2 polegadas de diâmetro e 6 polegadas de profundidade. Os pontos de coleta estavam distribuídos em intervalos regulares ao redor do perímetro de um círculo com diâmetro de 4 pés, e uma amostra foi coletada do centro do círculo. Cada amostra de solo foi homogenizada antes da análise. Os valores mínimos e máximos de TNT variaram entre 136 e 43000 mg/kg, o que demonstra a enorme dificuldade de caracterização adequada de uma área contaminada pela amostragem aleatória de um número pequeno de amostras. Esta heterogeneidade não está restrita à análise de solos de superfície.

Apesar de aparentemente mais simples e menos sujeito a variabilidade pela complexidade da matriz, diferenças de condutividade hidráulica e de composição química de camadas de solo podem causar uma estratificação significativa da coluna de água no interior de um poço de monitoramento. Roy & Fouillac (2004) analisaram poços de cerca de 14 m de profundidade localizados em uma área contaminada com metais. Enquanto a água de um destes poços não apresentava estratificação, com concentrações uniformes de metais pesados e propriedades físicoquímicas, um segundo poço localizado a cerca de 200 m de distância apresentou estratificação significativa, com um teor de chumbo cerca de 6 vezes maior na camada superior da água do poço, comparado ao teor do poluente nas camadas intermediária e inferiores deste poço. Esta heterogeneidade foi confirmada na análise de outros íons presentes na água. A descrição correta da distribuição de poluentes no aquífero em poços com estratificação, demanda a coleta e análise de um número maior de amostras do que em poços com água de composição homogênea. Estes autores descreveram estratificações semelhantes em poços de monitoramento de compostos organoclorados de uma área industrial.

Os protocolos analíticos geralmente demandam a análise de quantidades muito pequenas de amostra, o que introduz uma dificuldade adicional considerável na obtenção de resultados representativos para amostras de solo. Como ilustração, Crumbling *et al.* (2003) estimaram que somente cerca de 1 bilionésimo do volume de solo contaminado com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e metais de uma área contaminada de um depósito de ferro-velho foram analisadas em um programa atípicamente intensivo (em termos comerciais) de análises. Em linhas gerais, um painel instituído pela United States Environmental Protection Agency (EPA) em 1991 para analisar os fatores responsáveis pela variabilidade dos resultados de análise de

poluentes de amostras ambientais concluiu que entre 70% a 90% desta variabilidade deve-se à heterogeneidade natural da distribuição dos poluentes nas amostras, e somente de 10% a 30% a efeitos de análise (amostragem, armazenamento, processamento e análise dos poluentes) (HOMSHER, 1999). Este painel concluiu que a melhoria da qualidade da definição da distribuição de poluentes, em uma área contaminada, depende muito mais de metodologias que permitam uma melhor descrição da variabilidade natural da distribuição dos poluentes do que do aperfeiçoamento das análises laboratoriais.

3. Classificação dos dados analíticos gerados

A classificação do padrão de qualidade de dados analíticos gerados no delineamento de plumas é essencial para a definição dos dados que serão utilizados na tomada de decisões. Em linhas gerais, os dados se inserem dentro de uma das seguintes categorias:

a) Dados de qualidade conhecida:

São dados produzidos com métodos onde a variação estatística dos resultados está adequadamente documentada para as etapas da coleta das amostras no campo, preservação das amostras durante o transporte para o local de análise, subamostragem para análise (por exemplo: 1 kg de amostra de solo é coletada mas somente 1 grama é analisado pelo equipamento após homogeneização), análise química (limites de detecção e quantificação, precisão, repetibilidade, efeitos de matriz, e outros.).

b) Dados de qualidade desconhecida:

São dados obtidos pelos métodos descritos acima, para os quais faltam informações de controle de qualidade sobre etapas do processo.

c) Dados com qualidade adequada para a tomada de decisões:

Trata-se de dados de qualidade conhecida que atendem os critérios de qualidade estabelecidos na etapa de planejamento para a tomada de decisões, como por exemplo, limites de detecção adequados para o delineamento da pluma, a análise de risco, a identificação dos pontos mais contaminados que terão de ser remediados, e outros.

d) Dados de “screening”

Dados com qualidade conhecida, mas insuficiente para atender aos padrões de qualidade estabelecidos para dados de tomada de decisões. Nesta categoria se incluem dados obtidos com métodos de análise de campo rápidos, cuja sensibilidade é insuficiente para os padrões estabelecidos na legislação, que permitem um delineamento provisório da pluma e a seleção de pontos de amostragem para análise por métodos mais caros, que atinjam os limites de quantificação estabelecidos pela legislação.

e) Dados acessórios

Trata-se de um conjunto de dados que, de forma independente, não seriam de qualidade adequada para tomada de decisões, mas que, em conjunto com dados de qualidade adequada, permitem reduzir as incertezas associadas à interpretação dos

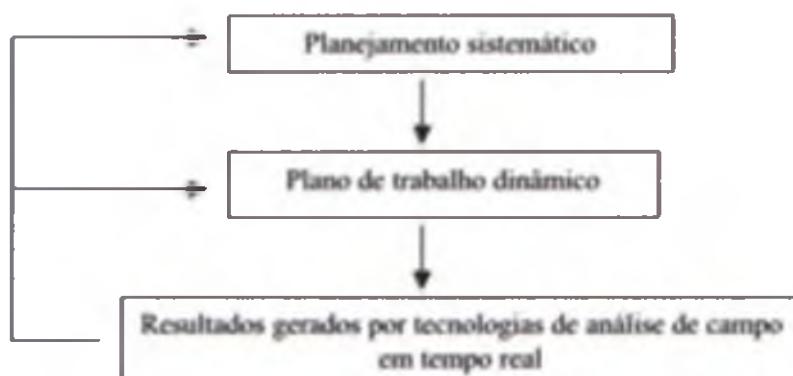


FIGURA 3. Representação esquemática do papel de kits de *screening* na caracterização de uma área contaminada.

dados de tomada de decisões. Nesta categoria estão contemplados dados levantados em grande quantidade por métodos de *screening* (d), que utilizados em conjunto com dados em quantidade muito menor, obtidos por métodos convencionais de análise, permitem definir a representatividade destes últimos para o delineamento da pluma de contaminação (Figura 3).

4. O Processo dinâmico de caracterização de uma área contaminada

O procedimento tradicional de coleta e análises de amostras de poluentes em áreas contaminadas para delimitação de plumas é baseado em um plano de amostragem fixo onde são detalhados a localização dos pontos de coleta, a quantidade de amostra a ser coletada em cada ponto e o tipo de parâmetros químicos que será analisado para cada amostra. A grande desvantagem desta programação fixa é a falta de dinamismo para a adequação rápida do plano de trabalho, que geralmente ocorre após o término da bateria de análises das amostras coletadas em uma campanha de amostragem e da subsequente avaliação dos resultados em reuniões conjuntas entre representantes do cliente e da empresa de consultoria. Eventuais discrepâncias de resultados ou falhas na informação demandarão uma nova campanha de amostragem no campo, com mobilização de técnicos para a coleta de amostras para envio aos laboratórios de análise. Dependendo dos resultados, serão necessárias mais rodadas de reuniões e de campanhas de coleta. Este processo é extremamente moroso, ineficiente e caro, pois a falta de flexibilidade de planejamento e na condução dos trabalhos não permite se estabelecer um fluxo de trabalho racional.

Um grupo de trabalho da EPA elaborou, com base nesta análise do processo convencional, uma nova abordagem para a caracterização de áreas contaminadas, cujo foco principal é a flexibilização do plano de trabalho pela incorporação de métodos de análises de campo no processamento analítico das amostras (Figura 4) (ROBBAT, 1997).

Os pilares desta metodologia denominada de tríade são: (a) planejamento detalhado e sistemático dos trabalhos com definição clara dos objetivos de qualidade de dados das análises químicas e da análise de risco (reuso da área para fins industriais ou domésticos, e outros); (b) foco principal dos trabalhos de caracterização na definição precisa da heterogeneidade da distribuição de poluentes na área; (c) adoção de estratégias dinâmicas de trabalho, que são continuamente adaptadas em função dos resultados obtidos, e (d) geração de dados de análise química em tempo real, que permitam a interpretação rápida dos resultados para replanejamento da estratégia de

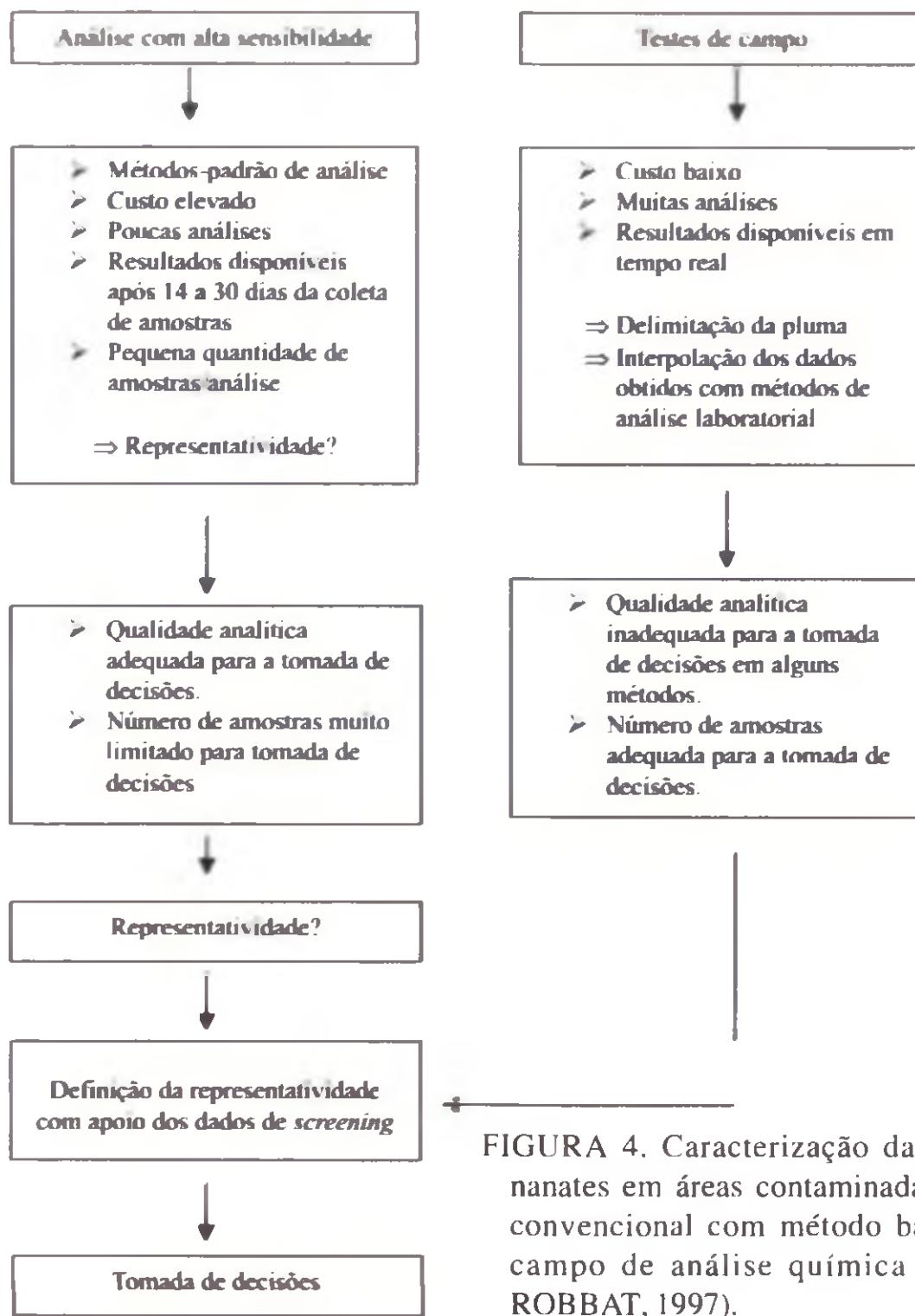


FIGURA 4. Caracterização da distribuição de contaminantes em áreas contaminadas: comparação do método convencional com método baseado em tecnologias de campo de análise química (modificado a partir de ROBBAT, 1997).

amostragem, e também a redução do tempo decorrido entre a coleta e a análise laboratorial das amostras e as incertezas e custos associados ao processo.

A essência da abordagem dinâmica na caracterização de áreas contaminadas é o fato de os planos de trabalho dinâmicos especificarem, primordialmente, os critérios para a tomada de decisões que serão adotadas em campo para identificar os compostos que serão analisados, definir os locais de coleta das amostras e decidir quando as informações coletadas serão adequadas para a conclusão dos trabalhos.

O processo dinâmico de caracterização de áreas contaminadas envolve as seguintes etapas (ROBBAT, 1997):

a) Definição da equipe técnica responsável pelo projeto

Este corpo técnico deverá incluir especialistas das áreas de geologia, hidrogeologia, geoquímica, geofísica, química analítica e análise de risco. As responsabilidades desta equipe incluem o gerenciamento do processo de coleta e

análise de dados, definição e supervisão de procedimentos de análise e controle da qualidade dos procedimentos técnicos e analíticos adotados no projeto, modelagem matemática dos processos de transporte e transformação dos poluentes na área, definição da necessidade ou não de remediação, análise de risco e segurança do trabalho. As responsabilidades específicas desta equipe serão as seguintes:

- Analisar todos os dados disponíveis sobre a área contaminada.
- Desenvolver um modelo conceitual inicial para a dinâmica da distribuição de poluentes na área.
- Definição dos objetivos do projeto.
- Supervisão dos trabalhos de campo, ajustes do modelo conceitual inicial com base nos resultados parciais produzidos nos trabalhos.
- Avaliação do modelo conceitual e das decisões tomadas com relação às normas e leis das legislações ambientais municipais, estaduais e federais.

Como esta equipe ficará responsável pela tomada de decisões no campo, será necessário designar um membro da equipe como líder do projeto, para garantir a progressão continuada dos trabalhos dentro dos prazos e orçamentos acordados entre as partes contratantes. A permanência contínua de todos os membros desta equipe no campo não é indispensável para o sucesso dos trabalhos. É necessário garantir, porém, que pelo menos um membro da equipe esteja sempre presente na área, e que a tecnologia de informação garanta o acesso contínuo a um banco de dados com todas as informações do projeto a todos os membros da equipe. A tecnologia de informação também deveria garantir a possibilidade de organizar conferências por via eletrônica entre todos os membros da equipe, com rapidez.

b) Elaboração do modelo conceitual inicial da área

O modelo conceitual inicial contém todas as informações disponíveis sobre a área no início do projeto. Este modelo deveria conter informações tridimensionais sobre a geologia e hidrogeologia da área, sobre os caminhos preferenciais de difusão da(s) pluma(s) de poluente(s), além do mapeamento detalhado da localização de ruas, prédios, poços, tanques e aterros. Este modelo conceitual será modificado e aprimorado com as informações geradas dos trabalhos de caracterização da área.

c) Definição dos padrões de qualidade dos dados que serão levantados no projeto

A definição do padrão de qualidade para os dados (PQD) que serão gerados com cada método empregado em cada etapa do projeto, é fundamental para a obtenção de informações com qualidade adequada para a tomada de decisões. Essencialmente, o PQD estabelece a conexão entre as decisões e os dados necessários para melhor fundamentá-las, quais sejam:

- Definição do problema: descrição concisa do projeto, com detalhamento dos objetivos científicos e técnicos. Deve incluir revisão de todas as informações já disponíveis sobre a área.
- Identificar as decisões necessárias para a resolução de cada problema identificado.

- Definir os tipos de informação indispensáveis para a tomada de decisões específicas.
- Definir um padrão de qualidade para cada tipo de informação que será gerada no projeto.
- Definir os limites geográficos de validade para cada tipo de decisão, e os prazos para a tomada destas decisões.
- Estabelecer critérios de decisão. Criar regras para a consideração de resultados já obtidos na tomada de decisões.
- Definir os limites para cada linha de ação, com o objetivo de identificar critérios que permitam interromper as atividades, se os resultados adicionais esperados não se justificarem em função de análise de custo/benefício.
- Revisar o modelo conceitual e as definições de qualidade de dados à luz dos resultados obtidos.

A definição de PQDs é possível somente para procedimentos e processos cuja relação com a tomada de decisões esteja claramente definida. Em termos genéricos, três categorias de PQD deverão ser definidas durante o processo de caracterização e remediação de uma área contaminada:

- PQDs para identificação dos contaminantes presentes na área e delineamento de sua distribuição.
- PQDs para obtenção de dados para análise de risco.
- PQDs para demonstrar conformidade dos trabalhos de remediação com as concentrações-limite acordadas com os órgãos ambientais.
- PQDs para separação de solo contaminado de solo não contaminado para posterior tratamento.

Um subproduto importante do processo de definição de PQDs é a identificação de oportunidades para a aplicação de testes rápidos de campo. Para cada método analítico deverão ser desenvolvidos protocolos e definidos os critérios de aceitabilidade para os seguintes parâmetros:

Precisão: a precisão, definida como o desvio-padrão dos resultados de análises de réplicas de amostras, é um indicador da reprodutibilidade da análise das amostras pelo método analítico. A precisão varia dependendo da concentração do analito, ela é menor nos extremos da curva de calibração e maior no centro. Um fator importante que condiciona a precisão de análise é a seletividade do método, definida como a capacidade de separar seletivamente os analitos de interesse dos outros componentes da amostra. Outro fator que condiciona a precisão de análise é o limite de detecção do método.

Accuracy: este parâmetro é um indicador da fidelidade do método, e é determinado por meio da análise de amostras-controle com quantidade conhecida de analito.

Eficiência de recuperação: este parâmetro é determinado através da análise de amostras fortificadas com uma quantidade conhecida de analito. Esta técnica de controle de qualidade permite avaliar a influência da matriz das amostras no método analítico. O PQD deve estabelecer limites de aceitabilidade para os valores de recuperação do analito, que em um método ideal deveria ser de 100%, mas na realidade pode variar de 70% a 140%, dependendo das propriedades físicoquímicas do poluente e da complexidade da matriz.

Amostras de avaliação de desempenho: estas amostras são semelhantes às utilizadas para determinação da precisão e são inseridas periodicamente nas campanhas de análise para verificar se a qualidade dos resultados produzidos está em conformidade com os padrões do projeto.

Amostras confirmatórias: são amostras de campo enviadas para análise por laboratórios convencionais para confirmação dos dados obtidos com os métodos de campo.

Representatividade: a representatividade não depende do método analítico, mas da heterogeneidade da distribuição dos poluentes na área contaminada. O PQD deve estabelecer critérios para comprovar a representatividade dos dados, para garantir que os dados refletem corretamente a heterogeneidade da distribuição dos poluentes no local.

d) Elaborar procedimentos operacionais padrão (POP)

Todos os procedimentos que serão conduzidos na área deverão ser documentados e padronizados, inclusive com definição dos objetivos de qualidade dos dados e dos critérios de controle de qualidade. Os POPs deverão ser elaborados pela equipe técnica do projeto e aprovados pelos órgãos governamentais pertinentes antes do início dos trabalhos de campo.

e) Estabelecer um plano de manejo de dados

O sucesso do procedimento dinâmico de caracterização de áreas contaminadas depende do acesso fácil e rápido, pelos membros da equipe, aos dados do projeto. A integração efetiva de dados químicos, geológicos, hidrogeológicos, geofísicos e, eventualmente, biológicos, gerados no projeto, depende do desenvolvimento de protocolos seguros e bem definidos de descrição e rastreamento de dados e análises. A apresentação dos dados deve ocorrer de forma a facilitar a sua transposição para modelos matemáticos da área, o que permitiria ao especialista a visualização e interpretação rápida de informações novas. O banco de dados com as informações do projeto também deve conter todos os dados sobre protocolos de análise, e também os resultados de análises de controle de qualidade para cada processo ou procedimento.

f) Estabelecimento de um plano de controle de qualidade

O levantamento de informações de controle de qualidade dos métodos e procedimentos empregados é fundamental para o embasamento das decisões a serem tomadas no decorrer do projeto. O plano de controle de qualidade deve conter informações sobre os métodos deste controle e os critérios de definição dos parâmetros de qualidade para cada POP utilizado nos trabalhos.

g) Definição de medidas de controle da segurança do trabalho e da saúde da população do entorno e dos trabalhadores do projeto

As atividades de caracterização de áreas contaminadas podem causar a exposição dos trabalhadores contratados ou das populações do entorno a produtos nocivos para a saúde. É imprescindível estabelecer estratégias de monitoramento ambiental para garantir que os níveis de contaminação não excedam os padrões permitidos. Os trabalhos de investigação de contaminação em certas áreas estão associados a riscos de acidentes pela liberação de poluentes. Estes riscos devem ser analisados previamente e medidas emergenciais de intervenção devem ser definidas e preparadas para estes casos. Muitas das atividades de coleta e análise de amostras envolvem a possibilidade de acidentes de trabalho, que devem ser prevenidos na medida do possível com a adoção de treinamento de pessoal e de medidas de prevenção e proteção adequadas.

Um exemplo de fluxograma de processo dinâmico de caracterização de uma área com solos contaminados está indicado na Figura 5. A elaboração do modelo conceitual básico da área é seguida de uma primeira campanha de análise. No caso de uma área com composição de contaminantes desconhecida, a lista de analitos da

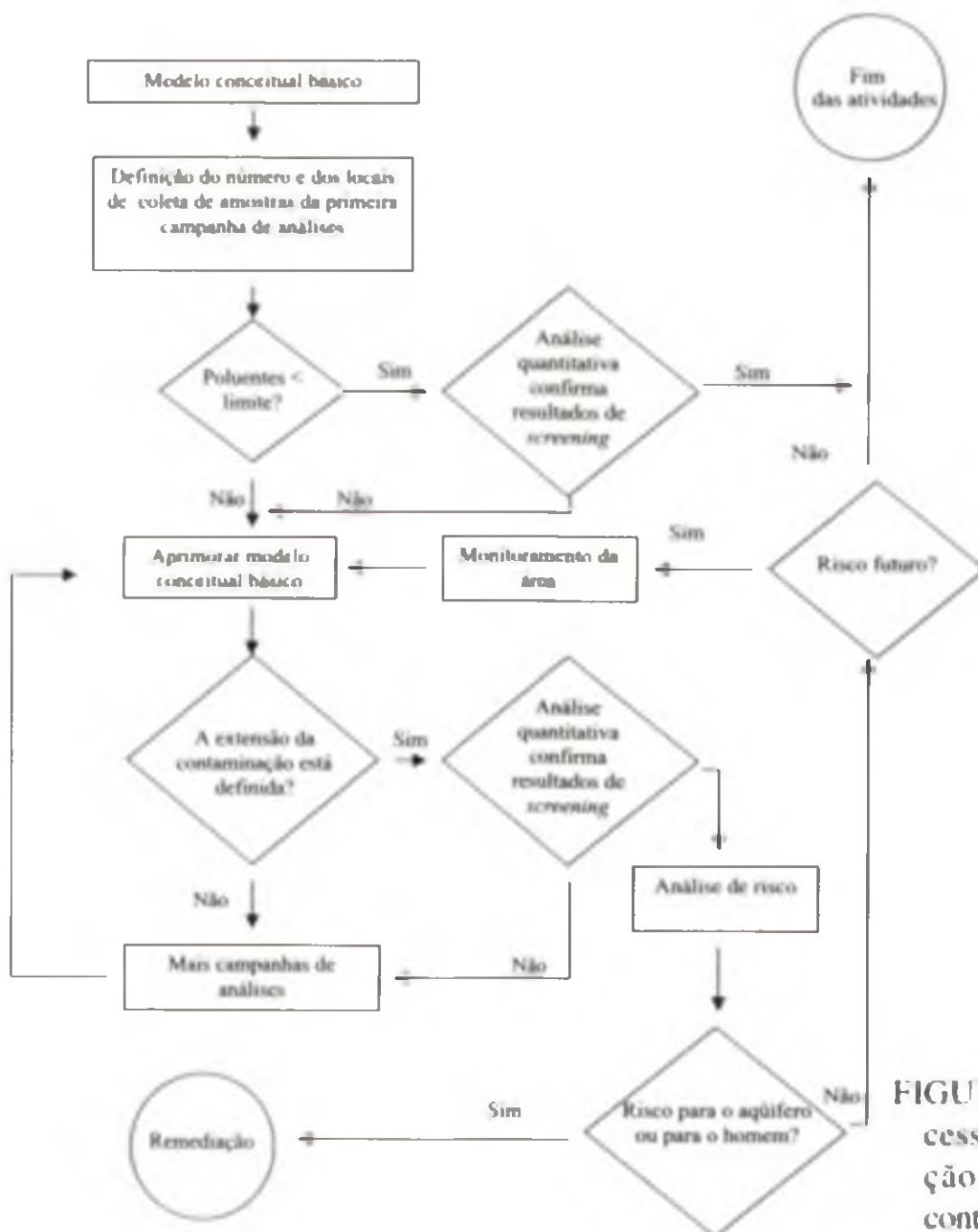


FIGURA 5. Fluxograma de processo dinâmico de caracterização de uma área com solos contaminados (ROBBAT, 1997).

primeira fase compreenderá a lista completa de poluentes orgânicos e inorgânicos legislados. Os resultados desta primeira rodada de análises com métodos de *screening* de campo serão computados para a tomada de decisões somente se estes se enquadrem dentro dos padrões de qualidade estipulados no projeto. Do contrário, a metodologia de *screening* deverá ser reavaliada para permitir a coleta de dados com a qualidade almejada, que serão utilizados para analisar a necessidade ou não de rodadas subsequentes de análise para aprimoramento do modelo conceitual. Se estas rodadas se tornarem necessárias, a lista de poluentes será reduzida para incorporar somente os compostos que efetivamente ocorrerem no local e representarem risco para a saúde humana ou para o meio ambiente. A redução do número de analitos permitirá o processamento de número maior de amostras nas rodadas subsequentes.

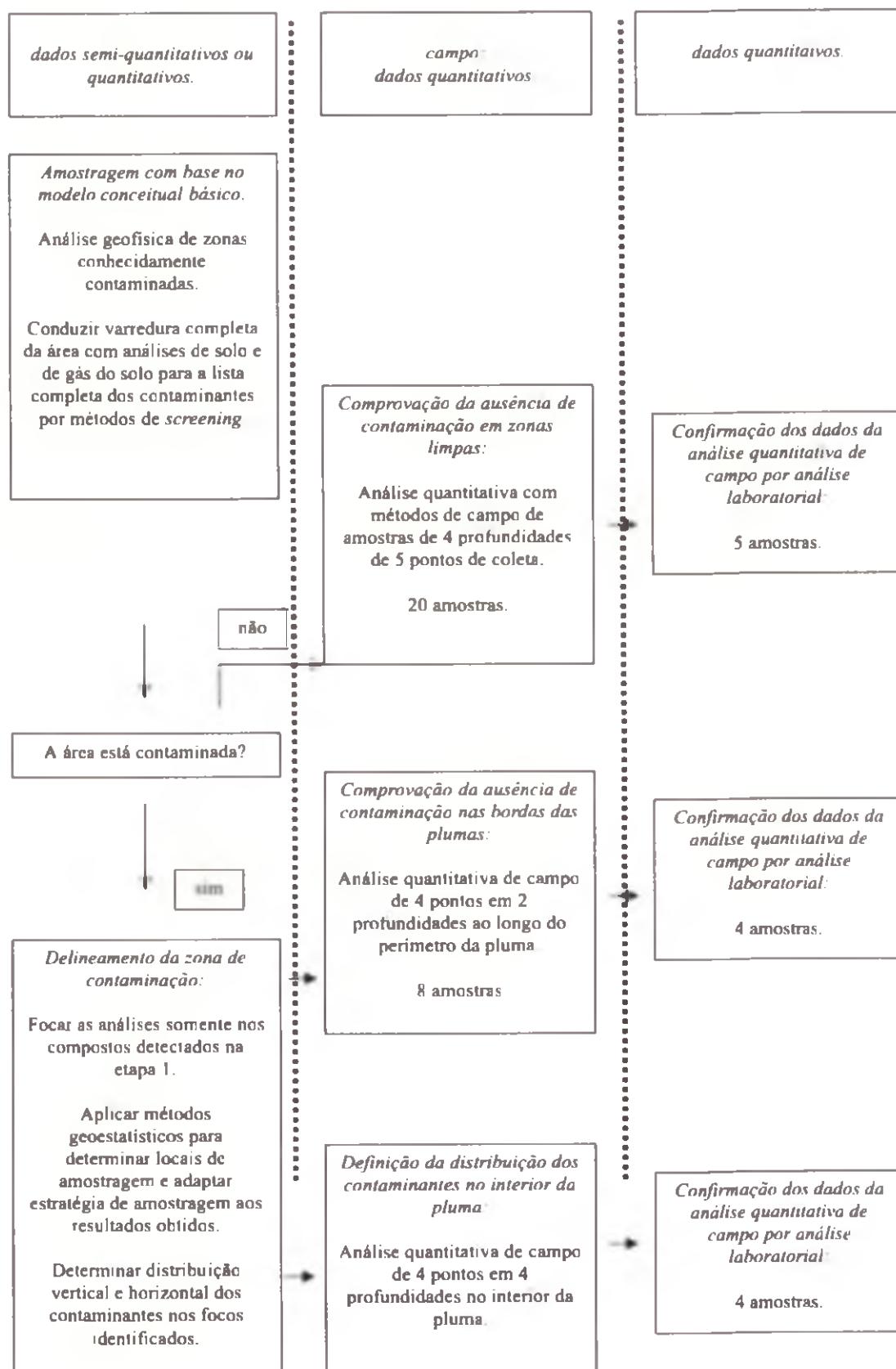


FIGURA 6. Hierarquia dos métodos de análise empregados no processo dinâmico de caracterização de áreas contaminadas (modificado de ROBBAT, 1997).

Os resultados desta campanha permitem o aperfeiçoamento do modelo conceitual até que este modelo atinja a consistência adequada para a área.

As conclusões da análise da área podem ser classificadas em três categorias: (a) os níveis de contaminação, se presente, não representam risco para a saúde humana ou animal; (b) a contaminação não oferece risco imediato, mas deve ser monitorada; e (c) o risco associado à contaminação demanda a adoção imediata de medidas corretivas. A confirmação dos dados da análise química em uma área contaminada ocorre em três etapas (Figura 6). O delineamento preliminar das plumas ocorre em etapas de *screening*. Quando o formato da pluma estiver definido, os dados da etapa de *screening* serão confirmados por análise quantitativa em campo. Algumas amostras desta análise quantitativa serão enviadas para laboratórios para confirmação independente dos resultados por métodos convencionais de análise.

A análise quantitativa de poluentes em campo reduz drasticamente o gasto com transporte de amostras, que em 1996 correspondeu a cerca de 40% do total gasto com análises químicas de amostras de áreas contaminadas nos EUA. Tecnologias de campo para análise quantitativa de poluentes são essenciais para a implementação do processo dinâmico de caracterização de áreas contaminadas.

5. Tecnologias de análise de poluentes em campo

A adoção de tecnologias de campo para análise de poluentes é fundamental para a redução do custo de caracterização e remediação de áreas contaminadas. Estas tecnologias, para se tornarem economicamente viáveis, devem produzir resultados que atendam os padrões de PQD definidos para o projeto. O tempo de processamento das amostras deve ser inferior ou igual a 30 minutos, o custo da instrumentação deve ser inferior ou semelhante ao de instrumentação de laboratório, e o custo total de análise deve ser inferior ao custo da análise laboratorial. A instrumentação de análise de campo deve ser robusta, transportável sem grandes dificuldades e deve operar nas condições extremas de temperatura, umidade e poeira, típicas de áreas contaminadas.

A produção de resultados de qualidade com instrumentação de campo depende da disponibilidade de pessoal especializado para a operação destes sistemas. Os custos de mobilização deste tipo de instrumentação, portanto, não são baixos, considerando que o equipamento permanecerá instalado em uma determinada área contaminada durante toda a duração do projeto e, durante este período, provavelmente, não será utilizado para análise de amostras de outras áreas, como ocorre com equipamentos instalados em laboratórios. Abordagens que incluam instrumentação de campo trarão vantagens de custo/benefício preferencialmente em áreas de porte médio e grande e, em todas as áreas onde houver necessidade de *screening* de grande número de amostras para separar solo contaminado de solo limpo. Os instrumentos atualmente disponíveis para amostragem em campo podem ser classificados em duas categorias:

Instrumentos de análise em tempo real: Não ocorre pré-tratamento da amostra: eletrodos seletivos para íons, sensores de fibras óticas, monitores de gases portáteis,

cromatógrafos a gás com injeção direta (análises de amostras de gases) e instrumentos portáteis de XRF. Estes instrumentos geralmente produzem dados qualitativos.

Instrumentos de análise em tempo quase-real: A análise da amostra depende de pré-tratamento: kits de análise química, imunoensaios, GC equipados com uma variedade de detectores seletivos, GC-MS de campo, analizadores de TPH, alguns equipamentos de ICP e XRF para análise de metais.

O número de tecnologias para análise de poluentes em campo, atualmente, é relativamente pequeno, por tratar-se de um mercado relativamente novo e também pelas dificuldades de desenvolver tecnologias que atendam aos PQDs adotados na análise de áreas contaminadas. Estas tecnologias são: imunoensaios, sensores de fibras ópticas, cromatografia gasosa, sensor de fibra ótica com fluorescência induzida por laser, kits de análise baseados em reações químicas e fluorescência de raios X.

5.1 Imunoensaios

Os testes empregados para a análise de poluentes em campo são variantes de testes ELISA originalmente desenvolvidos para aplicações clínicas (Figura 7) (van EMON & GERLACH, 1995). Na versão mais simples, anticorpos específicos para um poluente são immobilizados em um substrato e expostos a uma amostra em conjunto com uma quantidade conhecida de moléculas do poluente acopladas a uma enzima indicadora (poluente acoplado). Dependendo do fabricante, o substrato pode ser o próprio tubo de ensaio, uma partícula magnética ou de látex. As moléculas de poluente das duas fontes competem entre si pelos sítios dos anticorpos. A quantidade de poluente acoplado ligado ao anticorpo é medida por um teste enzimático que produz um produto colorido ou fluorescente. A intensidade da cor (ou da fluorescência) é proporcional à quantidade de poluente na amostra.

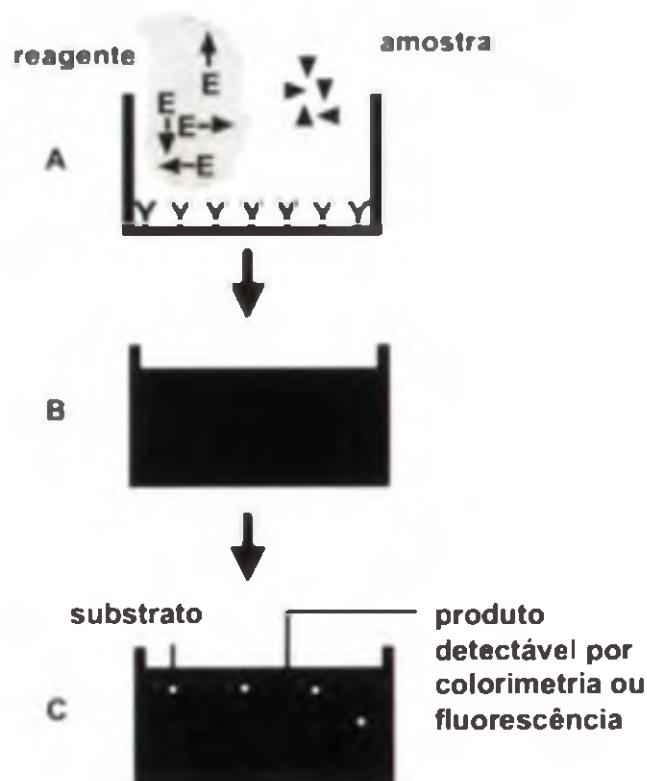


FIGURA 7. Teste ELISA. Anticorpos específicos para o poluente são misturados com uma alíquota de amostra e uma quantidade pré-determinada de reagente que contém a molécula do poluente acoplada a uma enzima. a) As moléculas do poluente na amostra e o poluente acoplado competem pelos sítios de ligação dos anticorpos (b). Após a reação, o líquido é substituído por uma solução-tampão que contém o substrato para a enzima (c). A reação enzimática produz um produto detectável por colorimetria ou fluorescência. A coloração da amostra é proporcional à quantidade de poluente.

Há imunoensaios específicos para poluentes individuais ou para grupos de poluentes com estrutura semelhante. A EPA aprovou protocolos baseados em ensaios imunológicos para a análise de vários contaminantes (número do método em parênteses): *screening* de PCP (4010), análise de 2,4-D em água e solo (4015), PCBs em solo (4020), dioxinas em água e solo (4025), TPH em solo (4030), *screening* de hidrocarbonetos aromáticos em solo (4035), toxafeno em solo (4040), clordano em solo (4041), DDT em solo (4042), explosivos do grupo RDX em água e solo (4051), TCE em solo (4060), atrazinas (4670) e mercúrio em solo (4500).

Imunoensaios comerciais estão disponíveis para os seguintes contaminantes: 2,4-D, acetoclor, alaclor, aldicarb, alquilbenzenosulfonatos lineares, alquiletoxitatos, alquilfenóis, alquilfenoletoxitatos, atrazina, benomil/carbendazin, bisfenóis, carbofurano, cianazina, ciclodienos (aldrin, dieldrin), clorobenzenos, clorotalonil, clorpirimifós, DDE/DDT, dioxinas/furanos, diuron, glifosato, hidrocarbonetos de petróleo totais (TPH), hidrocarbonetos poliaromáticos ou carcinogênicos (PAH, teste específico para este subgrupo dos hidrocarbonetos poliaromáticos), lindano, metolaclor, metomil, bifenilas policloradas (PCBs e PCBs coplanares), pentaclorofenol, piretróides, procimidona, RDX, simazina, spinosad, triclopyr, toxafeno, TNT, e toxinas de algas (microcistinas, nodularinas, ácido domóico, yassotoxina). Os limites de detecção de imunoensaios dependem do composto a ser analisado, da matriz e do formato do kit. Limites de detecção típicos para amostras de água e solo estão indicados na Tabela 2.

A grande vantagem dos imunoensaios é a elevada especificidade da reação dos anticorpos, que se ligam somente ao poluente-alvo e a outras substâncias com estrutura química muito semelhante. É importante ressaltar, porém, que alguns kits de imunoensaios são projetados para analisar grupos de compostos, como PCBs, PAHs e hidrocarbonetos monoaromáticos presentes em combustíveis (BTX). Nestes casos, cada componente individual do grupo (ou a maioria dos componentes no caso dos congêneres de PCB) reage com o anticorpo com eficiência diferente, e o teste mede a média de interações com todos os componentes químicos do grupo presentes na amostra. Estes testes não permitem a identificação ou quantificação de substâncias individuais do grupo de compostos-alvo. Testes para moléculas específicas, pesticidas, por exemplo, também estão sujeitos a reações cruzadas com compostos de estrutura química similar.

TABELA 2. Limites de detecção de kits de imunoensaio para diferentes compostos nas matrizes água e solo.

Composto	Limite de detecção	
	Água	Solo
TPH	0,1 a 0,5 ppm	2 a 150 ppm
BTEX	10 a 500 ppb	1 a 5 ppm
PAHs	1 a 500 ppb	0,2 a 25 ppm
Pesticidas	50 ppt a 10 ppb	1 a 100 ppb
PCBs	< 1 ppb	0,1 a 1 ppm
PCP	0,1 a 5 ppb	0,1 a 0,5 ppm
Explosivos	0,5 a 5 ppb	0,2 a 1 ppm

Os fabricantes fornecem junto com os kits informações detalhadas sobre possíveis interferências nas análises. Dependendo do formato dos imunoensaios, as informações geradas são qualitativas, semi-quantitativas e quantitativas. Ensaios quantitativos geralmente são bem mais demorados (60 minutos por ensaio) do que ensaios qualitativos ou semi-quantitativos (20 a 30 minutos por ensaio).

Os imunoensaios são comercializados na forma de kits para análises de um número determinado de amostras. Estes kits incluem todos os materiais de consumo necessários para a condução das análises. Material auxiliar como balanças, pipetas, ponteiras, espectrofotômetros de campo, e outros, deve ser adquirido separadamente. O custo do emprego de imunoensaios se divide entre os custos da mão de obra, dos equipamentos auxiliares (o ítem mais caro, o espectrofotômetro de campo, custa cerca de US\$ 4.000 nos EUA) e dos kits de imunoensaios. O preço médio de uma reação por kit varia de US\$ 5 a 20, dependendo do analito. Dependendo do tipo de matriz e da complexidade dos procedimentos, um analista pode processar até cerca de 60 amostras de água por dia e entre 30 a 50 amostras de solo por dia. A análise de amostras de solo inclui etapas de extração dos compostos, e de limpeza e/ou filtração dos extratos, que, se muito complexas, podem reduzir a capacidade de processamento de amostras do analista de 20 a 25 por dia.

5.2 Testes colorimétricos

Testes colorimétricos são amplamente empregados para a determinação de uma série de compostos em água e solo (SPOKES & BRADLEY, 1991). Os kits contém os componentes necessários para catalizar uma reação química específica com o composto-alvo, que normalmente resulta na produção de cor ou na alteração da cor da solução. Os kits de interesse para esta seção são os que podem ser empregados para a detecção de poluentes. A EPA aprovou testes colorimétricos para os seguintes contaminantes: RDX, TNT e PCBs em solo e PCBs em óleos de transformadores. Os kits geralmente fornecem dados com qualidade de *screening*, mas alguns sistemas mais sofisticados podem fornecer dados semi quantitativos ou mesmo quantitativos.

Tubos indicadores são utilizados para monitoramento de gases em ambientes de trabalho. Os tubos contém um material imobilizado que muda de cor na presença de pequenas quantidades do gás que é monitorado. Estes tubos não fornecem dados quantitativos sobre a concentração do poluente. Os kits colorimétricos em geral permitem a construção de curvas de calibração. Em kits de baixo custo, a obtenção de dados semi quantitativos é obtida através da comparação visual da cor da reação com uma escala colorimétrica impressa fornecida junto com o kit. Dados quantitativos com kits colorimétricos são gerados com espectrofotômetros ou luminômetros portáteis, que custam entre US\$ 1.000 a 5.000 nos EUA. O processamento de amostras para análise quantitativa é muito mais elaborado do que na análise qualitativa ou semi quantitativa. Kits para análise de sólidos geralmente incluem reagentes para extração dos analitos da matriz.

A natureza genérica dos mecanismos químicos das reações diagnósticas dificulta o desenvolvimento de kits específicos para compostos individuais. Por exemplo, no caso da análise de BTEX com kits que empregam a reação de Friedels-Crafts de alquilação, todos os compostos do grupo BTEX são agentes de alquilação, porém reagem com eficácia variável, dependendo de sua estrutura. O resultado será, portanto, um valor que representa o teor na amostra do conjunto de moléculas de BTEX.

Testes colorimétricos estão sujeitos a interferências de compostos não-alvo ou das propriedades da amostra (turbidez ou coloração) devido à natureza não-seletiva das reações. Os limites de detecção dos kits são de poucos ppm para análise de solo e variam de frações de ppm a ppb para análise de água, dependendo do composto. Alguns kits possuem limites de detecção muito mais elevados, correspondentes à legislação para o poluente-alvo em certas matrizes. Kits colorimétricos disponíveis no mercado permitem a análise dos seguintes contaminantes: arsênico, cádmio, chumbo, cianeto, cobre, cromato, fenóis, gás sulfídrico, hidrazina, hidrocarbonetos totais em solo (TPH), nitrato, nitrito, organoclorados em solo e água (o teste detecta, na verdade, organoclorados), PCB em solo e água e zinco. Os preços dos consumíveis dos kits colorimétricos variam muito dependendo do analito de interesse, mas são geralmente inferiores aos dos consumíveis de testes de imunoensaio.

5.3 Testes enzimáticos

Kits com colinesterase são testes de *screening* muito difundidos para análise de pesticidas do grupo dos organofosforados e carbamatos em amostras de água (JIN *et al.*, 2004). O sistema de detecção destes kits é semelhante ao de imunoensaios, só que ao invés de quantificar a produção de produto cromogênico na reação enzimática, mede-se a redução da produção deste produto pela presença de analitos de interesse, pesticidas do grupo dos organofosforados ou carbamatos. Os testes são semi quantitativos e não permitem diferenciar os pesticidas entre si. A resposta também varia para pesticidas diferentes. O custo dos kits é semelhante ao de imunoensaios.

5.4 Sensores de fibras óticas

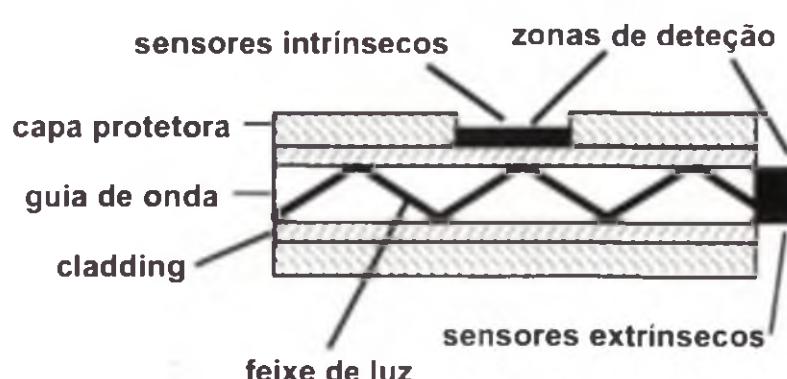


FIGURA 8. Sensores de fibra ótica: localização das zonas de detecção em sensores extrínsecos e intrínsecos.

O esquema mais simples de classificação destes sensores considera a função da fibra ótica na geração do sinal (Figura 8), (SEITZ, 1988; MOORE & De PAULA, 1989).

Em sensores extrínsecos, a fibra ótica serve somente como condutor do feixe de radiação. A detecção do poluente ocorre através da interação direta do feixe de radiação com a amostra. A presença

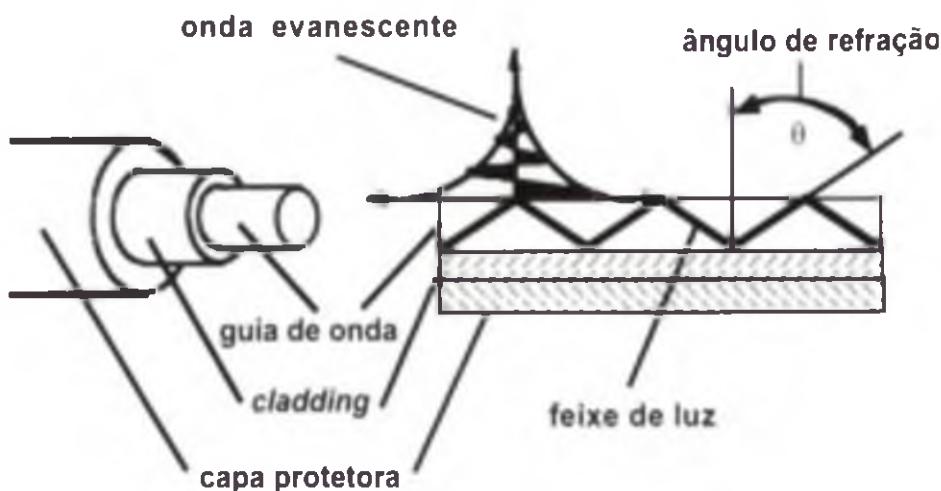


FIGURA 9. Formação de ondas evanescentes em sensores intrínsecos. A exposição direta da guia de onda ao meio ambiente permite analisar a sua composição por meio da onda evanescente cuja intensidade diminui exponencialmente em direção perpendicular à superfície da guia.

evanescentes oriundas da reflecção total do feixe de radiação na interface da guia penetram o ambiente circundante (Figura 9). A energia destas ondas diminui exponencialmente com a distância em direção perpendicular à fibra o que permite analisar a composição química da área em contato imediato com a superfície de reflecção.

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

- Por meio de acoplamento químico (WHITE *et al.*, 1996).
- Dentro de uma matriz porosa (BROWNE *et al.*, 1996) ou polimérica (BARNARD & WALT, 1991).
- Dentro de uma zona de reação separada do meio por uma membrana ou outro tipo de barreira semi permeável, (optrodos) (SEITZ, 1988).

Sensores de fibra ótica são equipamentos para instalação permanente em poços de monitoramento ou são componentes de instrumentação de campo. Estes sistemas permitem a análise de compostos na fase líquida ou gasosa, mas não em solos. Os sistemas de detecção não permitem a distinção de moléculas individuais. Os limites de detecção são de cerca de 1 ppm do grupo de compostos detectados em água. Os sistemas disponíveis no mercado custam entre US\$ 5000 a US\$ 10000 a unidade e permitem a análise de hidrocarbonetos semivoláteis e voláteis e de compostos organoclorados.

5.5 Cromatógrafos portáteis

A cromatografia gasosa é um método de separação de compostos voláteis onde o analito presente na fase gasosa é transportado por um fluxo de gás de arraste

do analito produz um sinal, como, por exemplo, emissão de fluorescência, que é detectado por sensores acoplados na fibra ótica. Este é o princípio do sensor a laser para hidrocarbonetos e compostos orgânicos voláteis instalado na ponta de penetrômetros de cone.

Em sensores intrínsecos, a parte exterior da fibra ótica que consiste de um material de índice de refração menor do que a guia de onda que forma o núcleo da fibra é removido. Neste caso, ondas

inerte pelo interior de um tubo capilar revestido com uma resina denominada de fase estacionária ou, alternativamente, uma coluna empacotada com resina. A separação dos componentes da amostra se dá através da interação destes componentes com a fase sólida ou com a resina de enchimento da coluna empacotada. Cinéticas diferentes de adsorção e dessorção resultam na separação dos componentes, que são detectados na saída do capilar ou da coluna empacotada através de detetores mais ou menos específicos:

Fotoionização (PID - photoionization detector): consiste de uma célula de fluxo compacta irradiada por uma lâmpada de UV que emite luz com energia entre 9,5 a 11,7 eV (10,2eV equivale a radiação UV de 121 nm). A radiação UV ioniza a molécula e o fluxo de moléculas ionizadas é detectado em um eletrodo. Este detetor ioniza seletivamente compostos aromáticos e outros compostos orgânicos voláteis. A molécula não é destruída neste detector.

Ionização por chama (FID - flame ionization detector): o fluxo de gás de arraste é misturado com uma mistura de gás carburante que contém oxigênio e hidrogênio. A molécula orgânica do analito é ionizada na etapa inicial da queima (oxidação) e os íons são detectados em um detector. Este detector é um detector genérico para compostos orgânicos e as moléculas são destruídas no processo.

Captura de elétrons (ECD - electron capture detector): este detector contém uma fonte de elétrons (radiação b) radioativa composta de níquel 63, que fica herméticamente encapsulado dentro de um cilindro de aço. Os elétrons emitidos formam uma nuvem de elétrons no interior do detector. Estes elétrons são absorvidos com eficiência por átomos eletronegativos (bromo, cloro, flúor, nitrogênio, e outros.). Um detector de elétrons pulsado mede a redução da concentração dos elétrons no interior da câmara de fluxo. Este detector é seletivo e muito sensível para a análise de compostos orgânicos com átomos eletronegativos, principalmente cloro, bromo, e nitrogênio.

Detector de condutividade eletrolítica (ELCD - electrolitic conductivity detector): é específico para moléculas com halogênios, que são oxidadas pela mistura do gás de arraste em contato com um gás de combustão, que contém oxigênio e hidrogênio, em contato com um catalisador de níquel aquecido a 1000°C. Os haletos da molécula orgânica são convertidos em HCl, que ioniza com facilidade e é detectado no detector de condutividade eletrolítica. A molécula é destruída no processo.

Condutividade térmica (TCD - thermal conductivity detector): filamentos de fios são aquecidos eletricamente até o ponto onde se tornam incandescentes. A temperatura dos fios dependerá da condutividade térmica do gás em contato com os fios. A modificação da condutividade térmica que ocorre quando moléculas do analito são carreadas pelo detector causa um aumento da resistividade dos filamentos. Este detector não é muito sensível e é usado principalmente para análise de oxigênio, nitrogênio e outros gases, mas não detecta hidrocarbonetos.

Nitrogênio-fósforo (NPD - nitrogen-phosphorous detector): trata-se de um detetor de FID modificado, com fluxo de hidrogênio reduzido e com uma esfera de

composição especial posicionada logo acima do ponto de injeção da amostra. As moléculas com nitrogênio ou fósforo da amostra colidem com a esfera e sofrem uma reação química que produz íons secundários que são analisados pelo detector. Este detector específico detecta compostos nitrogenados e fosfatados com grande sensibilidade.

Sensores de ondas acústicas (SAWS - surface acoustic wave sensor): são utilizados exclusivamente em cromatógrafos portáteis e são baseados na medição de mudanças da freqüência de oscilação de cristais piezoeletricos causadas pela

adsorção de moléculas na sua superfície (GRATE *et al.*, 1996). Sensores de ondas acústicas no seu estado bruto são sensíveis à adsorção de qualquer material. Para conferir a especificidade química necessária para aplicações de monitoramento, a superfície dos cristais é coberta com um filme polimérico seletivo para a molécula ser analisada (Figura 10) (GRATE & ABRAHAM, 1991; GRATE *et al.*, 1996). Um sistema completo contém dois sensores, um de referência e o outro para análise da amostra (Figura 11), um oscilador eletrônico para ativar o sistema, e interfaces eletrônicas digitais para medir a intensidade do sinal, controlar as funções do equipamento e formar a interface com o usuário. Estes sensores atingem sensibilidades elevadas para análise de poluentes.

É importante ressaltar que nenhum dos detectores descritos acima permite a identificação de compostos químicos. Em todos estes casos, a identificação é obtida através da comparação do tempo de retenção do composto detectado na amostra com o tempo de retenção do que se acredita ser o mesmo composto em uma amostra de calibração de composição conhecida e certificada. A co-eluição de substâncias com o mesmo tempo de retenção pode, portanto, resultar na

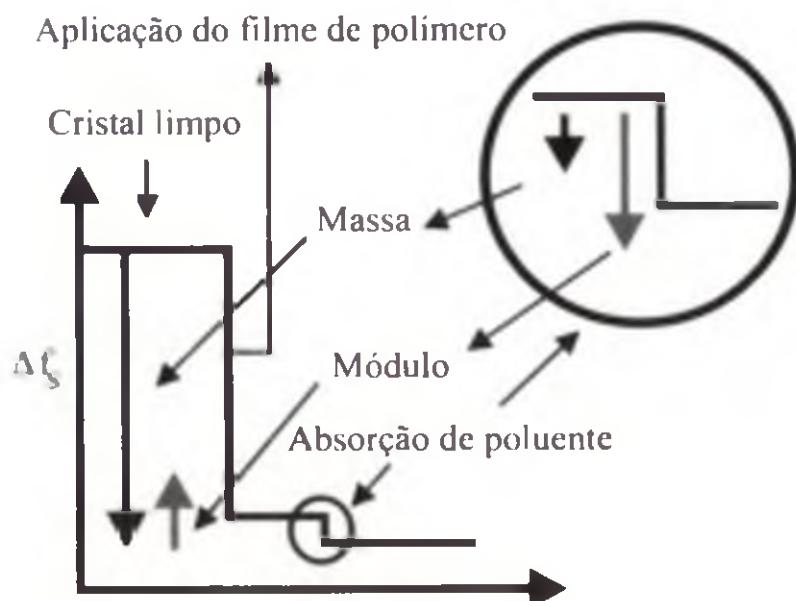


FIGURA 10. Mecanismo de detecção de poluentes em sensores de ondas acústicas com filmes de polímeros. A aplicação do filme de polímero altera a freqüência de oscilação do cristal muito mais do que a absorção de moléculas do poluente pelo polímero. Este segundo processo modifica significativamente as propriedades de propagação de ondas acústicas do polímero o que se manifesta na mudança do módulo da onda acústica. Dfs: variação de freqüência de oscilação. (GRATE *et al.*, 1993b, modificado).

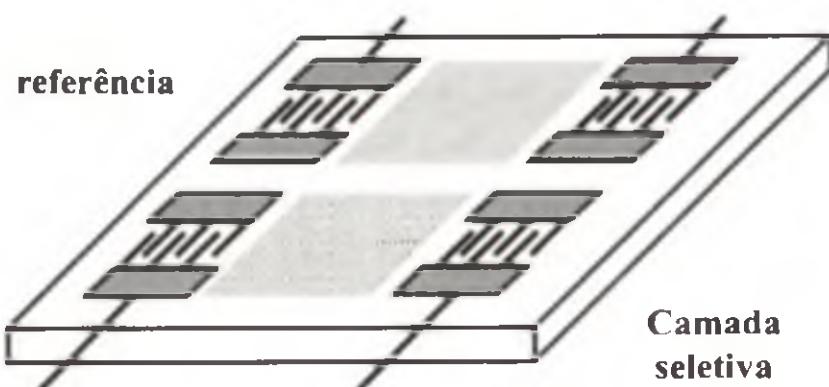


FIGURA 11. Configuração típica de sensores de ondas acústicas. O circuito de referência é montado em paralelo ao sensor de poluentes.

quantificação ou mesmo identificação errônea de compostos. O único detector que permite ao mesmo tempo identificar uma molécula e quantificar a sua concentração na amostra é o espectrômetro de massa.

Detector de massa (MS - mass spectrometry): nestes detectores, o gás de arraste é introduzido em uma câmara de colisão sob alto vácuo, onde as moléculas da amostra colidem com feixes de elétrons, o que causa a ionização da molécula-mãe e, caso a energia de colisão seja adequada, resulta a fragmentação da molécula-mãe. Os íons são detectados em uma analisador, que mede a carga do íon e a sua massa. Este é o único detector que permite a identificação definitiva de uma molécula, pois o espectro de fragmentos produzido é característico para cada composto.

Compostos desconhecidos podem ser identificados através da comparação eletrônica do espectro de fragmentação da molécula com uma biblioteca de espectros de fragmentação de todas as moléculas conhecidas, armazenada no software do computador, que controla o detector. Na análise de amostras do meio ambiente o espectrômetro de massa geralmente é precedido de um cromatógrafo a gás, onde ocorre a separação da mistura em componentes individuais. A injeção de amostras diretas na célula de colisão do espectrômetro também é possível, mas pode dificultar a identificação de compostos, pois os espectros conterão fragmentos de várias moléculas diferentes.

A cromatografia gasosa permite a análise de compostos voláteis e semi voláteis em campo. Entre todas as metodologias descritas neste capítulo, esta é a única que permite a separação de compostos estruturalmente e químicamente semelhantes e a sua identificação definitiva (detetor de massa). Compostos voláteis podem ser injetados diretamente no cromatógrafo, se presentes em amostras de gases, ou indiretamente, pelo método de *headspace*, no caso de amostragem de solo ou água. Neste caso, a amostra é acondicionada em um frasco herméticamente fechado e aquecida a uma temperatura pré-determinada, para a volatilização dos compostos. Uma alíquota da fase gasosa do frasco, o *headspace*, é injetada no cromatógrafo para análise dos componentes voláteis. Os limites de detecção na injeção direta variam entre 20 a 200 ppbv (ppb por volume) de gás. Etapas de concentração prévia dos analitos em resinas adsorventes permitem a redução considerável destes limites. A análise de compostos semi voláteis depende da extração dos mesmos com solventes das amostras de solo ou água.

Os processos de extração preferencialmente empregados em campo minimizam o consumo de solventes como, por exemplo, métodos baseados na extração em fase sólida, onde a amostra de água ou o extrato de solo são filtrados através de uma resina porosa que retém os analitos de interesse. Estes analitos são eluídos da resina com um volume mínimo de solventes e injetados no cromatógrafo. Na microextração em fase sólida a resina é impregnada na superfície de um filamento, que é colocado em contato com a amostra durante um tempo determinado. Os analitos adsorvem na resina. A dessorção ocorre por aquecimento diretamente no compartimento de injeção do cromatógrafo. A análise em campo por cromatografia gasosa de compostos que dependem de derivatização ainda não é possível, na prática. Os custos de cromatógrafos de campo variam de cerca de US\$ 10,000.00 a US\$ 90,000.00 dependendo do número de detectores e se o equipamento é especializado na detecção de um grupo limitado e definido de compostos, ou se ele serve para análise de toda a gama de compostos analisáveis por cromatografia gasosa.

5.6 Fluorescência de raios X

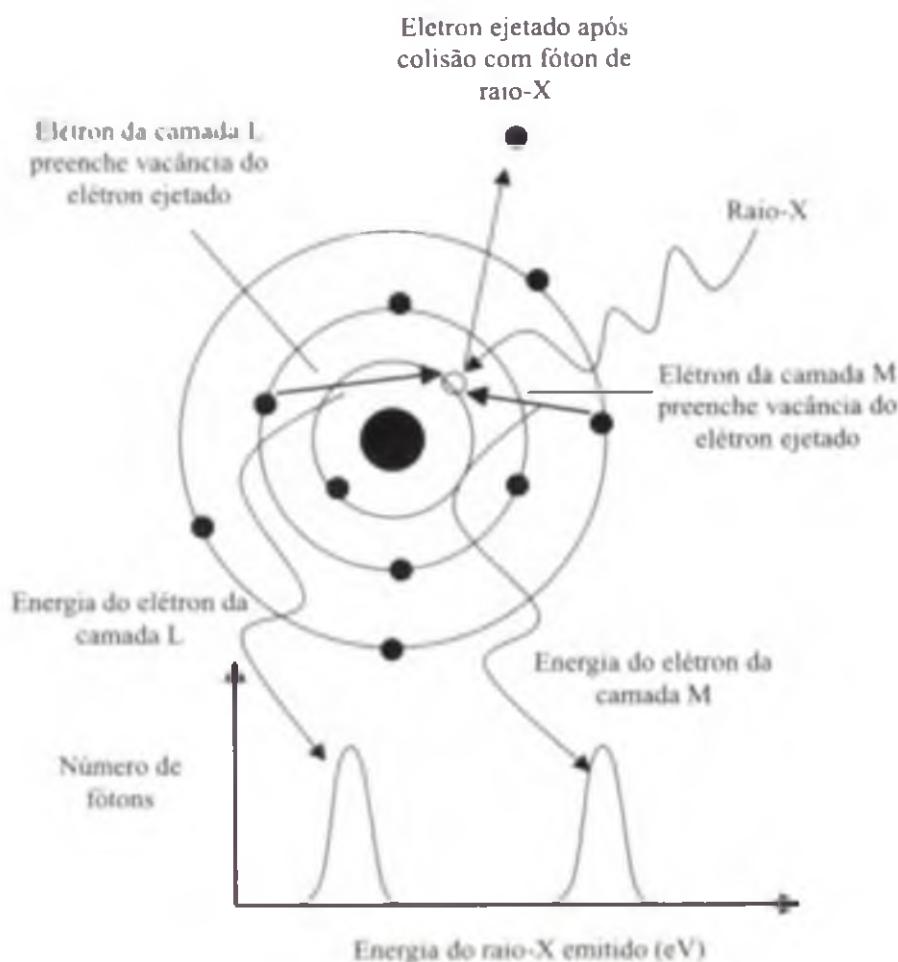


FIGURA 12. Representação esquemática da emissão de raios-X no método de XRF de análise de metais.

camada de valência. Como o nível energético deste elétron é superior ao do elétron da camada interna que ele vai substituir, ocorre a emissão de fótons de raios X, que são analisados no detector (Figura 12).

O equipamento pode analisar simultaneamente a concentração de vários metais diferentes, pois cada metal emitirá raios X com nível de energia (comprimento de onda) diferente. XRF pode ser utilizado diretamente para analisar metais em amostras de sólidos (solos, pó). No caso da análise de amostras de água, é necessário concentrar os colóides com metais na superfície de filtros para posterior análise por XRD. Em virtude da variabilidade do nível de energia dos raios X emitidos de diferentes elementos, unidades portáteis são equipadas com diferentes fontes de raios X, cada uma adequada para a detecção de um grupo limitado de elementos:

Fe-55: enxofre, potássio, cromo, titânio e cálcio;

Cd-109: vanádio, cromo, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, arsênico, selênio, estrôncio, zircônio, molibdênio, mercúrio, chumbo, rubídio e urânio;

Am-241: cádmio, estanho, antimônio, bário e prata.

Fluorescência de raios X (XRF – X-ray fluorescence) é uma técnica de análise elementar empregada para a detecção e quantificação de amostras de metais, principalmente (MELQUÍADES & APOLONI, 2004). O instrumento gera raios X (fótons acelerados oriundos do decaimento de substância radioativa) com energia maior do que a energia de ligação dos elétrons da camada interna dos elementos a serem analisados. Os raios X colidem com elétrons das camadas internas dos átomos e, como consequência da adsorção de energia, estes elétrons são ejetados do átomo. O espaço vazio é imediatamente ocupado por um elétron da

Os fabricantes destes equipamentos estão progressivamente substituindo as fontes radioativas de raios X por tubos catódicos, cuja operação não depende da aquisição de uma licença para manuseio de equipamento radioativo. Os limites de quantificação de XRF para amostras de sólidos variam de 50 a 900 mg/kg, dependendo do equipamento e do protocolo de análise. A análise de uma amostra é completada em poucos minutos, a amostra não é destruída no processo. Um instrumento de campo custa entre US\$ 30.000,00 e US\$ 50.000,00.

5.7 Detetores de fotoionização ou de ionização por chama

Estes sistemas para análise de vapores de matéria orgânica não permitem identificar substâncias individuais, mas discriminam entre grupos de substâncias com propriedades fisicoquímicas semelhantes. Por exemplo, os equipamentos fornecem dados sobre a quantidade de hidrocarbonetos em uma amostra de gás, mas não sobre a identidade química destes hidrocarbonetos. O preço de um sistema varia entre US\$ 4.000,00 e US\$ 25.000,00 sendo que o preço de um detector portátil situa na faixa dos US\$ 4.000,00 a US\$ 8.000,00.

6. Implementação em campo

Todos os métodos de análise de poluentes em campo descritos acima, permitem analisar as amostras praticamente sem infraestrutura. É importante ressaltar, porém, que a geração de dados quantitativos em campo com limites de detecção semelhantes aos realizados em laboratórios depende de uma infraestrutura um pouco mais refinada. Deve contar com a instalação de laboratórios de campo em trailers ou em barracos equipados com ar condicionado e com um mínimo de infraestrutura de bancada para permitir o trabalho seguro e preciso dos analistas químicos. Uma análise comparativa da aplicabilidade dos sistemas de análise em campo, descritos acima, aos diferentes problemas de caracterização de áreas contaminadas está indicada na Tabela 3.

TABELA 3. Limites de detecção de kits de imunoensaio para diferentes compostos nas matrizes água e solo.

Técnica	Matriz			Análise compostos			Tipo de análise			Custo
	Gás	Água	Solo	grupos	individuais	screening	Semi-quantitativa	Quantitativa		
				*	orgânico inorgânico					
Imunoensaios	x	x	x	x	x	x	x	x	x	baixo
Kit colorimétrico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	baixo
Ensaios enzimáticos	x		x	x		x				baixo
Sensores de fibra oca	x		x	x		x	x			médio
Cromatografia gasosa	x	x	x		x	x	x	x	x	elevado
Fluorescência de raios X	x	x			x	x	x	x	x	elevado
Detetores de fotoionização	x			x	x	x				baixo
Detetores de ionização por chama	x			x	x	x				baixo

Referências

- BARBER, T.E.; FISHER, W.G; WACHTER, E.A. On-line monitoring of aromatic hydrocarbons using a near-ultraviolet fiber-optic absorption sensor. *Environmental Science and Technology*, v.29, p.1576-1580, 1995.
- BARNARD, S.M; WALT, D.R. Fiber-optic organic vapor sensor. *Environmental Science and Technology*, v.25, p.1301-1304, 1991.
- BROWNE, C.A.; TARRANT, D.H., OLTENAU, M.S., MULLENS, J.W.; CHRONISTER, E.L. Intrinsic sol-gel clad fiber-optic sensors with time-resolved detection. *Analytical Chemistry*, v.68, p.2289-2295, 1996.
- CRUMBLING, D.M.; GRIFFITH, J; POWELL, D. P. Improving decision quality: making the case for adopting next generation site characterization practices. *Remediation*, v.13, p.91-111, 2003.
- GRATE, J.W.; ABRAHAM, M.H. Solubility interactions and the design of chemically selective sorbent coatings for chemical sensors and arrays. *Sensors and Actuators B*, v.3, p.85-111, 1991.
- GRATE, J.W.; PATRASH, S.J.; ABRAHAM, M.H.; DU, C.M. Selective vapor sorption by polymers and cavitants on acoustic wave sensors: is this molecular recognition? *Analytical Chemistry*, v.68, p.913-917, 1996.
- HOMSHER, M.T.; HAEBERER, F; MARSDEN, P.J.; MITCHUM, R.K.; NEPTUNE, D.; WARREN, J. Performance-based criteria for field analysis, a panel discussion. *Environmental Lab Oct/Nov*. 1999.
- JENKINS, T.F.; GRANT, C.L.; BRAR, GS.; THORNE, P.G.; RANNEY, T.A.; SCHUMACHER, P.W. Assessment of sampling error associated with collection and analysis of soil samples at explosives-contaminated sites. 1996. 38p. Relatório. US Army Corps of Engineers Cold Regions Research & Engineering Laboratory Special Report 96-15.
- JIN, S.Y.; XU, Z.C.; CHEN, J.P.; LIANG, X.M.; WU, Y.N.; QIAN, X.H. Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe. *Analytica Chimica Acta*, v.523, p.117-123, 2004.
- MELQUIADES, F.L.; APPOLONI C.R. Application of XRF and field portable XRF for environmental analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* v.262, p.533-541, 2004.
- MOORE, E.L.; DE PAULA, R.P. Optical fibers and integrated optics. Em *Sensors - A Comprehensive Survey*, v. 1 (W. GÖPEL, J. HESSE E J. N. ZEMEL, eds.), pp. 217-245, VCH, Weinheim, Alemanha, (1989).
- ROBBAT, A. A guideline for dynamic workplans and field analytics: the keys to cost-effective site characterization and cleanup. Report. 28pp. http://clu_in.org/download/char/dynwkpln.pdf. (1997).
- ROY, S.; FOUILLAC, A.M. Uncertainties related to sampling and their impact on the chemical analysis of groundwater. *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, p.185-193, 2004.
- SCHADE, W.; BUBLITZ, J. On-site laser probe for the detection of petroleum products in water and soil. *Environmental Science and Technology*, v.30, p.1451-1458, 1996.
- SEITZ, W.R. Chemical sensors based on immobilised indicators and fiber optics. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.19, p.135-173, 1988.
- SPOKES, G.N.; BRADLEY, J. Performance testing of selected test kits for analysis of water samples. *ASTM Special Technical Publication*, v.1102, p.184-200, 1991.
- VAN EMON, J.M.; GERLACH, C.L. A Status report in field-portable immunoassay. *Environmental Science and Technology*, v.29, p.312-317, 1995.
- WHITE, J.; KAUER, J.S.; DICKINSON, T.A.; WALT, D.R. Rapid analyte recognition in a device based on optical sensors and the olfactory system. *Analytical Chemistry*, v.68, p.2191-2202, 1996.

Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Derivados

Paulo Negrais Seabra



FOTO P. N. Seabra

I. Introdução

O solo tem uma extrema importância para o homem e a natureza. Ele é a base para a vida e habitat para os seres humanos, animais, plantas e outros organismos. Grande parte dos nossos alimentos provêm do solo, que como parte integrante dos sistemas naturais, cumpre papel importante no ciclo da água e dos nutrientes. O solo é um espaço com intensa atividade microbiológica, meio para a decomposição, equilíbrio e renovação química, fruto das propriedades filtrante, de tamponamento e de conversão de substratos, o que o torna a fonte mais importante de proteção aos recursos hídricos, em especial às águas subterrâneas.

A contaminação de solos iniciou-se com o surgimento das primeiras sociedades humanas. Existem registros sobre solos poluídos por rejeitos de mineração e de fundição de metais já no século I a.C. Com o advento da Revolução Industrial a contaminação de solos por rejeitos aumentou consideravelmente.

Contudo, a conscientização em grande escala das consequências da poluição dos solos só teve início nos anos 70. Um dos primeiros casos relatados com ênfase pelos meios de comunicação foi o de Love Canal, próximo à Nova Iorque, onde um condomínio com 2.500 casas foi construído sobre um antigo aterro de rejeitos perigosos contendo solventes químicos (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005a). Desde então, a contaminação de solos e seu tratamento têm despertado um crescente interesse aos EUA, Canadá e Europa.

Em 1980, o Congresso americano estabeleceu o CERCLA (*Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act*) – também conhecido como Superfundo – lei que estabelece o uso de recursos do contribuinte americano para localizar, investigar e remediar aproximadamente 1.300 áreas prioritárias nos EUA, todas contaminadas com resíduos perigosos (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY/SUPERFUND, 2001).

A Holanda foi o primeiro país a desenvolver em 1983, um critério de qualidade para solos e águas subterrâneas, a chamada “Lista ABC”. Neste sistema, levaram-se em consideração três fatores importantes para a avaliação da magnitude da contaminação: natureza e concentração dos contaminantes, condições específicas dos sítios que afetam o transporte e o destino dos contaminantes e, uso e função do solo, grau de exposição e risco (CASARINI, 2000). No Brasil, em 2001, o estado de São Paulo foi o primeiro a editar padrões de referência de qualidade e valores de intervenção para solos e águas subterrâneas (CETESB, 2001a).

A indústria de petróleo, em suas diversas atividades – produção, refino, transporte e comercialização, apresenta risco ambiental inerente que precisa ser constantemente gerenciado. Os vazamentos acidentais de petróleo e derivados em dutos, embarcações e unidades industriais, são exemplos desses impactos ao ambiente. De 1992 a 1996, 9 milhões de litros/ano de petróleo vazaram em ambiente aquático

somente nos EUA (AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, 1998). Em termos mundiais, o montante de óleo vazado em 1997 foi da ordem de 210 milhões de litros, sendo 91 milhões de litros não provenientes de embarcações (ETKIN, 1999).

Solos contaminados por vazamentos de petróleo ou por seus derivados podem ser tratados por diversos processos biológicos, físicos, químicos, físico-químicos ou térmicos (DEUEL & HOLLIDAY, 1997). A aplicação de processos biológicos ao tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, tem despertado um grande interesse das comunidades acadêmica e industrial nas duas últimas décadas. São processos de tratamento que utilizam organismos (bactérias, fungos e/ou vegetais) para reduzir ou eliminar compostos orgânicos acumulados no ambiente, perigosos aos ecossistemas e à saúde humana. Entre as principais vantagens do emprego dos processos biológicos está o seu baixo custo em comparação com o de processos convencionais (DAVIS *et al.*, 1995). Ainda, são processos naturais com baixo consumo de energia e que causam poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do meio. /

Freqüentemente a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo atua em ambientes multifásicos e heterogêneos, onde o contaminante está presente em associação com as partículas do solo, dissolvido nas fases líquidas e gasosas. Devido a essa complexidade, o sucesso da biorremediação de um solo depende de um enfoque multidisciplinar, envolvendo microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química.

2. Petróleo e derivados

O petróleo é constituído de várias centenas de compostos orgânicos (Figura 1) que podem ser divididos em hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e cílicos), hidrocarbonetos aromáticos (mono e poli aromáticos), asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos e ésteres) e compostos polares que incluem as resinas (piridina, quinolinas, carbazóleo, amidas, tiofeno, entre outros).

Entre os hidrocarbonetos alifáticos, os alcanos (normal e iso, conhecidos como parafinas) são encontrados no petróleo na faixa de 5 até 40 átomos de carbono. O gás natural associado ao petróleo contém os alcanos mais voláteis, isto é, aqueles com baixas massas molares (metano em sua maioria) e quantidades progressivamente menores de etano, propano e butano. Os cicloalcanos presentes são conhecidos também por naftênicos. Os alcenos (também chamados de olefinas) são raros no petróleo.

Os hidrocarbonetos aromáticos compreendem o benzeno, os alquilbenzenos (tolueno, xilenos, etilbenzeno e outros.) e os policíclicos (como naftaleno, antraceno, fenantreno, entre outros).

As resinas e os asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com alta condensação de anéis aromáticos. Normalmente, contêm átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

A composição de 636 petróleos de diversas regiões do mundo foi avaliada, mostrando que as proporções de hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos variavam muito. A composição desses petróleos

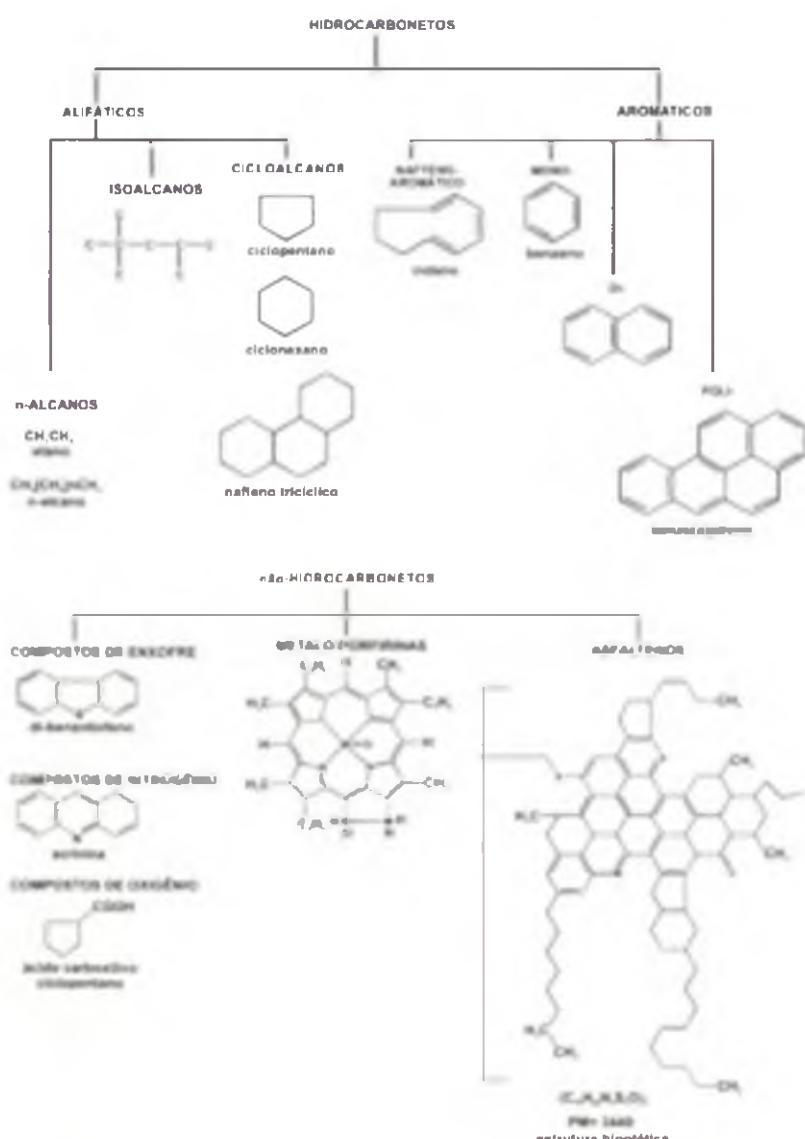


FIGURA 1. Estruturas químicas de alguns compostos encontrados no petróleo (CONNELL & MILLER, 1984).

(MAGAW *et al.*, 1999).

Dentre os derivados de petróleo, a gasolina contém, em média, de 50 a 70% de hidrocarbonetos alifáticos (parafinas e naftênicos) em peso, 25 a 45% de aromáticos (benzeno e tolueno podem atingir 3,5 e 20% em peso, respectivamente) e até 20% de olefinas (BÉRAUD, 1997). Os destilados médios (óleo diesel, querosene e querosene de aviação) podem conter de 5 e 12% (p/p) de alquilbenzenos.

3. Biodegradação de petróleo e derivados

A capacidade dos microrganismos em degradar petróleo e derivados, utilizando-os como fonte de energia e carbono, está bem reportada na literatura (ATLAS, 1988; ROSATO, 1997).

Vários fatores influenciam a taxa de biodegradação dos compostos presentes no petróleo e produtos, como microrganismos com capacidade de utilizar poluentes orgânicos como fonte de energia, que devem estar em contato direto com os contaminantes.

variou dentro das seguintes faixas: 40 a 80% de hidrocarbonetos alifáticos; 15 a 40% de hidrocarbonetos aromáticos; 0 a 20% de resinas e asfaltenos (TISSOT & WELTE, 1978).

Estudos com 60 petróleos diferentes, avaliaram a variação da composição dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) prioritários da EPA. As concentrações encontradas de 6 dos 7 HPA carcinogênicos foram bem baixas, na média de 0,06 mg/kg de óleo para o indeno(1,2,3-cd)pireno a 5,5 mg/kg de óleo para o benzo(a)antraceno, e média de concentração do criseno de 28,5 mg/kg de óleo (KERR *et al.*, 1999).

Outro estudo avaliou a variação da concentração de 18 metais pesados em 26 amostras de petróleo. A concentração média dos metais foi inferior a 1,5 mg/kg de óleo, exceetuando níquel, vanádio e zinco, cujas concentrações médias foram de 20,63 e 3 mg/kg de óleo, respectivamente

TABELA 1. Fatores que influenciam a biodegradação.

Fatores químicos e físicos do contaminante	Fatores químicos e físicos do solo	Fatores biológicos
Composição química	Temperatura	Distribuição dos microrganismos no solo
Estado físico	Potencial redox	Tipos de microorganismos degradadores
Concentração	Umidade	Técnica de inoculação
Toxicidade	pH	Técnica de adaptação
	Teor de matéria orgânica	
	Nutrientes	

Uma dada população microbiana necessita de condições ambientais específicas para realizar a biodegradação de contaminante, pois, caso contrario, esta população entrará em latência até que as condições ideais sejam disponibilizadas. Os principais fatores que influenciam a biodegradação de um contaminante no solo estão listados na Tabela 1.

3.1 Composição química x biodegradação

Algumas generalizações podem ser feitas quanto à susceptibilidade dos hidrocarbonetos de petróleo ao ataque microbiano (BARTHA & ATLAS, 1987):

- a) Os hidrocarbonetos presentes em uma mistura complexa como o petróleo são, em sua maioria, biodegradados por culturas microbianas mistas de maneira simultânea e em diferentes velocidades. A velocidade de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo varia em função do desaparecimento de certos componentes e da mudança da biota presente no sistema.
- b) A presença de um dado hidrocarboneto em uma mistura de compostos de petróleo como substrato, pode ter uma influência positiva (pelo processo de cometabolização) ou negativa (pela sua toxicidade) na biodegradação desta mistura.
- c) A utilização de alcanos C1-C4 é restrita a poucas espécies. Os alcanos na faixa de C5-C9 são tóxicos a muitos microrganismos devido ao seu efeito solvente, isto é, tendem a romper a estrutura da membrana lipídica dos microrganismos (SIKKEMA *et al.*, 1995). Os n-alcanos C10-C22 normalmente são facilmente metabolizados. Os alcanos com massas molares maiores, do tipo graxa sólida, não são facilmente biodegradados por serem sólidos e hidrófobicos à temperatura fisiológica. Contudo, já foi observada uma lenta biodegradação de n-alcanos com mais de 44 átomos de carbono.
- d) Os iso-alcanos são menos biodegradáveis comparando-se com os n-alcanos correspondentes. O radical metila pode retardar ou bloquear completamente a biodegradação.
- e) Alcenos (olefinas) tendem a ser mais tóxicos, ao menos em condições aeróbias. São menos degradáveis quando comparados aos n-alcanos análogos. Entretanto, os alcenos são raros no petróleo bruto.

- f) Os hidrocarbonetos monoaromáticos rapidamente podem ser tóxicos, mas em baixas concentrações podem ser utilizados por diversos microrganismos. Hidrocarbonetos poliaromáticos contendo de 2 a 4 anéis, podem ser biodegradados a taxas que decrescem com o aumento no número de anéis aromáticos. Os naftalenos, compostos com dois anéis aromáticos, tendem a serem degradados mais lentamente que os compostos monoaromáticos. Contudo, vários trabalhos mostraram uma degradação mais rápida do naftaleno e metilnaftaleno, em relação ao benzeno e n-hexadecano, em sedimentos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (LEE & HOEPPEL, 1991). Em sedimentos contaminados com petróleo, os monoaromáticos são degradados mais rapidamente que a fração de alcanos. A variação no processo de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos pode ser atribuída ao tipo de combustível e a fatores ambientais presentes, já que a biodegradabilidade é quase sempre ligada à viabilidade dos microrganismos. Hidrocarbonetos poliaromáticos com cinco ou mais anéis são de biodegradação difícil e lenta.
- g) Os cicloalcanos de baixo peso molecular raramente servem como substrato, sendo degradados lentamente e em baixas concentrações. Os cicloalcanos altamente condensados são refratários à biodegradação.
- h) Os compostos heterocíclicos que contém nitrogênio, enxofre e/ou oxigênio, quando não muito condensados, podem sofrer degradação limitada. Asfaltenos altamente condensados são muito resistentes à biodegradação.

Dois excelentes trabalhos compilaram diversos estudos sobre a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (WATKINSON *et al.*, 1990; SMITH, 1990), onde são apresentados os mecanismos de biodegradação dos hidrocarbonetos mais estudados.

A Tabela 2 apresenta um resumo da relação entre a estrutura química de alguns hidrocarbonetos de petróleo, quais derivados são encontrados e sua biodegradabilidade.

TABELA 2. Estrutura química e biodegradabilidade (U.S. Environmental Protection Agency, 1995).

Biodegradabilidade	Exemplo de constituintes	Derivados nos quais os constituintes são usualmente encontrados
Mais degradável	n-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, dimetilpentenos, metiloctanos	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decanos	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Tetradecanos	Óleos lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
Menos degradável	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Acenaftenos	Óleos lubrificantes

3.2 Solubilidade em água

O comportamento de uma mistura de hidrocarbonetos em água é bem diferente do que em solo. A maior diferença entre ambientes aquáticos e terrestres está relacionada ao movimento e à distribuição do óleo no meio físico, além da presença de matéria particulada, que afeta as características físicas e químicas do óleo e, consequentemente, a sua suscetibilidade à biodegradação (BOSSERT & BARTHA, 1984). Os vazamentos terrestres são caracterizados, principalmente, pelo movimento vertical dos hidrocarbonetos através das camadas do solo. A infiltração dos hidrocarbonetos no solo reduz a emissão de seus compostos voláteis para a atmosfera e as partículas sólidas podem reduzir, por sorção, a toxicidade de seus componentes.

A baixa solubilidade dos hidrocarbonetos em água dificulta o acesso dos microrganismos ao óleo. Os hidrocarbonetos aromáticos são mais solúveis em água do que os alifáticos, mas sua solubilidade diminui com a adição de radicais alquil (YAWS & YANG, 1990). Observa-se na Tabela 3 que a solubilidade de alguns compostos alifáticos decresce com o aumento da massa molar, sendo listadas propriedades físicas de alguns compostos de petróleo.

TABELA 3. Propriedades físicas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (EASTCOTT, 1988; HOWARD, 1990).

Composto n-alcanos	Nº de carbonos (anéis de benzeno)	Massa molar	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulação (°C)	Solubilidade (mg/L)
N-Alcanos					
etano	2	30,1	-172,0	-88,6	63,7
n-hexano	6	86,2	-94,3	68,7	12,3
n-decano	10	128,3	-31,0	174,0	0,05
n-hexadecano	16	226,4	19,0	287,0	5,2 × 10-5
n-eicosano	20	282,6	36,7	343,0	3,1 × 10-7
n-hexacosano	26	366,7	56,4	412,2	1,3 × 10-10
Iso-Alcanos					
2-metilpentano	6	86,2	154,0	60,3	13,8
2,2,4-trimetilpentano	8	114,2	107,2	127,0	2,4
4-metiloctano	9	128,3	-	142,0	0,12
Alcenos					
1-hexeno	6	84,2	-139,8	63,5	50,0
trans-2-hepteno	7	98,2	-109,5	98,0	15,0
1-octeno	8	112,2	-121,0	121,0	2,7
Monoaromáticos					
benzeno	(1)	78,11	5,5	80,1	1791,0
tolueno	(1)	92,13	-95,0	110,6	534,8
o-xileno	(1)	106,16	-25,0	144,4	175,0
etilbenzeno	(1)	106,16	-94,9	136,2	152,0
Poliaromáticos					
naftaleno	(2)	128,16	80,0	218,0	31,7
antraceno	(3)	178,22	217,0	354,0	0,0451
fenantreno	(4)	178,22	101,0	340,0	1,1
pireno	(5)	202,4	150	> 360	0,132

A formação de emulsões pela produção microbiana de biossurfactantes é um processo importante na mobilização de hidrocarbonetos por fungos e bactérias (SINGER & FINNERTY, 1984).

3.3 Concentração do contaminante

A taxa de biodegradação de muitos compostos orgânicos, principalmente em ambientes aquáticos, é normalmente proporcional à sua concentração. Há compostos, como os hidrocarbonetos poliaromáticos, cujas taxas de biodegradação são mais limitadas devido à baixa solubilidade em meio aquoso do que por sua concentração no meio (THOMAS *et al.*, 1986). Assim, a forte dependência da taxa de biodegradação à concentração é, geralmente, observada com hidrocarbonetos de maior solubilidade em água.

Altas concentrações de hidrocarbonetos podem causar inibição da biodegradação devido à limitação de nutrientes ou de oxigênio, ou ainda, ao efeito tóxico exercido pelos hidrocarbonetos voláteis (FUSEY & OUDOT, 1984). Dibble e Bartha (1979) demonstraram que o aumento da massa de hidrocarboneto em um lodo oleoso aplicado em solo, na faixa de 1,25 a 5% hidrocarboneto/massa solo seco, provocou aumento da evolução de CO₂, e para o teor de 10% de hidrocarbonetos, houve decréscimo em 15% na evolução de CO₂ em relação à respiração do solo.

3.4 Temperatura do solo

A temperatura do solo é um dos fatores mais importantes no controle da atividade microbiana e das taxas de biodegradação da matéria orgânica. As taxas de degradação enzimática e o metabolismo microbiano, teoricamente, dobram a cada aumento de 10°C, até atingir temperaturas inibitórias, que para a maioria dos microrganismos é aproximadamente 40°C (ATLAS, 1988; LEAHY & COLWELL, 1990). A temperatura pode também influenciar indiretamente a biodegradação de um componente, ou mistura, pela mudança de suas propriedades físicas, composição química ou toxicidade à microflora. Em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta e sua solubilidade em água diminui e a volatilização de alcanos tóxicos de baixo peso molecular é reduzida, adiando o início da biodegradação,

3.5 Umidade do solo

O solo deve possuir umidade suficiente para estimular o crescimento de microrganismos degradadores, mas não em demasia, a ponto de levar à redução da permeabilidade do solo. A água é necessária para o crescimento microbiano, para a difusão dos nutrientes e para a eliminação dos excretas. O nível de umidade do solo influencia os tipos de microrganismos presentes e os processos de volatilização. Normalmente, os teores de água no solo ideais para atividade microbiana são de 25 a

85% da capacidade de campo, dependendo do tipo de solo e do contaminante (PAUL & CLARK, 1989).

Holman e Tsang (1995) mostraram que a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos foi mais eficiente em teores de umidade entre 50 e 70% da capacidade de campo para um solo franco siltoso. Para sistemas de biopilha, Von Fahnstock e colaboradores (1998) recomendam a faixa ótima de umidade de 10% a 20% em peso, correspondendo à faixa de 70% a 95% da capacidade de campo do solo.

3.6 pH

O pH do solo influencia os processos de biorremediação, pois a maioria das bactérias vive na faixa de pH de 5 a 9, com um valor ótimo, em geral, um pouco acima de 7 (DRAGUN, 1988). Mudanças no pH podem causar alterações na comunidade microbiana, uma vez que cada espécie possui pH ótimo específico. De modo geral, poucos são os solos que necessitam de ajuste radical de pH antes do tratamento. Para pH muito ácido, é adicionado cal para elevá-lo, e para pHs muito básico, adiciona-se sulfato de amônia ou sulfato de alumínio para reduzi-lo (HUESEMANN, 1994).

3.7 Biodisponibilidade de compostos orgânicos no solo

Os poluentes presentes em solos e sedimentos, em muitos casos, são oriundos de contaminações antigas. Vários estudos mostraram que pesticidas persistentes (DDT e dieldrin dentre outros) e outros compostos orgânicos inicialmente desapareciam do solo com velocidade razoável, mas em seguida a velocidade diminuía de modo considerável. Em muitos casos, nessa segunda fase, a velocidade de desaparecimento era muito baixa e de difícil detecção, pois esses compostos orgânicos são intemperizados, isto é, biodegradados pelos microrganismos (assim como perdas por volatilização e por outros processos abióticos), levando de forma clara à diminuição progressiva de sua biodisponibilidade aos microrganismos (ALEXANDER, 1995).

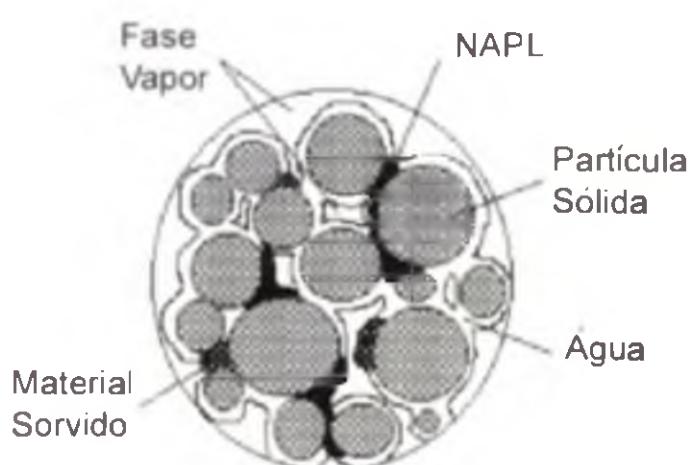


FIGURA 2. Distribuição dos contaminantes orgânicos nas diversas fases na zona não saturada do solo.

A taxa e a extensão da biodegradação de compostos orgânicos no solo, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas complexas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, da água intersticial e dos microrganismos degradadores dos contaminantes. Observa-se na Figura 2 a dissolução dos compostos orgânicos na fase aquosa que envolve as partículas do solo, dissolvidos na fase vapor, sorvidos nas partículas sólidas ou na matéria orgânica ou ainda como líquido de fase não aquosa – NAPL (*non aqueous phase liquid*).

Nos casos em que a taxa de biodegradação dos contaminantes é próxima à taxa de dessorção destes contaminantes da fase sólida do solo e a de dissolução do NAPL, a biorremediação é limitada pela sua biodisponibilidade. Quando a taxa de biodegradação é muito menor que a de dessorção, então, fatores microbianos limitam a biorremediação.

Processos intensivos de mistura de solo, adição de agentes surfactantes e estimulação eletrocinética são algumas soluções para elevar a biodisponibilidade dos compostos orgânicos. Mesmo sabendo que muitas bactérias têm capacidade de degradar compostos hidrofóbicos, pouco se conhece das estratégias utilizadas para melhorar seu acesso a poluentes hidrofóbicos no solo (WICK *et al.*, 2001). A mais conhecida é a produção de biosurfactantes, onde os glicolipídios e os fosfolipídios são os mais comuns grupos de biosurfactantes encontrados; contudo, o tipo, a quantidade e a qualidade do surfactante microbiológico dependem da natureza do substrato, entre outros fatores (WILLUMSEN & KARLSON, 1997).

Os biosurfactantes são usualmente produzidos por microrganismos quando crescidos em substratos pouco solúveis em água (NEU, 1996). O aumento da biodegradação de compostos hidrofóbicos é devido à solubilização ou emulsificação destes poluentes sorvidos ou em fase livre com auxílio de surfactantes microbianos, que formam uma pseudofase miscelar dentro da fase aquosa, acumulando o contaminante facilitando seu transporte e aumentando o acesso aos microrganismos (ZHANG *et al.*, 1997).

3.8 Resíduos de ligação

Todos os compostos químicos orgânicos antropogênicos formam resíduos não extraíveis, em extensão variável, quando em contato com o solo. Esse fenômeno tem sido estudado há anos, especialmente no campo da agroquímica de solos. Processos análogos têm sido observados durante a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. A formação de resíduos de hidrocarbonetos poliaromáticos tóxicos e carcinogênicos é de particular interesse.

Os resíduos de ligação (*bound residues*) de pesticidas despertaram interesse na comunidade científica há mais de três décadas quando estudos demonstraram que somente poucos pesticidas não era biodegradada, mas sim ligada aos minerais de argila e à matéria orgânica do solo (KÄSTNER & RICHNOW, 2001). A formação de resíduos de ligação no solo é atribuída principalmente a interações físicas e químicas dos compostos xenobióticos com a matéria orgânica natural. Os principais fatores que influenciam a sua formação são:

- Reatividade química das substâncias antropogênicas;
- Reatividade do substrato ligante (matriz macromolecular);
- Processos de transformação microbiana;
- Presença de agentes catalisadores como enzimas, minerais de argila, oxigênio e compostos de manganês e ferro.

Os resíduos de ligação têm sido considerados como o principal sumidouro de compostos orgânicos no solo. Eles são usados em estratégias alternativas à biorremediação de contaminantes antropogênicos (BOLLAG, 1992).

O processo geral de formação de resíduos de ligação é freqüentemente considerado como uma transformação de poluentes antropogênicos em húmus, já que o carbono xenobiótico fica associado com a matéria orgânica natural presente no solo. Assim, o carbono xenobiótico é seqüestrado pelas matrizes orgânicas macromoleculares, de difícil acesso, com o uso de procedimentos analíticos convencionais. Com a ligação, o composto xenobiótico perde a sua identidade estrutural, o que inclui suas características físicas, químicas e biológicas.

Hupe e colaboradores (1998) desenvolveram estudo para levantar o balanço de carbono de óleo diesel durante sua biodegradação em solo. Ao final do teste, 59% do carbono presente no óleo diesel inicialmente foi convertido a dióxido de carbono, 4% foi volatilizado, 4% foi incorporado à biomassa e 8% foi extraído por processo convencional de extração (Tabela 4). A diferença obtida no balanço de carbono foi de 24%, sendo sugerido que esta quantia pode ter ficado sorvida no húmus do solo como resíduo de ligação.

A atividade microbiana estimula a formação de resíduos de ligação e está associada à biodegradação da respectiva substância química, que quando ligada ao material residual, tem sua biodisponibilidade reduzida no solo. Contudo, se por um lado a toxicidade real da substância diminui, por outro, a sua persistência no ambiente é aumentada. As consequências ecológicas dos resíduos de ligação não foram ainda bem avaliadas, sendo necessário saber quanto tempo estes materiais ligados à matriz húmica do solo ficam imobilizados. Como os resíduos macromoleculares não extraíveis são de difícil análise por meio de procedimentos analíticos convencionais, as consequências ecológicas desses resíduos precisam ser melhores estudadas, principalmente em termos de sua estabilidade química a longo prazo.

Num contexto de avaliação de risco ambiental, o emprego de técnicas de biorremediação deve levar em consideração a formação de metabólitos não extraíveis.

4. Estratégias de tratamento de solo contaminado

Três estratégias básicas são usadas, em separado ou em conjunto, para a remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo: destruição ou

TABELA 4. Balanço de massa de carbono (HYPE *et al.*, 1998).

Fração	Porcentagem de carbono de óleo diesel na fração
Hidrocarbonetos de petróleo totais extraíveis	8
Volatilizado	4
Convertido em CO ₂	59
Não quantificado (sorvido na matriz do solo)	24
Biomassa microbiana	4

alteração dos contaminantes; extração ou separação dos contaminantes do local; e imobilização dos contaminantes.

As tecnologias capazes de destruir os contaminantes ou alterar sua estrutura química podem ser divididas em processos físicos (incineração, dessorção térmica, lavagem com água, e outros), químicos (solidificação/estabilização, oxidação química, e outros) e biológicos (biorremediação). Esses métodos podem ser aplicados *in situ* ou *ex situ*. Nos processos *in situ*, a remediação é feita no próprio meio contaminado, sem a escavação do solo. No caso de técnicas *ex situ*, o solo é escavado retirado e tratado em instalação de depuração específica no local (*on-site*) ou fora dele (*off-site*).

Qualquer que seja a estratégia utilizada de tratamento, as funções naturais do solo serão perturbadas. No caso do uso de técnicas *in situ*, o solo pode sofrer mudanças em sua estrutura e/ou no balanço hídrico. Já as técnicas *ex situ* podem modificar as características do solo de modo mais intenso, podendo haver diminuição das quantidades de matéria orgânica, nutrientes e capacidade de troca catiônica, com consequente redução de suas propriedades filtrantes, de tamponamento e de depuração.

A Figura 3 ilustra a classificação das tecnologias de remediação em função do tipo de estratégia. Geralmente, uma única tecnologia não pode remediar totalmente um sítio contaminado, assim é indispensável a combinação de diversas técnicas.

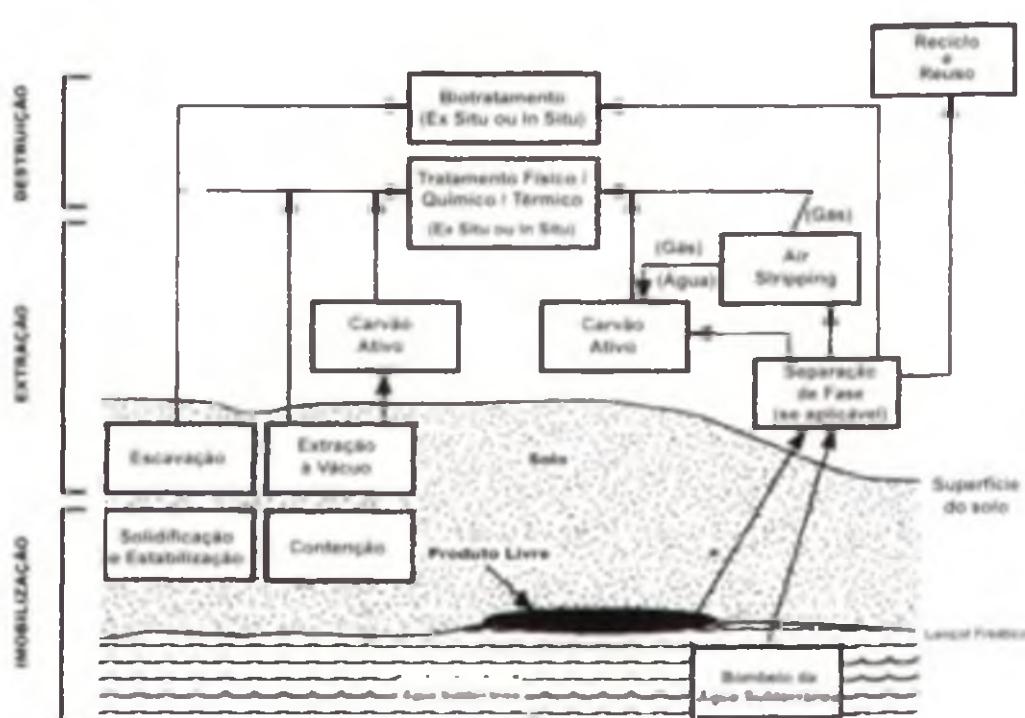


FIGURA 3. Classificação das tecnologias de remediação em função do tipo de estratégia (adaptado da DOD Environmental Technology Transfer Committee, 1994).

A Tabela 5 mostra a distribuição de tecnologias utilizadas nos sítios tratados do programa Superfundo, entre 1982 e 1999 (U.S. Environmental Protection Agency, 2001). Neste programa, técnicas de biorremediação, incluindo a fitorremediação, foram aplicadas em 89 sítios (12%), e os processos *ex situ* foram empregados em 49 casos, enquanto que os tratamentos *in situ* tiveram sua aplicação em 40 casos.

5. Biorremediação

A biorremediação é um conjunto de processos de tratamento que utiliza organismos (bactérias, fungos e vegetais) para biodegradar, reduzir ou eliminar o

TABELA 5. Distribuição do uso de tecnologias de tratamento de solos em sítios dentro do programa Superfundo (U.S. Environmental Protection Agency, 2001).

Tecnologia	Número de sítios	%
Solidificação/Estabilização	137	18,5
Incineração (off-site)	94	12,7
Dessorção Térmica	61	8,3
Biorremediação	49	6,6
Incineração (on-site)	42	5,7
Tratamento Químico	10	1,4
Neutralização	7	0,9
Lavagem de Solo	6	0,8
Aeração Mecânica do Solo	5	0,7
Extração do Vapor do Solo	5	0,7
Extração por Solvente	4	0,5
Queima/Detonação a Céu Aberto	2	0,3
Vitrificação	2	0,3
Separação Física	1	0,1
EX SITU TOTAL	425	57,5
Extração do Vapor do Solo	196	26,5
Solidificação/Estabilização <i>In Situ</i>	46	6,2
Biorremediação <i>In Situ</i>	35	4,7
Inundação de Solo <i>In Situ</i>	16	2,2
Recuperação Térmica Melhorada	6	0,8
Tratamento Químico	5	0,7
Fitorremediação	5	0,7
Extração de Duas Fases	3	0,4
Separação Elétrica	1	0,1
Vitrificação	1	0,1
IN SITU TOTAL	314	42,5
TOTAL	739	100,0

risco de compostos orgânicos perigosos ao meio ambiente e à saúde humana. A biorremediação pode ser realizada com a adição de nutrientes e a otimização de condições ambientais do solo (pH, temperatura, umidade, entre outros), chamada bioestimulação, ou pela adição de microrganismos com a capacidade de degradar contaminantes específicos rapidamente, conhecida como bioaumentação ou bioaumento.

Em relação às técnicas convencionais (incineração, aterro, entre outro), as técnicas de biorremediação são normalmente mais econômicas, eliminam permanentemente o risco da contaminação e têm boa aceitação pública. Há um encorajamento das agências reguladoras ambientais com respeito à sua utilização, podendo ser associadas com outros métodos químicos ou físicos de tratamento.

Contudo, há diversas limitações para o uso da biorremediação. Diversas substâncias não são susceptíveis à biodegradação, como metais pesados,

radionuclídeos e alguns compostos organoclorados. Em alguns casos, a biodegradação do contaminante pode levar à formação de metabólitos tóxicos.

A seguir serão descritas as principais técnicas de biorremediação de solos, aplicabilidade, vantagens, desvantagens e custos.

5.1 Landfarming



FIGURA 4. *Landfarming* da Refinaria Landulpho Alves - Bahia.

O *Landfarming* é um sistema de tratamento *ex situ* que consiste de uma célula, geralmente impermeabilizada, para evitar a percolação dos lixiviados, no qual o solo contaminado é disposto e homogeneizado periodicamente por meio de aragem (Figura 4).

No *landfarming*, assim como em outros processos biológicos, os constituintes orgânicos do solo contaminado são degradados, transformados ou imobilizados pelos microrganismos nativos. Diversos fatores podem ser controlados para melhorar

a taxa de degradação do contaminante, dentre os quais a umidade (geralmente por irrigação), a aeração (por aragem do solo, com uma freqüência pré-determinada), os nutrientes e o pH. A eficiência de biodegradação é função também do tipo e concentração do contaminante, propriedades do solo, temperatura, volatilização, e vários outros (U.S. Army Environmental Center, 2002).

Este processo tem sido usado com sucesso há mais de 25 anos pela indústria de petróleo no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (RISER-ROBERTS, 1998). A biorremediação não degrada contaminantes inorgânicos, no entanto, pode ser utilizada para alterar o estado de valência dos compostos inorgânicos e provocar a sorção, a imobilização em partículas do solo, a precipitação, o acúmulo e a concentração dos compostos inorgânicos em micro e macrorganismos.

Os fatores que podem limitar a aplicabilidade ou eficiência do processo de *landfarming* incluem: necessidade de grandes espaços; dificuldade de controle da umidade do solo em função das chuvas nos sistemas sem cobertura, interferindo no tempo de tratamento; volatilização dos contaminantes para a atmosfera e geração de poeira, principalmente durante a aragem e outras operações de manejo.

Os custos de instalação, operação e manutenção de um sistema de *landfarming* para remediar solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo são relativamente baixos comparados com outras tecnologias de tratamento (US\$ 30 a 60/ton). O tempo de tratamento pode ser de 6 meses a 2 anos, dependendo do contaminante (U.S. Army Environmental Center, 2002).

No mundo, os casos de campo onde vêm sendo empregados os sistemas de *landfarming* são inúmeros (U.S. Army Environmental Center, 2002). A Petrobras foi pioneira na implantação desse sistema no Brasil em diversas refinarias. O SITEL - Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos do Pólo Petroquímico do Sul - tem sistema de *landfarming* com seis células, compreendendo uma área por célula de 1.911 m² (CORSAN, 2005).

5.2 Tratamento de solo (*Land Treatment*)

O sistema de tratamento de solo, também conhecido por *land treatment*, é um processo de biorremediação *in situ*, em escala de campo, no qual a superfície de solos e/ou sedimentos contaminados são revolvidos por aragem, incrementando assim a atividade biodegradativa dos microrganismos endógenos. O princípio do tratamento é o mesmo do *landfarming*, porém sem a construção de uma célula com impermeabilização e de sistema de drenagem de coleta de lixiviado. O sítio do tratamento deve ser gerenciado de forma a prevenir possíveis contaminações de água subterrânea, água superficial, ar ou cadeia alimentar. Para tanto, é necessária a implantação de um programa de monitoramento adequado.

Este processo tem promovido sucesso no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, com baixa eficiência para hidrocarbonetos pesados. Contaminantes que foram tratados com sucesso por esse processo incluem óleo diesel, óleos combustíveis, querosene de aviação, borras oleosas, resíduos de preservação de madeira (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pentaclorofenol e creosoto), resíduos de coque e alguns pesticidas (U.S. Army Environmental Center, 2002).

Os fatores que podem limitar a aplicabilidade ou eficiência do processo são basicamente os mesmos apresentados para o *landfarming*. Visando prevenir a contaminação das águas superficiais, deve ser construído um sistema de drenagem superficial de água de chuva. Os custos do tratamento de solo estão na faixa de US\$ 30 a US\$ 70 por m³ e o tempo de tratamento pode levar de 6 meses a 2 anos, dependendo do contaminante (U.S. Army Environmental Center, 2002). Não foram encontrados relatos de uso desta técnica no Brasil.

5.3 Biopilha

O sistema de biopilha, uma variação da técnica de compostagem de materiais orgânicos, é uma tecnologia *ex-situ* já desenvolvida em escala industrial basicamente para solos arenosos. O solo escavado contaminado é colocado em pilhas, cujo teor do contaminante presente é reduzido por biodegradação. Umidade, nutrientes, oxigênio, temperatura e pH podem ser controlados para estimular a atividade degradativa dos microrganismos presentes no solo (Office of Underground Storage Tanks, 1995; U.S. Army Environmental Center, 2002).

As biopilhas são normalmente dispostas em locais impermeabilizados com mantas para reduzir os riscos de migração do lixiviado para regiões de subsuperfície



FIGURA 5. Sistema de biopilha com sistema de aeração na Refinaria Landulpho Alves, Bahia.

não contaminadas. O oxigênio é fornecido por meio de uma rede de tubos perfurados instalado acima da base, conectada a um soprador ou bomba a vácuo (Figura 5). Em alguns casos, é necessário construir um sistema de coleta de lixiviado para o seu tratamento, especialmente quando existe sistema de distribuição de umidade. Usualmente, as biopilhas são cobertas com mantas impermeáveis para minimizar o escape de poluentes, principalmente voláteis, além de proteger o solo do vento e das chuvas (Von FAHNESTOCK *et al.*, 1998).

A biopilha é usada em tratamentos de curta duração (3 a 6 meses), em condições otimizadas. O sistema de biopilha tem projeto e construção relativamente simples, necessitando de área menor do que o sistema de *landfarming*. Algumas desvantagens são: os constituintes voláteis tendem a evaporar durante o tratamento, sendo necessários sistemas de coleta de emissões de vapores; o sistema tem baixo desempenho em solos com baixa condutividade hidráulica ($K < 10^{-4}$ cm/s) e com teor de silte e argila superior a 10%, em peso, e a redução da concentração de poluente abaixo de 95% é difícil alcance. Os custos de investimento e operação são relativamente baixos, na faixa de US\$ 100 a 200/t, incluindo a preparação do local e a colocação de manta protetora (U.S. Army Environmental Center, 2002).

A biopilha já provou ser eficiente na diminuição da concentração de praticamente todos os constituintes presentes em produtos de petróleo, principalmente em solos arenosos (KONING *et al.*, 1998; JØRGENSEN *et al.*, 2000, NAMKOONG *et al.*, 2002, U.S. Army Environmental Center, 2002). Para solos argilosos, poucas são as referências de sucessos de sua aplicação (CHINEAU *et al.*, 2003).

No Brasil, a primeira aplicação do sistema de biopilha foi o tratamento de solo contaminado por óleo combustível na Refinaria Henrique Lage, em São José dos Campos. O projeto e a execução do tratamento foram realizados pela BluePoint Ambiental Ltda (BLUEPOINT, 2005) em 2000, com o uso de sistema de aeração passiva. A partir de então, vários foram implantados, principalmente em refinarias e terminais de petróleo.

5.4 Compostagem

Na compostagem os compostos orgânicos presentes no solo são metabolizados e transformados em húmus e em subprodutos inertes, tais como dióxido de carbono, água e sais minerais, tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Esse método de estabilização de resíduos orgânicos tem sido empregado há várias décadas para



FIGURA 6. Sistema de compostagem em Carmópolis, Sergipe.

pregada no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, HPA, pesticidas e explosivos (TNT, RDX, entre outros), com bons resultados (U.S. Army Environmental Center, 2002; U.S. Environmental Protection Agency, 1998). Material estruturante (cavaco de madeira, resíduos de agricultura, entre outros) é misturado ao solo para melhorar a sua textura, visando melhorar a permeabilidade de gases e líquidos na leira. Muitas publicações utilizam os termos biopilha e compostagem como sinônimos. Contudo, de modo geral, para sistemas com revolvimento periódico das pilhas tem-se empregado o termo compostagem.

As vantagens e desvantagens da compostagem são basicamente as mesmas da biopilha, porém com melhor controle da permeabilidade do solo, principalmente no caso de tratamento de solos argilosos. O revolvimento periódico das pilhas evita a compactação do solo com o tempo, o que é prejudicial para boa transferência de ar e líquido pela biopilha.

No Brasil, a aplicação da técnica de compostagem em escala semi-industrial e industrial foi pouco citado em literatura técnica. Seabra e colaboradores (SEABRA *et al.*, 2005) desenvolveram o tratamento de solos argilosos e arenosos, contaminados por derramamentos acidentais de petróleo com biopilhas dinâmicas. No caso de solos argilosos, cujo teor médio de HPT inicial era de 5,8% em massa, o melhor desempenho de remoção de HPT alcançado foi de 86,2% após 24 semanas de tratamento. A remoção de HPT (concentração inicial de 1,7% em base mássica) obtida para solos arenosos foi de 70%, mas com apenas 12 semanas de tratamento. Em ambos os casos empregou-se casca de arroz como material estruturante, com relações volumétricas de solo-casca de 9:1 a 4:1.

5.5 Biorreator

O tratamento do solo em biorreator envolve o tratamento controlado do solo escavado, geralmente numa fase lama. O solo escavado passa inicialmente por um

esterços de animais, bio-sólidos municipais, poda de jardinagem e resíduos urbanos orgânicos, dentre outros (U.S. Environmental Protection Agency, 1998). As condições termofílicas (50 a 65°C) devem ser mantidas durante o processo até atingir o estágio maduro, quando as temperaturas decrescem. O solo contaminado é colocado em leiras ou pilhas, que são periodicamente reviradas mecanicamente para que haja incorporação de oxigênio (Figura 6).

Nos últimos anos, a compostagem também tem sido em-

processo de retirada de pedras e entulho. Depois, é misturado com água numa concentração dependente da concentração dos contaminantes, taxa de biodegradação e a natureza física do solo. Em alguns processos existe uma pré-lavagem do solo para concentração dos contaminantes. A areia limpa pode ser, então, descartada, restando somente os finos contaminados e o efluente líquido para serem tratados biologicamente. Normalmente, a lama contém de 10 a 30% de sólidos em peso.

Os sólidos são mantidos em suspensão num reator cilíndrico e misturados com nutrientes e oxigênio, verificando-se o pH. Microrganismos também podem ser adicionados ao sistema se a população presente não for suficiente. Quando a biodegradação é completada, a lama é desidratada por meio de clarificadores, centrífugas, filtros à vácuo, filtros prensa, entre outros.

Existem também os biorreatores de fase sólida, que funcionam com teores de umidade baixas, na faixa de 70% da capacidade de campo do solo. Entre as diversas configurações, podemos destacar os de tambores rotativos e parafusos sem-fim.

Os biorreatores são usados basicamente no tratamento de solos escavados contaminados por compostos orgânicos semivoláteis e voláteis não halogenados. Solos não homogêneos e argilosos podem dificultar seu manuseio. Além disso, a secagem dos sólidos finos após o tratamento e a disposição do efluente líquido não reciclado podem ser dispendiosas.

No Brasil, o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) está desenvolvendo um reator de fase sólida patrocinado pela Petrobrás. Já se obteve uma eficiência de remoção de HPT superior a 60%, com 42 dias de tratamento (RAIMUNDO & RIZZO, 2004). O objetivo deste estudo é utilizar o reator na aceleração da remoção de contaminantes num curto prazo de tempo. Em seguida o solo poderá passar por um tratamento complementar (como biopilha ou *landfarming*) até atingir a concentração alvo da remediação.

5.6 Biorremediação melhorada de solo

A biorremediação melhorada de solo é um processo biológico *in situ* em que os microrganismos nativos ou adicionados ao meio são estimulados por meio da circulação de soluções aquosas, através dos solos contaminados, de maneira a aumentar a biodegradação dos contaminantes orgânicos ou imobilizar os inorgânicos. A irrigação em solos rasos pode ser realizada através de galerias de infiltração ou por aspersão, enquanto que para solos profundos são usados poços de injeção. Parâmetros importantes como nutrientes, oxigênio, pH entre outros são corrigidos com o objetivo de aumentar a eficiência do processo.

Em condições aeróbias e na presença de nutrientes, os microrganismos podem converter os contaminantes orgânicos a CO₂, H₂O e biomassa. Já na ausência de O₂ (anaerobiose) e dependendo das condições químicas e microbiológicas de subsuperfície, os contaminantes orgânicos podem ser metabolizados a metano (metanogênese), o sulfato convertido a H₂S ou S₂ (redução de sulfato) e o nitrato ser transformado em N₂ (desnitrificação).

A principal vantagem deste processo é permitir que o solo seja tratado *in situ* sem que seja escavado e transportado, evitando maiores alterações no local de contaminação. Contudo, é uma tecnologia que requer um longo de tempo de tratamento, podem levar até alguns anos.

As técnicas de biorremediação têm tido sucesso no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, inclusive com os hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos – BTEX), especialmente em locais com baixo nível de contaminação.

Os fatores que podem limitar a aplicabilidade ou eficiência do processo são: aumento da mobilidade do contaminante, tornando necessário o tratamento da água subterrânea subjacente; colonização preferencial de microrganismos, causando obstrução dos poços de injeção de água e nutrientes; e existência de fluxos preferenciais no solo, diminuindo o contato entre os fluidos injetados e os contaminantes. Esta tecnologia não deve ser utilizada em solos heterogêneos, argilosos ou muito estratificado, devido às limitações na transferência do O₂ (ou outro acceptor de elétrons). As condições climáticas, como por exemplo, temperatura e chuvas, afetam a degradação biológica dos contaminantes.

As diversas variantes da biorremediação melhorada de solo vêm sendo usadas há mais de dez anos nos EUA, Canadá, Holanda e Alemanha, entre outros. Nestes países existem mais de 150 empresas de engenharia e consultoria que projetam e aplicam esta técnica em escala industrial (U.S. Army Environmental Center, 2002). No Brasil poucos registros do emprego desta técnica em campo são encontrados. Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB), existem atualmente 10 sítios aplicando técnicas de biorremediação, porém sem especificar o tipo de sistema empregado (CETESB, 2005).

Os custos de tratamento variam de US\$ 30 a 100/m³ de solo. As principais variáveis que afetam o custo são o tipo do contaminante, a profundidade da contaminação, além do possível uso da bioaumentação (U.S. Army Environmental Center, 2002).

5.7 Fitorremediação de compostos orgânicos

A fitorremediação é um conjunto de processos *in situ* que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar ou destruir os contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes no solo. Há diversos mecanismos utilizados pelas plantas na fitorremediação, tais como: biodegradação na rizosfera, a fito-extração ou fito-acumulação, a fitodegradação e a fito-estabilização. O capítulo 26 trata mais detalhadamente desse assunto.

Na biodegradação da rizosfera (ver capítulo 26) substâncias liberadas pelas raízes fornecem nutrientes aos microrganismos que incentivam a biodegradação dos contaminantes. As raízes das plantas também aumentam a permeabilidade do solo, o que facilita o transporte de água e sua aeração, aumentando a eficiência dos processos biodegradativos dos contaminantes.

A fito-acumulação é a absorção de contaminantes pelas raízes das plantas e a sua translocação/acumulação nas folhas e talos. Já a fitodegradação, é a metabolização de contaminantes dentro do tecido das plantas. As plantas produzem enzimas tais como oxigenases e dehalogenases, que auxiliam a degradação catalítica dos contaminantes. A fito-estabilização é o fenômeno de produção de compostos químicos pelas plantas para imobilizar contaminantes na interface das raízes com o solo.

A fitorremediação pode ser aplicada para a remediação de metais, pesticidas, solventes, explosivos, petróleo e derivados, além de lixiviados de aterros.

A escolha das espécies de plantas adequadas ao processo de fitorremediação está condicionada às condições climáticas (temperatura, umidade do ar e do solo, insolação, ventos, entre outros). A profundidade da zona de tratamento é determinada pelas raízes. A eficiência do processo de fitorremediação diminui com o aumento da sorção dos poluentes no solo e os contaminantes podem ser mobilizados para água subterrânea ou bioacumulados em animais.

Na última década, foram desenvolvidos diversos projetos de pesquisa em laboratório e em campo para avaliar a aplicabilidade da fitorremediação, com resultados bastante promissores, principalmente no tratamento de solos contaminados por metais (U.S. Environmental Protection Agency, 2000, U.S. Army Environmental Center, 2002). No Brasil, este método ainda é pouco difundido, necessitando de uma maior investigação com o emprego de espécies vegetais brasileiras. Segundo a CETESB, há atualmente um sítio em São Paulo onde está sendo aplicada a técnica de fitorremediação, sem especificar qual o tipo empregado (CETESB, 2005).

5.8 Bioventilação (*Bioventing*)

A bioventilação (*bioventing*) é uma técnica de remediação *in situ* de solo contaminado por compostos aerobicamente degradáveis. Oxigênio é fornecido à região do solo contaminado por meio de uma rede de tubos, podendo ser tanto por injeção como por extração de ar em fluxo lento, para estimular a atividade microbiana (Figura 7). O tratamento pode durar de poucos meses a vários anos, dependendo do contaminante e das características geológicas do local.

Essa técnica foi desenvolvida para remediação de bases da força aérea americana, sedo testada em 117 bases. Seu uso é regulamentado em 30 estados americanos e aprovado em todas as 10 regiões da EPA. Aplica-se em solos contaminados por hidrocarbonetos, solventes não clorados, alguns pesticidas, preservantes de madeira e outros compostos químicos orgânicos (U.S. Army Environmental Center, 2002).

Fatores que podem limitar a aplicabilidade e eficiência do processo incluem: lentes

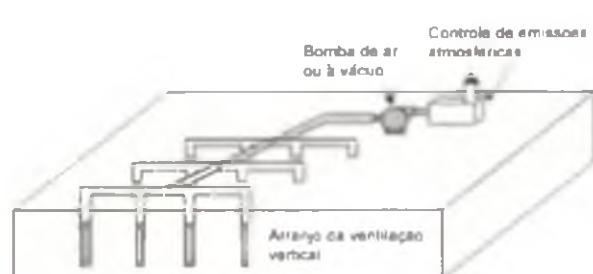


FIGURA 7. Esquema típico de bioventilação (adaptado de DOD, 1994).

de solos saturados e de baixa permeabilidade que reduzem o desempenho da bioventilação; armazenamento de vapores em porões dentro do raio de influência dos poços de injeção de ar, o que pode ser contornado pela extração do ar próximo a estes locais; solos com umidade muito baixa, que podem limitar a biodegradação e por consequência a efetividade da bioventilação; pode ser necessário o monitoramento dos gases exaustos na superfície; e temperaturas muito baixas diminuem a velocidade da degradação.

Os custos variam de US\$ 10 a US\$ 70 /m³, dependendo do tipo e concentração do contaminante, permeabilidade do solo, quantidade e espaçamento entre os poços, taxa de bombeamento e tratamento de gases exaustos (U.S. Army Environmental Center, 2002).

No Brasil, há algumas experiências no emprego da bioventilação, principalmente em postos de serviços. Segundo a Cetesb, existem cinco locais onde a bioventilação está sendo aplicada (CETESB, 2005).

5.9 Atenuação natural monitorada

A atenuação natural monitorada (ANM) é o uso de processos naturais encontrados em subsuperfície, que reduzem as concentrações do contaminante a níveis que não ofereçam riscos à saúde humana e ao meio ambiente, num prazo de tempo razoável comparado aos oferecidos pelos métodos ativos. Esses processos físicos, químicos e biológicos, que atuam sem a ação do homem na redução de massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração dos contaminantes, incluem volatilização, dispersão, diluição, sorção, biodegradação e reações químicas com materiais de subsuperfície.

De todos esses processos naturais de atenuação, a biodegradação é o mais importante, já evidenciado por diversos autores (BARKER *et al.*, 1987; CHIANG *et al.*, 1989; WEIDEMEIER *et al.*, 1995; BENETTI, 1999). Por isso, a atenuação natural é também conhecida como biorremediação intrínseca ou natural, processo em que os microrganismos presentes na subsuperfície degradam os contaminantes sem o estímulo do homem.

A biorremediação intrínseca não é uma tecnologia propriamente dita, e sim uma estratégia de remediação. O uso desta abordagem requer avaliações da taxa de degradação dos contaminantes e de suas vias de transporte, uso de modelagem matemática para prever as concentrações dos contaminantes à montante de pontos receptores sensíveis (poços de abastecimento de água, corpos d'água superficiais), principalmente quando a pluma de contaminação está ainda se expandindo (U.S. Army Environmental Center, 2002).

Nos últimos anos, em função do crescente interesse no emprego da biorremediação intrínseca pela indústria e agências governamentais americanas, diversos protocolos desta técnica foram criados (RENNER, 1998; MACDONALD, 2000). Esses protocolos são freqüentemente utilizados pelas partes responsáveis pelo sítio contaminado ou reguladores para planejar, implementar, justificar ou avaliar o uso da biorremediação natural no sítio.

Referências

- ALEXANDER, M. How Toxic are Toxic Chemicals in Soil? *Environmental Science and Technology*, v. 29, p. 2713-2717, 1995.
- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. *Petroleum Industry Environmental Performance - Sixth Annual Report*. No: N10050, 1998.
- ATLAS, R.M. Biodegradation of Hydrocarbons in the Environment. *Basic Life Science*, v.45, p.211-22, 1988.
- BARKER, J.F.; PATRICK, G.C.; MAJOR, D. Natural Attenuation of Aromatic Hydrocarbons in a Shallow Sand Aquifer. *Ground Water Monitoring Review*, v.7, n.1, p.64-71, 1987.
- BARTHA, R.; ATLAS, R.M. "Transport and Transformation of Petroleum in Biological Processes". In: D.F. BOESCH, N.N. RABALAIS. (Ed.) In: *Long-Term Environmental Effects of Offshore Oil and Gas Development*, 1987, p.287-341, London, Elsevier Applied Science.
- BÉRAUD, J.F. Introduction. In: *Handbook of Diagnostic Procedures for Petroleum-Contaminated Sites*, p 1, Lecomte, P., Mariotti, C. (eds.). John Wiley & Sons, 1997, Chichester, Inglaterra.
- BENETTI, I.B. *Avaliação do Potencial de Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Monoaromáticos de Petróleo em Presença de Etanol*. 1999. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFSC.
- BLUEPOINT. <http://www.bluepointambiental.com.br/empresa.html>, 2005.
- BOLLAG, J.M. Decontaminating Soil with Enzymes. *Environmental Science and Technology*, v.26, p.1876-1881, 1992.
- BOSSERT, I.; BARTHA, R. The Fate of Petroleum in Soil Ecosystems". In: Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum Microbiology*, p. 434-476, New York, Macmillan Publ. Co., 1984
- CASARINI, D.C.P. *Proposta de Valores de Referencia de Qualidade e Intervenção para Solos e Água Subterrâneas no Estado de São Paulo*. In: II Seminário Internacional Sobre Qualidade de Solos Águas Subterrâneas: Proposta de Valores Orientadores para o Estado de São Paulo, 2000, São Paulo.
- CETESB. *Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, 2001, São Paulo.
- CETESB. http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo-areas_contaminadas/relacao_areas.asp, 2005.
- CHAINEAU, C.H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J.F.; DUCREAUX, J.; BALLERINI, D. Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air and Soil Pollution*, v.144, p.419-440, 2003.
- CHIANG, C.Y.; SALANITRO, J.P.; CHAI, E.Y.; COLTHART, J.D.; KLEIN, C.L. Aerobic Biodegradation of Benzene, Toluene, and Xylene in a Sandy Aquifer: Data Analysis and Computer Modeling. *Ground Water*, v.27, n.6, p.823-834, 1989.
- CONNELL D.W.; MILLER, G.J. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. Wiley, New York, 1984.
- CORSAN. http://www.corsan.com.br/sitel/sitel_sicecors, 2005.
- DAVIS, K.L.; REED, G.D.; WALTER, L.A Comparative Cost for Petroleum Remediation Technologies. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon*. Edited by Hinchee et al. (eds.), Battelle Press, 1995, Columbus, Ohio.
- DEUEL, L.E.JR.; HOLLIDAY, G.H. *Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry*. PennWell, 1997, Tulsa, EUA.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.37, p.729-739, 1979.
- DOD ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY TRANSFER COMMITTEE. *Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide*. 4 ed., 2002, SFIM-AEC-ET-CR-97053.
- DRAGUN, J. Microbial Degradation of Petroleum Products in Soil. In: Calabrese, E.J., Kostecki, P.T. (eds), *Soils Contaminated by Petroleum Products: Environmental and Public Health Effects*, 1988, p.289-300, New York, John Wiley & Sons, Inc.
- EASTCOTT, L.; SHIU, W.Y.; MACKAY, D. Environmentally Relevant Physical-Chemical Properties of Hydrocarbons: A Review of Data and Development of Simple Correlations. *Oil Chem. Pollut.*, v.4, p.191-216, 1988.
- ETKIN, D.S. *Historical Overview of Oil Spills From all Sources (1960-1998)*. In: International Oil Spill Conference, 1999.
- FUSEY, P.; OUDOT, J. Relative Influence of Physical Removal and Biodegradation in the Depuration of Petroleum Contaminated Seashore Sediments. *Marine Pollutant Bulletin*, v.15, p.136-141, 1984.

- HOLMAN, H.Y.; TSANG, Y.W. **Effects of Soil Moisture on Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons.** In: *In Situ Aeration: Air Sparging, Bioventing, and Related Remediation Processes* [Pat. In Situ On-Site Bioremediation. Int. Symp., San Diego, USA, April 24-27 | 1995], p.323-332. Hinchee, R.E., Miller, R.N., Johnson, P.C. (eds). Battelle Press, 1995, Columbus, Ohio.
- HOWARD, P.H. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals - Vol. I and II.** Chelsea, Lewis Publishers, Inc., 1990.
- HUESEMANN, M.H. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Journal of Soil Contamination*, v.3, n.3, p.229-318, 1994.
- HUPE, K.; HEERENKLADE, J.; WOYCZECHOWSKI, H.; BOLLOW, S.; STEGMANN, R. Influence of Oxygen on the Degradation of Diesel Fuel in Soil Bioreactors. *Acta Biotechnologica*, p.109-122, 1998.
- JØRGENSEN, K.S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.M. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Composting in Biopiles. *Environmental Pollution*, v.107, p.245-254, 2000.
- KÄSTNER, M.; RICHNOW, H.H. Formation of Residues of Organic Pollutants Within the Soil Matrix – Mechanisms and Stability. In: R. STEGMANN, G. BRUNNER, W. CALMANO, G. MATZ (Ed). *Treatment of Contaminated Soil*. 2001, p.219-251. Berlim, Springer-Verlag.
- KERR, J.M.; MELTON, H.R.; MAGAW, R.I.; MCMILLEN, S.J.; NAUGHTON, G. Polyaromatic Hydrocarbon Content in Crude Oils Around the World. In: *SPE/EPA Exploration and Production Environmental Conference*. 1999, Austin, EUA, February 28- March 3.
- KONING, M.; HUPE, K.; LÜTH, J.C.; COHRS, I.; QUANDT, C.; STEGMANN, R. Comparative Investigations Into the Biological Degradation of Contaminants in Fixed-Bed and Slurry Reactors. In: *Contaminated Soil '98* [Proceedings of Sixth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, 17-21 May 1998, Edinburg, UK]. 1998, p.531-538. London, Thomas Telford.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Review*, v.54, p.305-315, 1990.
- LEE, R.F.; HOEPPEL, R. Hydrocarbon Degradation Potencial in Reference Soils and Soils Contaminated with Jet Fuel, p.570-580. In: R.E. Hinchee, R.F. Olfenbuttel (Ed). *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. 1991, Boston, Butterworth-Heinemann.
- MAGAW, R.I.; MCMILLEN, S.J.; GALA, W.R.; TREFRY, J.H.; TROCINE, R.P. A Risk Evaluation of Metals in Crude Oils. In: *SPE/EPA Exploration and Production Environmental Conference*. 1999, Austin, USA, February 28- March 3.
- MACDONALD, J.A. Natural Attenuation for Groundwater Cleanup. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, n.15, p.346-353A, 2000.
- NAMKOONG, W.; HWANG, E.Y.; PARK, J.S.; CHOI, J.Y. Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil with Composting. *Environmental Pollution*, v.119, p.23-31, 2002.
- NEU, T.R. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interface. *Microbiological Reviews*, v.60, p.151-166, 1996.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego, Academic Press, Inc., 1989.
- RAIMUNDO, R.S.; RIZZO, A.C.L. *Estudo do Emprego de Biorreator no Tratamento de Solo Contaminado por Petróleo*. XII Jornada de Iniciação Científica, 2004, Rio de Janeiro.
- RENNER, R. Intrinsic Remediation Under the Microscope. *Environmental Science and Technology*, v.32, n.7, p.180-182, 1998.
- RISER-ROBERTS, E. *Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes*. Lewis Publishers, 1998, Boca Raton, Florida.
- ROSATO, Y.B. Biodegradação do Petróleo. In: *Microbiologia Ambiental*, p.307. I.S. MELO, J.L. AZEVEDO (Ed.), Embrapa Meio Ambiente, 1997, Jaguariúna, SP. 440p.
- SEABRA, P.N.C.; LANDA, F.G.; FROTA, G.B.; PLATTE, E.B.; CASELLA, R.C.; Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in High Clay Content Soils. *8th International In Situ On-Site Bioremediation Symposium*. 2005, Baltimore, EUA, 6-9 Junho.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v.59, p.201-222, 1995.
- SINGER, M.E.; FINNERTY, W.R. Microbial Metabolism of Straight-Chain and Branched Alkanes. In: R. M. ATLAS (Ed.). *Petroleum Microbiology*. 1984, p.1-60, New York, Macmillan Publ. Co.
- SMITH, M.R. The Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. In: *Biodegradation*, v.1, p.191-206, 1990.
- THOMAS, J.M.; YORDY, J.R.; AMADOR, J.A.; ALEXANDER, M. Rates of Dissolution and Biodegradation of Water-Insoluble Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, p.290-296, 1986.

- TISSOT, B.P.; WELTE, D.H. **Petroleum Formation and Occurrence**. Berlim, Springer-Verlag, 1978.
- U.S. ARMY ENVIRONMENTAL CENTER. **Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide**. 2002, 4 ed. SFIM-AEC-ET-CR-97053.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites**. Office of Solid Waste and Emergency Response, 1995, EPA-510-B-95-007, Washington, D.C.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Introduction to Phytoremediation**. Office of Research and Development, 2000, EPA-600-R-99-107, Washington, D.C.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION / SUPERFUND. <http://www.epa.gov/superfund/index.htm>, 2001.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. <http://www.epa.gov/history/topics/lovecanal/01.htm>, 2005a.
- VON FAHNESTOCK, F.M.; WICKRAMANAYAKE, G.B., KRATZKE, R.J., MAJOR, W.R. **Biopile Design, Operation and Maintenance Handbook for Treating Hydrocarbon-Contaminated Soils**. Columbus, Battelle Press, 1998.
- WATKINSON, R.J.; MORGAN, P. Physiology of Aliphatic Hydrocarbon-Degrading Microorganisms. **Biodegradation**, v.1, p.79-92, 1990.
- WEIDEMEIER, T.H.; SWANSON, M.A.; WILSON, J.T.; KAMBELL, D.H.; MILLER, R.N.; HANSEN, J.E. Approximation of Biodegradation Rate Constants for Monoaromatic Hydrocarbons (BTEX) in Ground Water. **Groundwater Monitoring Summer**, p.186-194, 1995.
- WICK, L.Y.; SPRINGAEL, D.; HARMS, H.: "Bacterial strategies to improve the bioavailability of hydrophobic organic pollutants". In: R. STEGMANN, G. BRUNNER, W. CALMANO, G. MATZ (Ed), **Treatment of Contaminated Soil**, 2001, p.201-217, Berlim, Springer-Verlag.
- WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of Bacteria, Isolated from PAH-Contaminated Soils, for Production of Biosurfactants and Bioemulsifiers. **Biodegradation**, v.7, p.415-423, 1997.
- YAWS, C.L.; YANG, H.C. Water Solubility Data for Organic Compounds. **Pollution Engineering**, v.22, p.70-75, 1990.
- ZHANG, Y.; MAIER, W.J.; MILLER, R.M. Effect of Rhamnolipids on the Dissolution, Bioavailability, and Biodegradation of Phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, v.31, p.2211-2217, 1997.

25

Fitorremediação de Metais

Marcia Pletsch, Ándrea C. A. Barros e Brancilene S. de Araujo

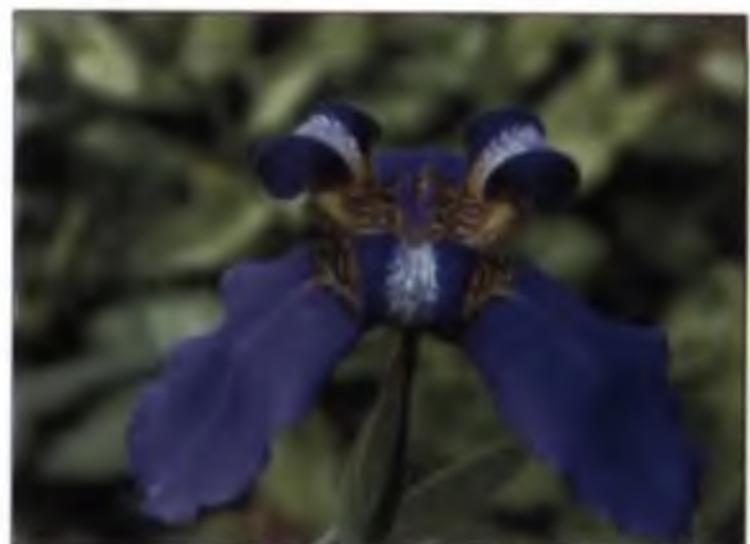


Foto I.S. Melo

I. Retrospectiva histórica

O emprego da nomenclatura fitorremediação (grego *phyto* = planta; latim *remedium* = cura ou restauração) para referir-se à tecnologia que utiliza plantas com o propósito de limpar ambientes contaminados por substâncias poluentes é recente, embora seus princípios já venham sendo implementado há 300 anos. Em séculos passados, na Europa, eram utilizados ecossistemas artificiais, que consistiam de solos ricos em matéria orgânica, plantas aquáticas, algas e microfauna, para tratar águas contaminadas com detritos ricos em metais originados da mineração do carvão.

O primeiro relato completo sobre a capacidade das plantas terrestres de acumular metais data de 1865 e foi publicado na obra de J. Sachs intitulada *Handbuch der Physiologischen Botanik*. Este compêndio inclui dados analíticos sobre o conteúdo em Zinco (Zn) das plantas *Thlaspi alpestre* var. *calaminare*, *Viola calaminaria*, *Armeria vulgaris* e *Silene inflata*, encontradas numa área rica em calamina (silicato básico de Zn) próxima a Aachen, na Alemanha. No ano de 1948, foi publicada outra obra importante de autoria de R. P. Sermolli que trata dos estudos botânicos realizados pelo autor e outros pesquisadores na região da Toscana, Itália, o qual contém a descrição da espécie *Alyssum bertolonii* e sua extraordinária capacidade em acumular Níquel (Ni) (BROOKS, 1998).

Todavia, foi somente em 1976, que T. Jaffré e colaboradores (JAFFRÉ *et al.*, 1976) introduziram o termo hiperacumulador para descrever a planta *Sebertia acuminata*, que acumula altos níveis de Ni. Segundo esses pesquisadores, plantas hiperacumuladoras são aquelas capazes de armazenar quantidades de metal em níveis maiores que 0,1 ou 1 % do peso seco, dependendo do metal. O termo fitorremediação tornou-se popular a partir da década de 80, pelas obras de S. D. Cunningham e R. R. Brooks, quando esta tecnologia passou a ser pesquisada intensivamente por empresas privadas, universidades e institutos de pesquisa.

A fitorremediação baseia-se na associação entre plantas, comunidade microbiana e interface solo/água. Particularmente importante são as interações que ocorrem na zona circunvizinha às raízes, denominada rizosfera, pois o número de microrganismos nesta área é muito maior que no solo desprovido de vegetação (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; BROOKS, 1998).

2. Causas da contaminação inorgânica e seus riscos

Os elementos químicos e seus compostos são constituintes naturais do solo, no qual estão presentes em concentrações que normalmente não causam danos à biosfera. No entanto, as atividades humanas, como a mineração, a manufatura de produtos sintéticos (pesticidas, tintas, pilhas e baterias), a disseminação do chorume

proveniente dos aterros sanitários e o emprego de fertilizantes são responsáveis pelo aumento excessivo da concentração de certos elementos, com consequências extremamente negativas sobre os seres vivos. Os malefícios causados à saúde são decorrentes da exposição crônica através da água contaminada e da transferência dos metais na cadeia alimentar. A intoxicação aguda é rara e ocorre através da ingestão direta, do contato com a pele ou da inalação de poeira contaminada.

Os principais poluentes inorgânicos compreendem os metais pesados (Pb, Zn, Cd, Cr, Co, Cu, Ni e Hg), os semi-metais (As), os não-metais (Se), bem como os radioisótopos (^3H , ^{14}C , ^{36}Cl , ^{90}Sr , ^{129}I , ^{137}Cs e ^{238}U) e os cátions e ânions derivados de minerais (Na^+ , NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- e ClO_4^-). Uma vez introduzidas no ambiente, estas substâncias permanecem inalteradas, ao contrário das moléculas orgânicas que sofrem degradação. As únicas exceções são o Hg e o Se que podem ser transformados e volatilizados pela ação dos microrganismos.

3. Fitoremedeção e sua dependência da biodisponibilidade dos metais no solo

No solo, os metais se distribuem em cinco frações principais: a) fração solúvel contendo íons e complexos metálicos livres; b) fração correspondente às partículas do solo contendo metais adsorvidos, onde ocorrem trocas iônicas; c) fração contendo complexos organometálicos; d) fração contendo precipitados de óxidos, hidróxidos ou carbonatos metálicos; e) fração contendo agregados de silicatos com metais. Somente os metais presentes nas duas primeiras frações estão biodisponíveis para absorção pelas raízes e, por isso, a fitoremedeção só é eficiente na remoção de metais destas frações.

Alguns metais, como Zn e Cd, ocorrem principalmente sob formas biodisponíveis, mas outros, como o Pb, ocorrem na forma de precipitados insolúveis, mais difíceis de serem mobilizados. Quanto maior for o número de sítios na matriz do solo com capacidade para troca catiônica, maior será o número de íons metálicos imobilizados. Em condições ácidas, esses íons metálicos podem ser trocados por H^+ e liberados para a fração solúvel. Dessa forma, o pH do solo afeta não apenas a biodisponibilidade dos metais, como todo o processo de transporte e absorção pelas raízes.

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram estratégias para maximizar a absorção de íons essenciais em situações de suficiência ou deficiência metálica, através da liberação de substâncias quelantes ou através da alteração do pH da rizosfera. Algumas gramíneas, por exemplo, liberam exudatos ricos em fitosideróforos ou fitometalóforos, que formam respectivamente complexos com Fe^{3+} e outros metais. Esses complexos representam um suprimento imediato de metal para redução e transporte através das membranas (Kochian, 1993; Fan *et al.*, 1997). Nas situações em que existe excesso de metal, a produção de fitosideróforos ou fitometalóforos pela planta possivelmente diminui (Alam *et al.*, 2000). No caso das dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas, são os exudatos vegetais ricos

em ácidos orgânicos (malato, acetato, citrato e oxalato) que promovem a acidificação da rizosfera e aumentam a disponibilidade dos cátions metálicos através da troca com H⁺. Sob condições de estresse metálico, entretanto, a absorção pode ser limitada pela complexação dos íons metálicos com os ácidos orgânicos e sua consequente precipitação na vizinhança das raízes (PELLET *et al.*, 1995).

A biodisponibilidade dos metais no solo pode ser influenciada pela presença de microrganismos. A redução do estado de oxidação do metal pode ser responsável pela sua imobilização, como foi demonstrado através de estudos com *Pseudomonas putida*, a qual é capaz de converter Cr⁶⁺ em Cr³⁺ (BLAKE *et al.*, 1993). As próprias paredes celulares negativamente carregadas das bactérias e fungos servem como sítios de ligação e deposição de íons metálicos (GALLI *et al.*, 1994). A situação inversa também pode ocorrer, isto é, os microrganismos presentes na rizosfera podem aumentar a mobilidade dos metais através da excreção de compostos orgânicos. Existem evidências de que tanto os elementos essenciais como o Ferro (Fe), quanto os não essenciais como o Cd, podem ser biodisponibilizados para as raízes em função da presença de microrganismos (CROWLEY *et al.*, 1991). No que diz respeito à captação de nutrientes como o P, por exemplo, a associação das raízes com certos fungos (micorriza) é normalmente benéfica para ambos. No caso de excesso metálico, a presença da micorriza pode influenciar a translocação do metal das raízes para as folhas, existindo evidências contraditórias que demonstram tanto o aumento da translocação, quanto a diminuição (SHETTY *et al.*, 1994; KHAN *et al.*, 2000).

A adição de quelantes artificiais ao solo (Figura 1), com o fim de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade dos metais é um recurso que vem sendo investigado intensivamente, sobretudo no que diz respeito ao Pb. Vários trabalhos relataram não apenas o aumento da solubilização do Pb no solo pela adição de quelantes como o ácido etilenodiaminetetraacético (EDTA), mas também o aumento da translocação e acumulação nas folhas (VASSIL *et al.*, 1998; KIRKHAM, 2000). Infelizmente, a percolação através do solo dos complexos altamente solúveis de Pb-EDTA aumenta os riscos de contaminação das águas subterrâneas.

Quelantes sintéticos

Nomenclatura química	Abreviação
Ácido etilenodiaminetetraacético	EDTA
Ácido hidroxietilenodiaminotriacético	HEDTA
Ácido etilenoglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N'N' tetraacético	EGTA
Ácido -N,N'-bis(2-hidroxifenil)etenodiaminoacético	EDDHA
Ácido N,N'-bis(2-hidroxifenil)etenodiaminodiacético	HBED
Nitriloacetato trisódico	NTA
Ácido N-(2-acetamido)iminodiacético	
S-carboximetilcisteína	

FIGURA 1. Quelantes sintéticos usados para aumentar a solubilidade e maximizar a biodisponibilidade dos metais no solo.

4. Resistência e tolerância aos metais

Para crescerem e completarem seu ciclo vital, as plantas requerem macronutrientes (N, P, K, S, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Ni, Cu, Cr, Co, Mo e Se). Os elementos essenciais são absorvidos, translocados e armazenados através de mecanismos específicos que envolvem a passagem dos metais através das membranas. Esse processo é seletivo e mediado por proteínas transportadoras, as quais possuem um domínio extracelular de ligação com os íons metálicos e um domínio hidrofóbico transmembrana que facilita a passagem dos íons para o meio intracelular. O domínio extracelular da proteína é responsável pela especificidade e permite a ligação e passagem de determinados íons, mas não de outros. Algumas proteínas transportadoras reconhecem e mediam a passagem de cátions bivalentes, mas não de cátions mono ou trivalentes.

As proteínas transportadoras são caracterizadas pelos parâmetros cinéticos V_{max} e K_m , que definem respectivamente a capacidade de transporte e a afinidade pelos íons. V_{max} significa a velocidade máxima de transporte dos íons através das membranas e K_m é a concentração de íons na solução externa que indica quando a velocidade de transporte é equivalente a $V_{max}/2$. Portanto, um baixo valor de K_m significa que a proteína possui elevada afinidade pelos íons e que estes são transportados para o interior das células mesmo quando a concentração extracelular é baixa (LASAT, 2002). Há evidências de que as proteínas transmembranas não diferenciam alguns íons essenciais dos não essenciais. Por exemplo, a absorção e transporte do metal tóxico Cd²⁺ através das membranas é mediada pelas mesmas proteínas que carreiam o seu análogo químico essencial Zn²⁺ (HART *et al.*, 1998).

Dessa forma, a concentração intracelular de íons é mantida dentro dos níveis fisiológicos (<10 mg/kg) e não excede as necessidades metabólicas da planta. Esse controle rigoroso da concentração dos elementos essenciais e não essenciais e, consequentemente, da estabilidade do meio interno, é conhecido como homeostase. Pequenas concentrações de elementos não essenciais podem até estimular os processos biológicos nos organismos, mas altas concentrações de qualquer dos elementos causam efeitos tóxicos. As plantas reagem ao estresse metálico por aclimatização (resistência) ou adaptação (tolerância) ao meio em que vivem. Estes termos são freqüentemente usados como sinônimos, mas na realidade eles tem significado diverso (Figura 2).

As plantas desenvolveram mecanismos distintos para tolerar altas concentrações de metais, sendo que os principais são: a) restrição da absorção do metal pelas raízes e sua estabilização do mesmo no solo (plantas exclusoras; e *Festuca rubra*), b) imobilização do metal nas raízes através da adsorção aos sítios negativamente carregados das paredes celulares ou pela captura em estruturas subcelulares (vacúolos), impedindo o seu movimento para as folhas; c) translocação do metal para as folhas e sua acumulação nos vacúolos, por complexação com ácidos orgânicos (plantas hiperacumuladoras; e *Thlaspi caerulescens* e *T. goesingense*), d) excreção ativa do metal. A Figura 3 resume os principais processos envolvidos no fluxo dos metais da rizosfera para as raízes e folhas, os quais constituem a base da fitoremedeação.

Respostas ao estresse metálico	
Aclimatização Resistência	Adaptação Tolerância
Depende de características não herdadas, que podem empregar mecanismos semelhantes ou diferentes daqueles que contribuem para a homeostase. Um indivíduo ou população pode resistir e continuar a funcionar perfeitamente bem, quando exposto ao estresse, sem que haja alteração no seu conteúdo genético (plasticidade fenotípica). Estas características podem ser perdidas, quando a causa do estresse for removida.	Depende de características que evoluíram através da seleção natural de indivíduos em resposta à exposição a concentrações de metal no ambiente excessivamente altas. Os genes responsáveis por estas características podem ser passados para as gerações subsequentes. Tolerância é a capacidade do indivíduo de manter a homeostase quando submetido a determinadas condições ambientais e depende do seu potencial genético.

FIGURA 2. Definição dos termos empregados para explicar como os organismos sobrevivem ao estresse metálico.

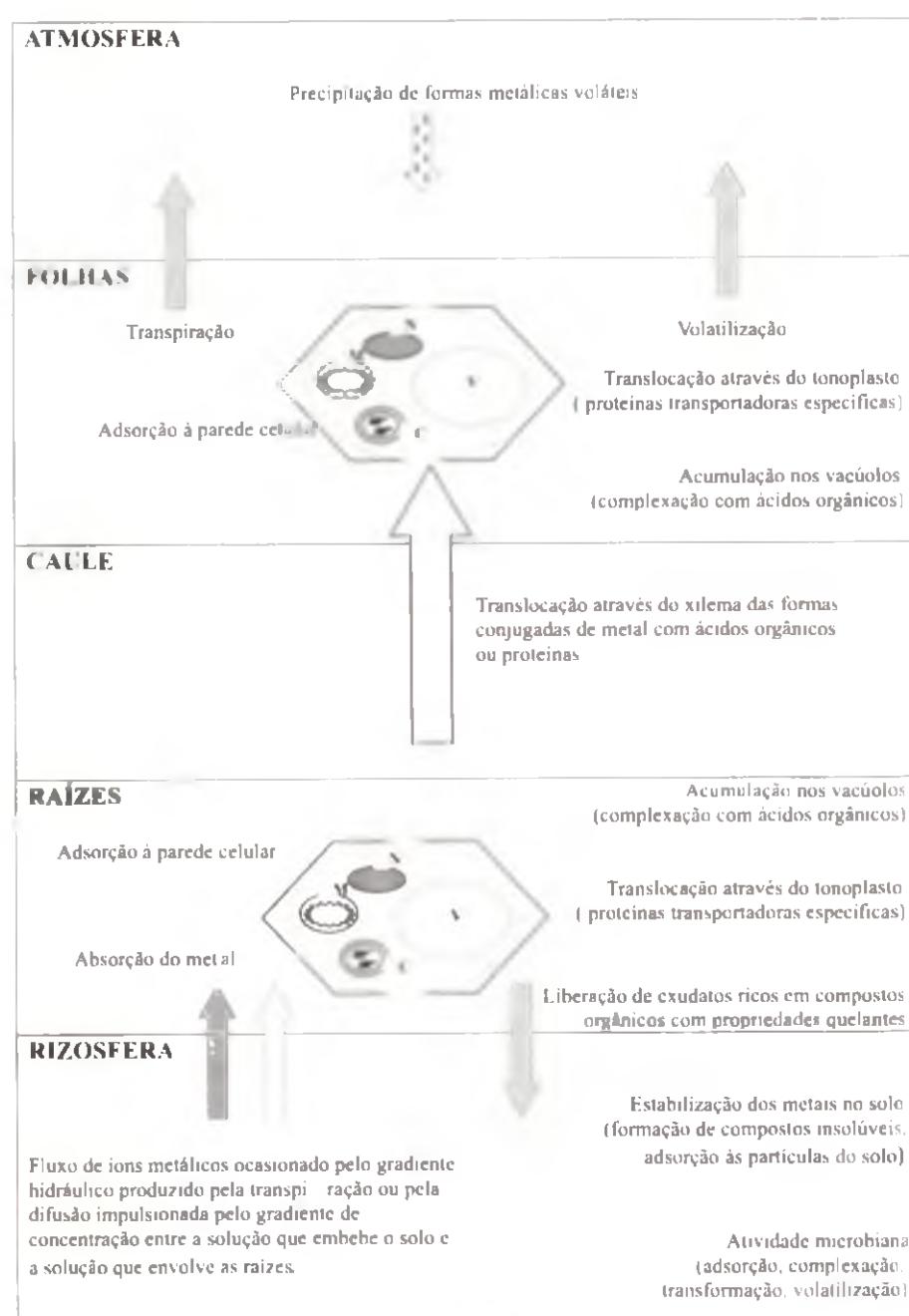


FIGURA 3. Processos envolvidos na fitorremediação de metais. Os símbolos C, M, N e V referem-se às organelas cloroplasto, mitocôndria, núcleo e vacúolo respectivamente.

5. Bases bioquímicas e fisiológicas da hiperacumulação

Um dos aspectos da fisiologia vegetal mais explorados pela fitorremediação é a capacidade das plantas de absorver os contaminantes da rizosfera e translocá-los para as folhas, cuja biomassa pode ser então colhida e posteriormente processada (incinerada ou usada para compostagem, por exemplo). A identificação de mais de 200 espécies terrestres capazes de tolerar e acumular altas concentrações de metais pesados nas folhas indica que a fitorremediação depende muito do potencial genético da planta. Além de acumular altos níveis de metais essenciais, as espécies hiperacumuladoras podem absorver e acumular elementos não essenciais em níveis 100 vezes maior que

aqueles normalmente encontrados nas plantas comuns, isto é, mais que 100 mg/kg de Mn ou Cd, mais que 1000 mg/kg de Co, Cu, Cr ou Pb e mais que 10000 mg/kg de Ni ou Zn (LASAT, 2000). As espécies hiperacumuladoras estão distribuídas em várias famílias, entre as quais destacam-se aquelas citadas na Tabela 1.

Os mecanismos sugeridos até o momento para explicar a hiperacumulação de metais estão relacionados com os sistemas de transporte, com a compartimentalização intracelular e com a captura dos metais na parede celular. A capacidade de hiperacumular metais pode ser determinada em algumas espécies pela velocidade de translocação do metal das raízes para as folhas. A existência de tal mecanismo pode ser ilustrada pelo trabalho de Lasat e colaboradores (2000), os quais compararam *Thlaspi caerulescens* e *T. arvense*. A primeira acumula altas concentrações de Zn nas folhas (até 3% do peso seco), enquanto que a segunda é uma espécie normal ou não hiperacumuladora. Os autores demonstraram que o fluxo de Zn através da membrana plasmática das células das raízes é maior em *T. caerulescens* do que em *T. arvense*, assim como o fluxo através das células das folhas e pelo xilema. As análises mostraram que o aumento da velocidade de transporte de Zn em *T. caerulescens* é resultado do nível elevado da proteína transportadora de Zn (ZNT1) nas raízes e folhas. Em *T. arvense*, o nível de ZNT1 é muito menor e induzido pela deficiência de Zn. O sequenciamento de ZNT1 mostrou que esta proteína pertence a mesma família de transportadores IRT1 e ZIP encontrada em *Arabidopsis thaliana*, responsável pela passagem dos micronutrientes Fe e Zn, respectivamente.

No caso de *T. goesingense*, sua extraordinária capacidade para tolerar e armazenar altas concentrações de Ni está relacionada com o transporte eficiente do metal para dentro do vacúolo e a sua compartimentalização do mesmo nesta organela na forma de complexos com ácidos orgânicos (KRAMER *et al.*, 2000). Em *T. goesingense* o transporte de Ni através do tonoplasto é facilitado pela ligação com um quelante citoplasmático, a histidina, e o armazenamento no vacúolo resulta da complexação com malato e citrato, promovida pelo pH ácido daquela organela. Ao contrário, *T. arvense* possui uma capacidade limitada de acumular Ni no vacúolo, de maneira que fique acumulado no citoplasma das células das raízes. O pH neutro

TABELA 1. Exemplos de espécies naturais hiperacumuladoras de metal.

Elementos	Espécies	Famílias
Cu/Co	<i>Haumaniastrum robertii</i>	Lamiaceae
	<i>H. katangense</i>	Lamiaceae
Mn	<i>Macadamia neurophylla</i>	Proteaceae
	<i>Maytenus bureaviana</i>	Celastraceae
Ni	<i>Alyssum bertolonii</i>	Brassicaceae
	<i>Phyllocladia coronata</i>	Rubiaceae
Se	<i>Astragalus racemosus</i>	Fabaceae
	<i>Lecythis ollaria</i>	Lecythidaceae
Zn/Cd/Pb	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae
	<i>T. rotundifolium</i>	Brassicaceae

do citoplasma facilita a ligação com as biomoléculas, especialmente glutationa, aminoácidos, proteínas e nucleotídeos, interferindo com os processos vitais e levando à morte celular. A hiperacumulação vacuolar de Zn também foi observada em *T. caerulescens*, cujas folhas armazenam o metal na forma hidratada em coordenação com citrato e oxalato (LASAT *et al.*, 2000).

Entre os mecanismos que permitem a acumulação de metais pesados, inclui-se a produção de fitoquelatinas, peptídeos ricos em cisteína, cuja fórmula estrutural é (gGlu-Cis)_nGli. A síntese das fitoquelatinas é induzida por vários metais (Zn, Pb, Cu e principalmente Cd) e é catalisada pela fitoquelatina sintetase que media a transferência consecutiva de unidades glutamil cisteinil para a glutationa (gGlu-Cis-Gli). Possivelmente, as fitoquelatinas funcionam como carreadores citoplasmáticos, que facilitam o transporte do metal para o vacúolo através do tonoplasto, minimizando desta forma a ação tóxica sobre as células. A evidência para tal hipótese partiu do trabalho de Salt & Rauser (1995), que identificaram nas células de *Avena sativa* (aveia) uma proteína capaz de transportar fitoquelatinas e seus complexos com Cd do citoplasma para o vacúolo. Outro grupo menos conhecido de proteínas ricas em cisteína envolvidas no transporte de metais em plantas terrestres são as metalotioneínas (MURPHY & TAIZ, 1995). No caso das espécies *T. caerulescens* e *T. arvense* mencionadas, não foram observados complexos de coordenação do Ni com S, confirmando que as fitoquelatinas não estão envolvidas na acumulação de Ni em nenhuma destas espécies.

A parede celular também funciona como um importante reservatório de metais devido à existência de inúmeros sítios de ligação com cátions. De acordo com Kramer e colaboradores (1997), a espécie hiperacumuladora *T. goesingense* parece ter maior capacidade de acumular Ni na parede celular do que *T. arvense*, quando expostas a concentrações tóxicas deste metal. Essa propriedade pode ser devida à presença de uma parede celular mais espessa ou uma parede celular com a matriz modificada, que permite maior número de ligações com o Ni.

Embora as espécies naturais possuam extraordinários atributos no que diz respeito a hiperacumulação, as possibilidades de empregá-las em fitorremediação são limitadas, pois o crescimento destas plantas é normalmente vagaroso, o porte é pequeno e a maioria só cresce em habitats restritos. Entretanto, existem perspectivas encorajadoras para se contornar estes obstáculos, visto que inúmeros experimentos envolvendo a produção de plantas transgênicas tolerantes a concentrações tóxicas de metais mostraram-se bem sucedidos (Tabela 2). Até o momento, a maioria destas novas variedades foram testadas somente em laboratório, mas não existe dúvida quanto a possibilidade de aplicação no campo.

6. Técnicas empregadas na fitorremediação de metais

Em fitorremediação, existem diferentes tipos de processos, que abrangem um grande número de compostos orgânicos e inorgânicos, porém apenas quatro são relevantes para a eliminação ou minimização da poluição causada por metais: a fitoextração, a fitoestabilização, a rizofiltração e a fitovolatilização.

TABELA 2. Exemplos de plantas transgênicas com atributos adequados à fitoremedeção de metais.

Espécies geneticamente modificadas	Produto da expressão gênica	Origem do gene	Características	Referências
<i>Arabidopsis thaliana</i>	metalotioneína	<i>Pisum sativum</i>	Maior acúmulo de Cu nas raízes	Evans <i>et al.</i> , 1992
	ion mercúrio redutase	<i>Escherichia coli</i>	Capacidade de volatilizar Hg ⁰	Bizily <i>et al.</i> , 2000
	arsenato redutase e γ-glutamilcisteína sintetase	<i>E. coli</i>	Maior acúmulo de As	Dhankner <i>et al.</i> , 2002
	proteína transportadora de zinco (ZAT)	<i>A. thaliana</i>	Maior acúmulo de Zn nas raízes	van der Zaal <i>et al.</i> , 1999
<i>Brassica juncea</i>	γ-glutamilcisteína sintetase	<i>E. coli</i>	Maior acúmulo de Cd nas raízes	Zhu <i>et al.</i> , 1999
	ATP sulfurlase	<i>A. thaliana</i>	Maior acúmulo de Se	Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1999
<i>Ipomoea aquatica</i>	adenosina fosfossulfato redutase	<i>A. thaliana</i>	Maior tolerância ao Cd	Sakulkoo <i>et al.</i> , 2005
<i>Lycopersicum esculentum</i>	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminase	<i>Enterobacter cloacae</i>	Maior tolerância e acúmulo de Cd, Co, Cu, Mg, Ni, Pb e Zn	Grichko <i>et al.</i> , 2000
<i>Nicotiana glauca</i>	fitoquelatina sintetase	<i>Triticum aestivum</i>	Maior acúmulo de Pb nas raízes e folhas	Gisbert <i>et al.</i> , 2003
<i>Nicotiana tabacum</i>	arsenato redutase	<i>E. coli</i>	Maior acúmulo de Cd	Dhankner <i>et al.</i> , 2003
	proteína transportadora de conjugados de glutatona (YCF1)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maior acúmulo de Pb e Cd	Song <i>et al.</i> , 2003

A fitoextração emprega espécies hiperacumuladoras para remover os metais do solo. Esta técnica requer o uso de espécies especialmente selecionadas, a correção apropriada do solo para permitir o desenvolvimento das plantas e, em certos casos, a adição de substâncias quelantes para facilitar a mobilização dos metais. Além disso, as plantas devem ser capazes de tolerar alta concentração de metal nas raízes e folhas, possuir mecanismos eficientes de translocação do metal para as partes aéreas e produzir abundante biomassa foliar. A vantagem deste processo é que o metal é permanentemente removido do solo e a desvantagem é a necessidade da biomassa ser colhida e processada de maneira apropriada, de acordo com as leis vigentes. A fitomineração, que é uma forma de fitoextração, permite que metais valiosos possam ser separados facilmente das cinzas originadas da matéria vegetal incinerada. Esta técnica é particularmente interessante no caso de minérios pobres em metais preciosos, cuja exploração convencional seja inviabilizada pelo custo excessivo. Exemplos de espécies hiperacumuladoras de metal encontram-se listadas na Tabela 1. A família Brassicaceae é um dos mais importantes grupos, englobando muitas espécies capazes de hiperacumular mais de um metal, característica esta que é vantajosa em termos de fitoremedeção (GRATÃO *et al.*, 2005). Entre as espécies mais pesquisadas atualmente estão *Brassica juncea* e *B. napus* (Brassicaceae), *Helianthus annus* (Compositae) e *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae).

A fitoestabilização usa espécies perenes para estabilizar ou imobilizar os metais no solo. As funções das raízes vegetais são: a) diminuir a percolação de água através da matriz do solo, b) atuar como uma barreira que impede o contato direto do homem e dos animais com os contaminantes e c) evitar a erosão do solo e a disseminação dos metais tóxicos para outras áreas (RASKIN & ENSLEY,

2000). A fitoestabilização pode ocorrer através da absorção, adsorção, precipitação, complexação ou redução dos metais, sendo muito útil no tratamento do solo contaminado por Pb, As, Cd, Cr, Cu e Zn. Uma das vantagens deste processo é que o descarte da biomassa vegetal não é requerido. As desvantagens são a permanência do metal no solo, o uso contínuo de aditivos minerais quimicamente reativos (hidroxiapatita, alumina-silicato etc) e o monitoramento freqüente da área plantada (RASKIN & ENSLEY, 2000). As espécies vegetais mais estudadas são as gramíneas *Agrostis tenuis*, *Festuca rubra* e *Deschampsia caespitosa*, sendo que as duas primeiras espécies já são comercializadas para fins de fitoestabilização (PANFILI *et al.*, 2005).

A rizofiltração é empregada primariamente para extrair metais de águas superficiais, subterrâneas e esgotos. Este processo envolve a absorção ou adsorção de metais em solução nas raízes de espécies aquáticas ou terrestres, podendo ser usada para a remoção de Pb, Cd, Cu, Ni, Zn e Cr. A rizofiltração tem a vantagem de que os metais não precisam ser translocados para as partes aéreas. Assim, espécies não hiperacumuladoras podem ser empregadas, sendo as terrestres as preferidas, porque apresentam raízes mais fibrosas e longas. As desvantagens deste processo são a necessidade de ajuste constante do pH, a aclimatização prévia das plantas em sistemas hidropônicos contendo água contaminada e a coleta e descarte periódico das plantas. Além disso, o desenho dos tanques influí no custo e na eficiência do processo. Esta técnica deve ser aplicada preferencialmente a grandes volumes de água com baixa concentração de metais e sua eficiência foi demonstrada em escala piloto com as espécies *B. juncea*, *H. annuus* e *Populus* spp. (RASKIN & ENSLEY, 2000).

A fitovolatilização envolve o uso de plantas que absorvem o metal e o transformam em formas voláteis que podem ser liberadas para a atmosfera através da transpiração. A desvantagem desta técnica é que o metal liberado para a atmosfera pode sofrer precipitação e ser depositado novamente no solo, lagos e oceanos. Este processo pode ser usado para os casos de contaminação por Hg e Se. A volatilização do Hg por plantas foi observada apenas em *Arabidopsis thaliana* e *Liriodendron tulipifera* transgênicas para o gene bacteriano *mer* (ión mercúrico redutase), capazes de converter Hg^{2+} em Hg^0 e eliminar a forma organometálica nociva de mercúrio (RUGH *et al.*, 1998; BIZILY *et al.*, 2000). No que diz respeito ao Se, foram identificadas plantas capazes de acumular e volatilizar Se tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos. *Astragalus bisulcatus* e *A. racemosus* (terrestres) e *Spartina alterniflora* (aquática) são os exemplos mais clássicos, mas *B. juncea* e *B. napus* também mostraram-se capazes de converter selenato e selenito em formas voláteis, como selenometionina e metilselênio (BANUELOS *et al.*, 1997; de SOUZA *et al.*, 2000).

7. Exemplos de aplicações comerciais da fitorremediação

Uma das empresas privadas pioneiras em comercializar plantas adequadas a fitorremediação é a Edenspace Systems Corporation (Edenspace, 2005). Esta empresa

adquiriu os direitos exclusivos para a comercialização da *Pteris vittata*, a qual é vendida com o nome de Edenfern™. Esta espécie hiperacumuladora de As, originalmente identificada por um grupo de pesquisadores da Universidade da Flórida (MA *et al.*, 2001), apresenta uma inigualável tolerância e habilidade para extrair e concentrar As nas folhas. Quando cultivada em solo contaminado, contendo 38,9 mg/kg de As, a concentração deste metalóide nas folhas chegou a 7526 mg/kg. Sob condições experimentais em solo excessivamente contaminado, a concentração de As nas folhas de *P. vittata* foi de 22630 mg/kg (2,3%). Mesmo em solos com baixa concentração de As (0,47 mg/kg), as folhas de *P. vittata* acumularam 136 mg/kg. Os mecanismos fisiológicos responsáveis por tais atributos não são completamente conhecidos, mas sabe-se que estão relacionados com o transporte de arsenato e fosfato, que está inextricavelmente associado. De acordo com Edenspace, a Edenfern leva entre 3 e 4 meses para reduzir o As do solo de 50 mg/kg para 10 mg/kg, considerando-se que 10 plantas sejam cultivadas por m² de área. Além disso, a Edenfern pode eliminar completamente o As da água em apenas 3 dias, a partir de uma concentração inicial de 200 mg/L.

Esta empresa foi responsável pela implementação de vários projetos de fitorremediação nos EUA. Um destes projetos foi desenvolvido em Bayone (New Jersey, USA) e envolveu o plantio da *B. juncea* e a aplicação de EDTA com a finalidade de remover Pb das camadas superficial (0 – 15 cm) e intermediária (15 - 30 cm) de um solo levemente alcalino contendo uma concentração média do metal equivalente a 2300 mg/kg e 1280 mg/kg respectivamente. Após três cultivos sucessivos de seis semanas cada, a quantidade de Pb no solo foi reduzida para 420 mg/kg na camada superficial e 992 mg/kg na camada intermediária. Estes resultados foram extremamente satisfatórios, visto que não se esperava que tal quantidade de Pb pudesse ser removida em tão pouco tempo. Além disso, provou-se que a redução de Pb no solo deveu-se à extração pelas plantas e não à lixiviação através do solo em consequência do uso de EDTA (HENRY, 2000).

8. Poluição metálica no Brasil e o emprego da fitorremediação

Não existe um levantamento detalhado sobre as áreas contaminadas por metal no Brasil, mas apenas alguns estudos que em sua maioria foram conduzidos na Região Sudeste (Tabela 3). É evidente que a poluição metálica se concentra principalmente nas áreas altamente urbanizadas e industrializadas do país, em decorrência dos efluentes industriais e domésticos. A aplicação excessiva de agrotóxicos também é uma das causas de poluição metálica, como no caso da microbacia de Caetés, cuja contaminação foi decorrente da lixiviação de fertilizantes e pesticidas. Estes estudos revelaram que nem sempre os metais encontrados nos sedimentos retirados dos córregos, açudes e lagoas estavam em formas biodisponíveis, enquanto que a água continha concentrações de metais acima dos padrões máximos estabelecidos pelo Ministério da Saúde (RAMALHO *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2001).

Os ecossistemas aquáticos são quase sempre os mais atingidos pela poluição e aqueles que causam maior preocupação, visto que os peixes, moluscos e algas são importantes constituintes da cadeia alimentar humana. Por esta razão, estes organismos servem como biosensores da qualidade do ambiente e vêm sendo usados para monitorar tanto a magnitude, quanto às variações sazonais da contaminação metálica na costa do Rio de Janeiro (JUNIOR *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2004).

O emprego da fitorremediação no Brasil é incipiente, quando comparado aos países da Europa e América do Norte. No entanto, alguns exemplos mostram que esta tecnologia começou a atrair a atenção dos cientistas brasileiros (Tabela 4). Dentre estes exemplos destaca-se o trabalho de Marques e colaboradores (2000), que utilizaram solo contaminado obtido da Companhia Mineira de Metais (Três Marias, MG) para demonstrar a importância do potencial genético na fitoextração. Neste experimento, a *Acacia magum* se destacou pelo acúmulo de Zn e Cd nas raízes, enquanto que a *Tabebuia impetiginosa* acumulou mais Pb neste tecido. As espécies *Cordia trichotoma* foram a que mais acumularam Zn nas folhas, enquanto que a *Solanum granulosum-leprosum* acumulou maior quantidade de Cd. O maior acúmulo de Pb nas partes aéreas foi observado em *Anadenanthera peregrina*.

TABELA 3. Áreas contaminadas por metais no Brasil.

Local	Metais	Referências
Atero controlado do Morro do Céu, (Niterói, RJ)	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ni, Zn	Sisinno & Moreira, 1996
Baía da Guanabara (Niterói, RJ)	Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ni, Zn	Neto <i>et al.</i> , 2000
Complexo lagunar de Jacarepaguá, (Rio de Janeiro, RJ)	Zn, Cu, Pb, As, Ba, Co, Cr, Ni	Almeida <i>et al.</i> , 2001
Córrego e açude Caetés (Paty Alferes, RJ)	Cd, Mn e Pb	Ramalho <i>et al.</i> , 2000
Baía de Vitória (Vitória, ES)	Cu, Pb, Zn, Mn, Hg	Joyeux <i>et al.</i> , 2004
Ilha Vitória (ES)	Al, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn	Jesus <i>et al.</i> , 2004
Baía de Ubatuba (Ubatuba, SP)	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	Avelar <i>et al.</i> , 2000
Sistema Tietê-Pinheiros-represa Billings, Pirapora, Kasgão e Barra Bonita (São Paulo, SP)		Silva <i>et al.</i> , 2002
Represa da Pampulha, (Belo Horizonte, MG)	Cu, Mn, Fe, Zn	Reitzler <i>et al.</i> , 2001
Triângulo mineiro (MG)	Cd, Cu, Pb, Zn	Oliveira & Costa, 2004
Mangue (litoral do Amapá)	Cr, Co, Cu, Fe, Ni	Andrade & Patchineelam, 2000

TABELA 4. Espécies vegetais brasileiras investigadas para fins de fitoextração de metais do solo.

Espécies vegetais	Metais	Referências
<i>Zea mays</i>	Cu, Cd, Fe, Mn, Pb e Zn	Accioly <i>et al.</i> , 2000
<i>Brassica oleraceae</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Cucumis sativa</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i>	Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn	Ramalho <i>et al.</i> , 2000
<i>Avicennia germinans</i> , <i>Rhizophora mangle</i>	Co, Cr, Cu, Fe e Ni	Andrade & Patchineelam, 2000
<i>Acacia mangium</i> , <i>Cedrella fissilis</i> , <i>Copaifera langsdorffii</i> , <i>Dendropanax cuneatum</i> , <i>Machaerium nictidans</i> , <i>Myroxylon peruiferum</i> , <i>Piptadenia gonoacantha</i> , <i>Senna macranthera</i> , <i>Trema micrantha</i>	Cd, Cu, Pb e Zn	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Acacia magium</i> , <i>Anadenanthera peregrina</i> , <i>Casearia lasiophylla</i> , <i>Cedrella fissilis</i> , <i>Copaifera langsdorffii</i> , <i>Cordia trichotoma</i> , <i>Dendropanax cuneatum</i> , <i>Hymenaea courbaril</i> , <i>Machaerium nictidans</i> , <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> , <i>Myrsine umbellata</i> , <i>Myroxylon peruiferum</i> , <i>Platypodium gonoacantha</i> , <i>Piptadenia gonoacantha</i> , <i>Petophorum dubium</i> , <i>Sebastiania schottiana</i> , <i>Senna macranthera</i> , <i>Solanum granulosum-leprosum</i> , <i>Tabebuia impetiginosa</i> , <i>Trema micrantha</i>	Zn e Cd	Marques <i>et al.</i> , 2000

Soares e colaboradores (2001), utilizando solo de mesma procedência, demonstraram a importância dos mecanismos de translocação e acumulação para a tolerância das plantas investigadas. Em *Machaerium nictidans*, *Myroxylon peruiferum*, *Piptadenia gonoacantha*, *Senna macranthera* e *Trema micrantha* houve translocação ativa de Zn e Cd para as partes aéreas, porém estas espécies revelam-se altamente suscetíveis às concentrações tóxicas de metais. *Dendropanax cuneatum* não foi muito afetada pela toxidez dos metais e estes ficaram retidos no caule. As espécies *Acacia mangium*, *Cedrella fissilis* e *Copaifera langsdorffii* revelaram-se pouco sensíveis e acumularam grandes quantidades de metais nas raízes, indicando que a tolerância devia-se a translocação limitada dos metais.

9. Considerações finais

Uma das maiores vantagens da fitoremedeiação é o baixo custo comparado com as tecnologias baseadas exclusivamente em métodos físicos ou químicos. Outra vantagem é que a fitoremedeiação pode ser uma solução permanente para aquelas áreas que estão continuamente expostas à contaminação. Além disso, a revegetação de locais contaminados é uma medida ecologicamente correta e, por isso, conta mais facilmente com a aceitação pública.

Por outro lado, as plantas possuem tolerância limitada aos metais tóxicos e por isso somente espécies ou variedades selecionadas podem ser empregadas. O tempo necessário para que se observe os efeitos positivos deste processo pode ser longo comparado aos métodos convencionais e esse aspecto pode se constituir numa desvantagem. Portanto, a seleção de espécies naturais ou a produção de variedades melhoradas que apresentem elevada tolerância aos metais e características vantajosas no que diz respeito a fitorremediação é fundamental para o bom desempenho desta tecnologia. Tamanho grande, biomassa aérea volumosa e capacidade de translocar os metais das raízes para as folhas são predicados particularmente desejáveis, principalmente para a fitoextração. Dentro deste contexto, plantas que possuem essas qualidades e que possam ser reaproveitadas são ideais, como por exemplo, na produção de polpa de papel, na fabricação de móveis e utensílios, na fabricação de andaimes, cercas e outras estruturas usadas na construção civil.

Como qualquer outro processo, a fitorremediação deve obedecer os regulamentos ditados pela legislação, pois as consequências de qualquer tecnologia nem sempre são absolutamente claras e os possíveis riscos à saúde do homem e dos animais devem ser levados em consideração. Questões sobre o que acontecerá com a biomassa vegetal depois que as plantas são colhidas, o que acontecerá com os pássaros e outros animais que venham a se alimentar das plantas contaminadas, a possibilidade de contaminação do pólen, entre outros, devem ser elucidadas e discutidas previamente. A legislação é especialmente rigorosa com relação às plantas transgênicas e, por isso, sua produção e cultivo está restrito a determinados locais.

Em algumas situações, o emprego da fitorremediação não deve ser considerado isoladamente, mas sim como parte de uma estratégia integrada envolvendo outras metodologias ambientais. A eficiência da fitorremediação depende de um esforço multidisciplinar compreendendo químicos, biólogos, agrônomos e engenheiros para propor soluções que: (i) melhorem a biodisponibilidade dos metais no solo evitando ao mesmo tempo a sua disseminação, (ii) otimizem a habilidade das plantas de absorver, translocar e armazenar metais, (iii) promovam o crescimento das plantas adequadas de acordo com suas necessidades, (iv) indiquem o destino da matéria vegetal após ter cumprido seu papel restaurador.

Referências

- ACCIOLY, A.M.A.; FURTINI NETO, A.E.; MUNIZ, J.A.; FAQUIN, V.; GUEDES, G.A.A. Pó de forno elétrico de siderurgia como fonte de micronutrientes e de contaminantes para plantas de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, p.1483-1493, 2000.
- ALAM, S.; KAMEI, S.; KAWAI, S. Phytosiderophore release from manganese-induced iron deficiency in barley. **Journal of Plant Nutrition**. v.23, p.1193-1207, 2000.
- ALMEIDA, M.S.S.; BORMA, L.S.; BARBOSA, M.C. Land disposal of river and lagoon dredged sediments. **Engineering Geology**. v.60, p.21-20, 2001.
- ANDRADE, R.C.B.; PATCHINEELAM, S.R. Especiação de metais-traço em sedimentos de florestas de manguezais com *Avicennia* e *Rhizophora*. **Química Nova**. v.23, p.733-736, 2000.
- AVELAR, W.E.P.; MANTELATTO, F.L.M.; TOMAZELLI, A.C.; SILVA, D.M.L. The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**. v.118, p.65-72, 2000.
- BANUELOS, G.S.; AJWA, H.A.; TERRY, N.; ZAYED, A. Phytoremediation of selenium laden soils: A new technology. **Journal of Soil and Water Conservation**. v.52, p.426-430, 1997.

- BATISTA NETO, J.A.B.; SMITH, B.J.; McALLISTER, J.J. Heavy metal concentrations in surface sediments in a near shore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. *Environmental Pollution*, v.109, p.1-9, 2000.
- BIZILI, S.P.; RUGH, C.L.; MEAGHER, R.B. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology*, v.18, p.213-217, 2000.
- BLAKE, R.C.; CHOATE, D.M.; BRADHAN, S.; REVIS, N.; BARTON, L.L.; ZOCCHI, T.G. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.12, p.1365-1376, 1993.
- BROOKS, R.R. *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. New York: CAB International, 1998. 318p.
- CROWLEY, D.E.; WANG, Y.C.; REID, C.P.P.; SZANSISZLA, P.J. Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*, v.130, p.179-198, 1991.
- CUNNINGHAM, S.D.; ANDERSON, T.A.; SCHWAB, A.P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, v.56, p.55-114, 1996.
- DE SOUZA, M.P.; LYTLE, M.; MULHOLLAND, M.M.; OTTE, M.L.; NORMAN, T. Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard. *Plant Physiology*, v.122, p.1281-1288, 2000.
- DHANKNER, O.P.; LI, Y.; ROSEN, B.D.; SHI, J.; SALT, D.; SENECOFF, J.F.; SASHTI, N.A.; MEAGHER, R.B. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic by combining arsenate reductase and gamma-glutamyl cysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology*, v.20, p.1140-1145, 2002.
- DHANKNER, O.P.; SHASTI, N.A.; ROSEN, B.D.; FUHRMANN, M.; MEAGHER, R.B. Increased cadmium tolerance and accumulation by plants expressing bacterial arsenate reductase. *New Phytologist*, v.159, p.431-442, 2003.
- EDENSPACE. Edenspace Systems Corporation. Disponível em: <<http://www.edenspace.com>>. Acesso em: ago. 2005.
- EVANS, K.M.; GATEHOUSE, J.A.; LINDSAY, W.P.; SHI, J.; TOMMEY, A.M.; ROBINSON, N.J. Expression of the pea metallothionein-like gene PsMTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PsMTA function. *Plant Molecular Biology*, v.20, p.1019-1028, 1992.
- FAN, T.W.M.; LANE, A.N.; PEDLER, J.; CROWLEY, D.A.; HIGASHI, R.M. Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, v.251, p.57-68, 1997.
- FERREIRA, A.G.; MACHADO, A.L.S.; ZALMON, I.R. Temporal and spatial variation on heavy metal concentrations of the viviparous *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) on the Northern coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.319-327, 2004.
- GALLI, U.; SCHEUPP, H.; BRUNOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, v.92, p.364-368, 1994.
- GISBERT, C.; ROS, R.; DE HARO, A.; WALKER, D.J.; BERNAL, M.P.; SERRANO, R.; NAVARRO-AVINO, J. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.303, p. 440-445, 2003.
- GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.17, p.53-64, 2005.
- GRICHKO, V.P.; FILBY, B.; GLICK, B.R. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*, v.81, p.45-53, 2000.
- HART, J.J.; WELCH, R.M.; NORVELL, W.M.; SULLIVAN, L.A.; KOCHIAN, L.V. Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiology*, v.116, p.1413-1420, 1998.
- HENRY, J.R. *An overview of the phytoremediation of lead and mercury*. Washington, D.C: U. S. Environmental Protection Agency, National Network of Environmental Management Studies, 2000. Disponível em: <<http://clu-in.org/download/studentpapers/henry.pdf>>.
- JAFFRÉ, T.; BROOKS, R.R.; LEE, J.; REEVES, R.D. *Sebertia acuminata*, a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science*, v.193, p.579-580, 1976.
- JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDOMADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória – ES. *Química Nova*, v.27, p.378-386, 2004.

- JOYEUX, J.C.; CAMPANHA FILHO, E.A.; JESUS, H.C. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.765-774, 2004.
- KHAN, A.G.; KEUK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES, W.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, v.41, p.197-207, 2000.
- KIRKHAM, M.B. EDTA-facilitated phytoremediation of soil with heavy metals from sewage sludge. *International Journal of Phytoremediation*, v.2, p.159-172, 2000.
- KOCHIAN, L.V. Zinc absorption from hydroponic solutions by plant roots. In: ROBSON, A.D. (Ed.), *Zinc in soils and plants*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.45-57.
- KRÄMER, U.; SMITH, R.D.; WENZEL, W.; RASKIN, I.; SALT, D.E. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology*, v.115, p.1641-1650, 1997.
- KRÄMER, U.; PICKERING, I.J.; PRINCE, R.C.; RASKIN, I.; SALT, D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, v.122, p.1343-1354, 2000.
- LASAT, M.M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, v.2, p.1-25, 2000.
- LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, v.31, p.109-120, 2002.
- LASAT, M.M.; PENCE, N.S.; GARVIN, D.F.; EBBS, S.D.; KOCHIAN, L.V. Molecular physiology of Zn transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.71-79, 2000.
- LIMA JUNIOR, R.G.S.; ARAÚJO, F.G.; MAIA, M.F.; PINTO, A.S.S.B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Research, Section A*, v.89, p.171-179, 2002.
- MA, L.Q.; KOMAR, K.M.M.; TU, C.; ZHANG, W.; CAI, Y.; KENNELLEY, E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, v.409, p.579, 2001.
- MELO MARQUES, T.C.L.L.S.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.121-132, 2000.
- MURPHY, A.; TAIZ, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiology*, v.109, p.945-954, 1995.
- OLIVEIRA, T.S.; COSTA, L.M. Metais pesados em solos de uma topotipossequência do triângulo mineiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, p.785-796, 2004.
- PANFILI, F.; MANCEAU, A.; SARRET, G.; SPADINI, L.; KIRPICHTCHIKOVA, T.; BERT, V.; LABOUDIGUE, A.; MARCUS, M.A.; AHAMDACH, N.; LIBERT, M.-F. The effect of phytostabilization on zinc speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, v.69, p.2265-2284, 2005.
- PELLET, M.D.; GRUNES, D.I.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, v.196, p.788-795, 1995.
- PILON-SMITS, E.A.; HWANG, S.; MEL LYTHE, C.; ZHU, Y.; TAI, J.C.; BRAVO, R.C.; CHEN, Y.; LEUSTEK, T.; TERRY, N. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology*, v.119, p.123-132, 1999.
- RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINHO, N.M.B.A.; VELLOSO, A.C.X. Contaminação da microbacia de caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.1289-1303, 2000.
- RASKIN, I.; ENSLEY, B.D. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. New York: John Wiley, 2000.
- REITZLER, A.C.; FONSECA, A.L.; LOPES, G.P. Heavy metals in tributaries of Pampulha reservoir, Minas Gerais. *Brazilian Journal of Biology*, v.61, p.363-370, 2001.
- RUGH, C.L.; SENECAFF, J.F.; MEAGHER, R.B.; MERKLE, S.A. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*, v.16, p.925-928, 1998.
- SAKULKOO, N.; AKARACHARANYA, A.; CHAREONPORNWATTANA, S.; LEEPIPATPIBOON, N.; NAKAMURA, T.; YAMAGUCHI, Y.; SHINMYO, A.; SANO, H. Hyper-assimilation of sulfate and tolerance to sulfide and cadmium in transgenic water spinach expressing an *Arabidopsis* adenosine phosphosulfate reductase. *Plant Biotechnology*, v.22, p.27-32, 2005.
- SALT, D.E.; RAUSER, W.E. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*, v.107, p.1293-1301, 1995.

- SHETTY, K.G.; HETRICK B.A.D.; FIGGE, D.A.H.; SCHWAB, A.P. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environmental Pollution*, v.86, p.181-188, 1994.
- SILVA, I.S.; ABATE, G.; LICHTING, J.; MASINI, J.C. Heavy metal distribution in recent sediments of the Tietê-Pinheiros river system in São Paulo state, Brazil. *Applied Geochemistry*, v.17, p.105-116, 2002.
- SISINNO, C.L.S.; MOREIRA, J.C. Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu. Niterói, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v.12, p.515-523, 1996.
- SOARES, C.R.F.S.; ACCIOLY, A.M.A.; MELO MARQUES, T.C.L.L.S.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, p.302-315, 2001.
- SONG, W.Y.; SOHN, E.J.; MARTINOIA, E.; LEE, Y.L.; YANG, Y.Y.; JASINSKI, M.; FORESTIER, C.; HWANG, I.; LEE, Y. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, v.21, p.914-919, 2003.
- VAN DER ZAAL, B.J.; NEUTEBOOM, L.W.; PINAS, J.E.; CHARDONNENS, A.N.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.; HOOYKAAS, P.J. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*, v.119, p.1047-1055, 1999.
- VASSIL, A.D.; KAPULNIK, Y.; RASKIN, I.; SALT, D.E. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiology*, v.117, 447-453, 1998.
- ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; TARUN, A.; WEBER, S.U.; JOUANIN, L.; FERRY, N. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology*, v.121, p.1169-1177, 1999.

*Importância da Rizosfera na
Biodegradação de Xenobióticos*

Itamar Soares de Melo



Foto: I.S. Melo

I. Introdução

As bactérias têm uma função importante na atenuação do impacto ambiental dos compostos orgânicos, uma vez que podem adaptar-se à presença desses poluentes e/ou utilizá-los como nutrientes.

A identificação de linhagens bacterianas envolvidas na biodegradação de compostos orgânicos recalcitrantes oferece uma oportunidade para utilização prática visando a remediação de sítios contaminados disponíveis.

A rizorremediação inclui processos que envolvem a biodegradação de poluentes orgânicos por microrganismos que colonizam as raízes de plantas.

A porção do solo imediatamente associada às raízes de plantas em crescimento é conhecida como rizosfera, que é caracterizada, fundamentalmente pelo contínuo suprimento de compostos orgânicos de baixo peso molecular secretados pelas raízes. Estes compostos servem como fonte de carbono e energia para a grande comunidade de bactérias. A tecnologia de biorremediação baseada no sistema rizosfera (planta – bactérias) é um processo atrativo, pois as raízes fornecem uma grande área superficial para populações bacterianas e transporte de microrganismos envolvidos na biodegradação de poluentes.

A maior diversidade e densidade de bactérias comumente observada na rizosfera, comparada com comunidades microbianas menos diversas em solos não-rizosféricos, freqüentemente, resulta em maiores taxas de metabolismo de xenobióticos. Na rizosfera, os microrganismos evoluíram mecanismos genéticos que lhes permitiram degradar compostos naturais complexos, como por exemplo, diterpenos, lignina, celulose, matérias húmicas.

Compostos químicos sintéticos, contendo novas estruturas, fornecem oportunidades para que bactérias possam se adaptar e evoluir novas vias de degradação, uma vez que a biodegradação pode requerer enzimas que estão ausentes nos microrganismos ou que tenham uma atividade extremamente baixa.

Dentro desse enfoque, tem sido já bem documentado que existe incremento da degradação de xenobióticos na rizosfera ocasionado por uma comunidade microbiana sinérgistica e diversa, fato este não verificado por uma simples linhagem bacteriana.

Dentre as rizobactérias que colonizam a rizosfera e com potencial de uso em biorremediação e na agricultura, visando aumento da produtividade, destacam-se: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, entre outras. Bactérias localizadas na rizosfera, possuindo potencial catabólico para diferentes tipos de poluentes podem servir como base para biorremediação. Assim, bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azospirillum* são excelentes organismos para esse propósito, pois colonizam o rizoplano e a rizosfera, ao mesmo tempo que apresentam propriedades extras como

a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. *Pseudomonas*, no entanto, é o gênero mais estudado devido, principalmente a sua capacidade de metabolizar diversas substâncias xenobióticas. Por exemplo, linhagens de *Pseudomonas putida* tem sido envolvidas no catabolismo de produtos naturais (vanilina, δ-pipeno, limonenocâncora, mandelato e adamantanona) e compostos industriais (bromoxinil, estireno, metil-test-butil éter (MTBE), tricloetileno e nitroglicerina). Genes codificando vias catabólicas para protocatecato, catecol, p-hidroxibenzoato, vanilina e anisulfonatos já foram identificados no genoma de *P. putida* K2440 (NELSON *et al.*, 2002; JIMENEZ *et al.*, 2002).

O seqüenciamento do genoma mostrou que o metabolismo dos ácidos aromáticos faz com que esta bactéria se associe com raízes de plantas. Genes que poderiam contribuir com a capacidade de *P. putida* K2440 de associar-se com raízes de plantas incluem aqueles responsáveis pela biossíntese de celulose, biossíntese de carboidratos complexos e o catabolismo de opinas e outros produtos secretados pelas plantas.

Ao contrário de *P. aeruginosa*, *P. putida* não é patogênica às plantas e nem aos animais. Esta característica faz com que esta bactéria apresente potencial extraordinário para aplicações ambientais e industriais.

2. O ambiente rizosfera

O conceito “rizosfera” foi definido primeiramente por Hiltner em 1904 e compreende aquela porção do solo sob influência direta das raízes de plantas superiores, em máxima atividade microbiana (Figura 1). As raízes podem liberar consideráveis quantidades de exsudados, lisados e mucilagens. É, portanto, estimado

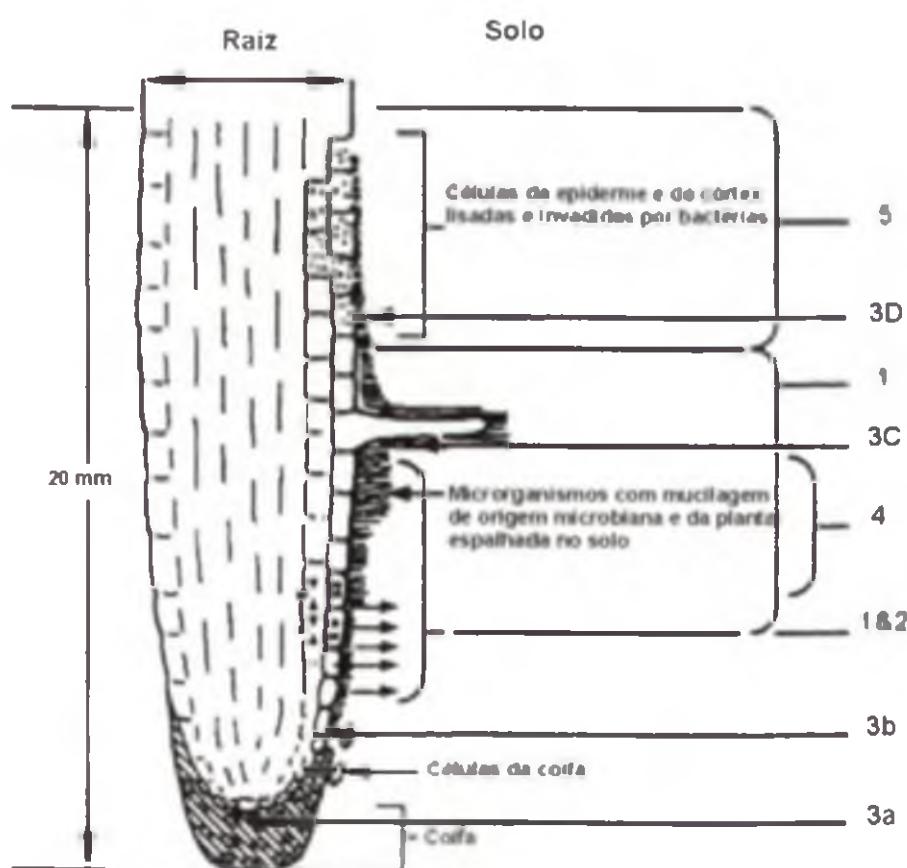


FIGURA 1. Diagrama de um modelo de raiz mostrando a origem de vários compostos orgânicos presentes na rizosfera. 1. exsudados radiculares; 2. secreções; 3. mucilagens de origem vegetal; 4. mucigel; 5. lisados. (ROVIRA *et al.*, 1979).

que plantas liberem 20 – 40% de seus fotossítetos via raízes. A liberação de nutrientes orgânicos, como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, vitaminas, fitohormônios e outras substâncias fornecem a base para o crescimento e atividade de microrganismos na rizosfera. Estudos microscópicos revelam que bactérias dominam a rizosfera (Figuras 2 e 3). Colônias microbianas se desenvolvem ao longo da superfície radicular, com máximo desenvolvimento naqueles sítios onde todos os pré-requisitos para o crescimento são encontrados.

A localização sobre o sistema radicular em que esses compostos orgânicos podem ser liberados pode ser melhor ilustrada na Figura 1.

A rizosfera é um ambiente único do sistema solo. Os microrganismos predominantes na rizosfera são habitantes do solo e, portanto, com características da microbiota do solo. Por sua vez, a composição da comunidade vegetal pode influenciar a diversidade da comunidade bacteriana devido à variabilidade na composição química dos exsudados (CHRISTENSEN, 1989). As bactérias com maior número de habitats da rizosfera, as Gram-negativas, em forma de bastonetes não esporulantes e com simples requisitos nutricionais, são mais estimuladas pelas raízes do que bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes e cocos esporulantes (CURL & TRUELOVE, 1986).

Populações maiores do que 10^9 g^{-1} solo rizosférico são comumente detectadas. Estimulação seletiva de bactérias gram-negativas, de rápido crescimento, como, por exemplo, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Alcaligens* e *Agrobacterium* é observada na rizosfera. Estes gêneros são encontrados como microcolônias cobrindo, aproximadamente, 4-10% da superfície radicular. A competição intermicrobiana na rizosfera envolve taxa de crescimento, versatilidade metabólica, fatores de crescimento, área superficial disponível para o desenvolvimento colonial e produção de antibióticos.



FIGURA 2. Colonização de raízes por bactérias. a) coifa; b) colonização dos sulcos da epiderme da raiz; c) detalhe da colonização de bactérias em raízes.

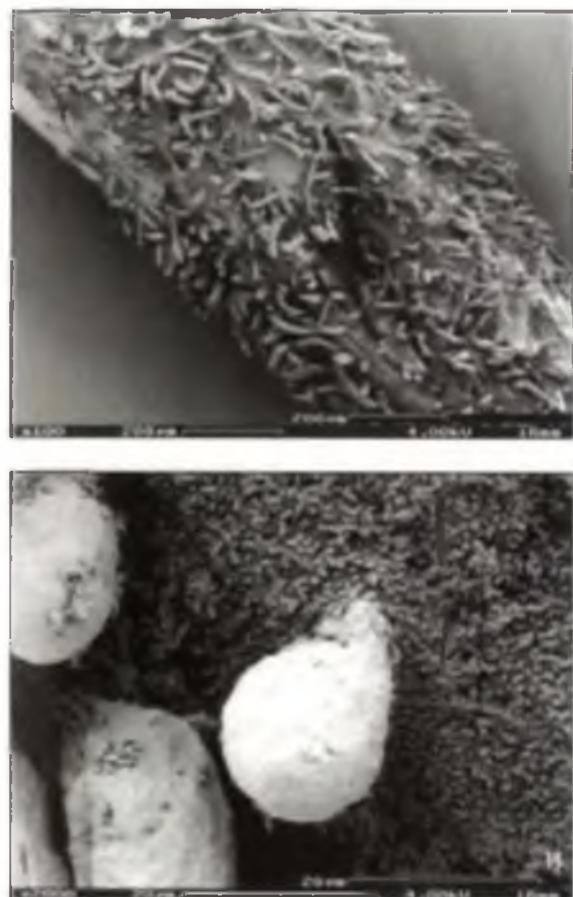


FIGURA 3. Colonização de pêlos radiculares por bactérias. a) pêlos radiculares; b) detalhe da colonização abundante de bactérias na base dos pêlos radiculares.

Tem sido demonstrado com muita freqüência que a rizosfera difere do solo sem vegetação de várias maneiras:

a) Composição de íons inorgânicos: Geralmente há uma diminuição na concentração de fosfato próximo às raízes devido à rápida absorção pelas raízes e baixa difusão através do solo (LEWIS & QUIRK, 1967).

b) pH: O pH da rizosfera é influenciado pela forma de fertilizante nitrogenado aplicado às plantas. Nitrato tende a elevar o pH da rizosfera, visto que fertilizante amoniacal diminui o pH. Essas diferenças no pH podem causar grandes mudanças na microbiota (SMILEY, 1974).

c) Níveis de oxigênio e dióxido de carbono: Mudanças nas concentrações de oxigênio e dióxido de carbono na rizosfera são, muitas vezes, acentuadas sob condições de baixa drenagem dos solos. A ocorrência de clostridio anaeróbico na rizosfera sugere baixos níveis de oxigênio em microsítios das raízes (ROVIRA, 1962).

O efeito rizosfera é um estímulo ao crescimento microbiano ao redor das raízes. Substâncias voláteis podem se difundir no solo a distâncias maiores do que as substâncias solúveis em água e podem estimular a germinação de esporos fúngicos ou atrair nematóides a maiores distâncias das raízes.

Uma grande variedade de compostos orgânicos de origem vegetal têm sido encontrados na rizosfera e foram classificados por Rovira *et al.* (1979) como:

1) **Exsudados** - compostos de baixo peso molecular (açucares, aminoácidos);

2) **Secreções** - compostos que são liberados ativamente pelas células da raiz;

3) **Mucilagem**

3.1 Secreções produzidas pelo complexo de Golgi das células da coifa;

3.2 Hidrolisados da parede celular primária localizada entre a coifa e a epiderme;

3.3 Secreções pelas células da epiderme e pelas radículas com parede primária;

3.4 Compostos resultantes da degradação microbiana e modificação das células mortas da epiderme;

4) **Mucigel** - material gelatinoso da superfície radicular, composto de mucilagem vegetal, células bacterianas, produtos metabólicos e material mineral e orgânico coloidal.

5. **Lisados** - material liberado pela lise de células velhas da epiderme.

Já é bem estabelecido que diferentes espécies de plantas liberam diferentes compostos orgânicos na rizosfera. O estádio de desenvolvimento da planta também pode afetar a composição de substâncias liberadas pelas raízes para a rizosfera. À medida que a planta envelhece, tanto a quantidade como a composição de compostos orgânicos que são exsudados freqüentemente mudam (HALE *et al.*, 1978; VANCURA & STANEK, 1975). Fatores outros, como temperatura, radiação, umidade do solo, condição nutricional do solo e estresse às raízes podem alterar a quantidade e composição de exsudados das raízes. Uma diminuição na iluminação, por exemplo, geralmente diminui a exsudação, presumidamente por causa de um decréscimo na fixação de C.

3. Exsudados

A presença de microrganismos na rizosfera incrementa a exsudação radicular. Barber & Martin (1976) encontraram que 5-10% do C fixado fotossinteticamente foi exsudado de raízes de cevada sob condições axênicas, mas quando microrganismos foram introduzidos, a exsudação foi aumentada para 12-18%.

Exsudados de plantas são essenciais para a associação de bactérias com a rizosfera, como mostrado por Belimov & Dietz (2000) que demonstraram que a adição de uma fonte alternativa de carbono ao solo, abole a promoção do crescimento da planta em um solo contaminado.

A composição de exsudados radiculares é um parâmetro primário na seleção de espécies ativas quanto a comunidade da rizosfera e a diversidade daquela comunidade. A composição de exsudados radiculares varia com as condições de crescimento da planta e seu estádio de desenvolvimento. Os compostos orgânicos acumulados nos exsudados incluem:

- **Aminoácidos:** todos aminoácidos de ocorrência natural;
- **Ácidos orgânicos:** ácidos acético, butírico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, málico, oxálico, propiônico, tartárico e valérico;
- **Pentoses e hexoses:** arabinose, deroxirribose, frutose, galactose, glucose, maltose, manose, rafinose, ramnose, ribose, sucrose e xilose;
- **Pirimidinas e purinas:** adenina, timina, guanina, unidina;
- **Vitaminas:** p-aminobenzoato, biotina, colina, inositol, ácido nicotínico, pantotenato, piridoxina e tiamina;
- **Enzimas:** amilase, invertase, fosfatase e protease.

4. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCPs

Rizobactérias são assim denominadas por colonizarem intensamente o sistema radicular das plantas (SCHROTH & HANCOCK, 1981; KLOEPPER, 1983). Quanto aos efeitos causados às plantas são divididas em benéficas, prejudiciais ou neutras (SCHIPPERS *et al.*, 1987). As bactérias de vida livre do solo que beneficiam as plantas são, comumente, denominadas “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (RPCPs) (KLOEPPER *et al.*, 1989).

A utilização das RPCPs, visando ao aumento do crescimento de plantas e, consequentemente, da produção, teve início na Rússia na década de 30. Contudo, somente na década de 60 respostas positivas no aumento de crescimento de plantas foram obtidas com a bacterização de sementes de algumas plantas agrícolas com *Azotobacter* sp. (ROVIRA, 1963; BROWN *et al.*, 1962, 1964). Os mecanismos, no entanto, pelos quais essas bactérias estimulam o crescimento de plantas não ficaram claros na época.

Mais tarde, alguns pesquisadores detectaram a produção de fitohormônios, como o ácido giberélico e o ácido indol-acético por algumas espécies bacterianas em meio de cultura, sendo sugerida a sua produção como o possível mecanismo na promoção de crescimento de plantas (KATZNELSON & COLE, 1965; BROWN, 1972).

Dentre as RPCPs, bactérias do gênero *Pseudomonas*, produtoras de pigmentos fluorescentes são as mais estudadas com relação a vários aspectos de aplicação, principalmente quanto à produtividade agrícola e biorremediação. Possuem também características como suprimirem patógenos de solo (WELLER, 1988); possuírem o solo como habitat natural, mais especificamente, partículas de matéria orgânica e rizosfera (ROVIRA & SANDS, 1971); serem de ocorrência natural, apresentando-se em elevadas populações (KLOEPPER *et al.*, 1980a; SUSLOW & SCHROTH, 1982b; XU & GROSS, 1986); serem nutricionalmente versáteis e possuírem habilidade de crescer em uma grande variedade de condições ambientais (SCHROTH & HANCOCK, 1982). Além destas vantagens, são capazes de produzir uma grande variedade de antibióticos (LEISINGER & MARGRAFF, 1979) e de sideróforos (KLOEPPER *et al.*, 1980b; MISAGHI *et al.*, 1982), que atuam inibindo bactérias e fungos fitopatogênicos.

5. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias

Estudos da microbiota da rizosfera permitiram a identificação de processos fisiológicos específicos, como, por exemplo, a fixação de nitrogênio por bactérias que beneficiam a planta (KLOEPPER *et al.*, 1989).

Bactérias como *A. chroococcum* e *Azospirillum* fixam nitrogênio atmosférico e podem promover o crescimento de plantas, embora o mecanismo aceito como responsável por este efeito não seja apenas a fixação de nitrogênio (BROWN, 1974).

Outro mecanismo sugerido para a promoção de crescimento de plantas por bactérias benéficas é a mineralização de componentes orgânicos fosfatados, ou a solubilização dos componentes inorgânicos de fósforo (KLOEPPER *et al.*, 1989). Rizobactérias podem aumentar a disponibilidade de fósforo às plantas, ou por solubilização de fosfato orgânico via a ação de fosfatase ou por solubilização de fosfato inorgânico com ácidos orgânicos. Algumas rizobactérias como *Bacillus megaterium* e *P. fluorescens* têm mostrado, sob diversas condições ambientais, seu potencial quanto ao aumento na disponibilidade de fósforo às plantas.

Além do fósforo e do nitrogênio, a bacterização também tem proporcionado o aumento de outros nutrientes nas plantas, como o boro e o potássio.

O mecanismo mais comumente aventado para explicar os vários efeitos das rizobactérias sobre as plantas é a produção de fitohormônios, incluindo entre eles auxina e giberelina. Estas substâncias são produzidas por alguns microrganismos do solo em resposta ao metabolismo de exsudados específicos das raízes (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1991). Auxinas são uma classe de hormônios vegetal, sendo o mais bem caracterizado o ácido indol-acético (AIA) que é conhecido por aumentar a elongação e a diferenciação celular.

Beyeler *et al.* (1997) determinaram o efeito da superprodução de AIA por uma linhagem de *P. fluorescens* sobre o crescimento vegetal. Uma linhagem mutante, obtida a partir da linhagem selvagem de *P. fluorescens* (CHAO), que produzia quantidades superiores de AIA, foi construída. Este mutante provou ser deletério ao crescimento de trigo e pepino cultivados em solo esterilizado. Já em solo não autoclavado, esta linhagem não causou efeitos negativos, mas melhorou显著mente o crescimento de pepino.

Recentemente foi descoberta em RPCPs a presença da enzima aminociclopropano-carboxilato (ACC) desaminase (JACOBSON *et al.*, 1994; GLICK *et al.*, 1994, 1995). A função dessa enzima é hidrolisar ACC, que é uma substância precursora do etileno, sintetizado nos tecidos de plantas (YUNG *et al.*, 1982). A presença dessa enzima estimula o crescimento da planta e o alongamento da raiz devido ao seqüestramento e hidrólise do ACC a partir de sementes germinadas, consequentemente, reduzindo o nível de etileno nas plantas (GLICK *et al.*, 1994, 1995). Essa hipótese foi comprovada pela utilização de três mutantes de *P. putida* sem atividade de ACC desaminase. Estes não foram capazes de hidrolizar o ACC e a planta produziu etileno. Foram ainda incapazes de promover o alongamento de raízes de canola em condições gnotobióticas, diferindo do tipo selvagem (LIFSHITZ *et al.*, 1987; GLICK *et al.*, 1994, 1995).

Além de mecanismos diretos, as RPCPs são capazes de promover o crescimento de plantas pela supressão de microrganismos prejudiciais, ocasionando uma mudança na composição da microbiota da rizosfera ou uma substituição ou exclusão desses componentes (SCHROTH & HANCOCK, 1981; SCHROTH & HANCOCK, 1982; SUSLOW & SCHROTH, 1982a).

Sabe-se que os modos de ação para a supressão de patógenos por RPCPs devem-se à competição por nutrientes (p.ex. carbono, nitrogênio e íon férrico), antibiose e indução de resistência (WELLER, 1988; LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1993). Entretanto, a competição por ferro é relatada como responsável pela inibição do crescimento, ou mesmo a exclusão de patógenos e microrganismos deletérios no solo. Essa competição ocorre nos solos em que o elemento ferro encontra-se em condições limitantes, o que é geralmente observado em solos com pH neutro ou alcalino. Nessas condições, microrganismos e plantas dependem de agentes quelantes para solubilizar e transportar o ferro inorgânico (LUCON, 2000).

A produção de componentes tóxicos por RPCPs como antibióticos e HCN (hidrogênio cianida), ativos contra rizobactérias deletérias, também tem sido proposta como um mecanismo de promoção de crescimento (WELLER, 1988).

6. Colonização de raízes por rizobactérias

A capacidade das RPCPs de colonizarem o sistema radicular é de fundamental importância para o seu efetivo estabelecimento na rizosfera e atuação como um agente ativo em processos de biodegradação de pesticidas. A colonização compreende uma série de passos: migração de células bacterianas em direção às raízes, ataque, distribuição ao longo das raízes, crescimento e estabelecimento da população. Após o contato inicial, vem a fase crucial que é a manutenção ou persistência, onde a bactéria utiliza exsudados das raízes para se multiplicar e sobreviver.

Quimiotactismo tem sido demonstrado em muitas bactérias associa-das, particularmente linhagens de *Pseudomonas*, que migram ativamente em direção às sementes.

A dispersão de rizobactérias ao longo das raízes em crescimento é controlada pela motilidade e movimento passivo de bactérias (fluxo de água). Quimiotaxia em direção aos exsudados e motilidade ativa parecem prevalecer sobre o movimento passivo.

Para explicar o fenômeno de colonização de raízes por rizobactérias, tem sido proposto o uso de mutantes de *Pseudomonas putida* negativos (Agg^-) para aglutinação às raízes (ANDERSON *et al.*, 1988; TARI & ANDERSON, 1988). Comparados à linhagem selvagem, os mutantes Agg^- aderiram-se às raízes em menor extensão, colonizando-as moderadamente e levando a uma menor proteção de plantas de pepino ao ataque de *Fusarium oxysporum*.

Com relação à motilidade, Howie *et al.* (1987) e Scher *et al.* (1988) constataram que mutantes imóveis colonizaram as raízes de forma semelhante às linhagens selvagens, de onde se concluiu que a motilidade não é requerida nesse processo. Já de Weger *et al.* (1987) observaram que um mutante não-móvel de *Pseudomonas* spp. foi incapaz de colonizar as regiões inferiores das raízes de batata quando comparado com a linhagem parental.

Moléculas de polissacarídeos da superfície celular de *Agrobacterium* e *Rhizobium* mediem seu ataque e subsequente interação com células de plantas (HALVERSON & STACEY, 1986). As linhagens de *Pseudomonas* WCS 358 e

WCS 374 apresentaram polissacarídeos com longas cadeias laterais de O-antigênico. Destas linhagens, de Weger *et al.* (1987) construíram mutantes que não produziam as cadeias laterais de O-antigênico e que não diferiram das linhagens selvagens com relação ao ataque a partículas de sefadex ou raízes esterilizadas de batata. Estes achados conflitantes sobre o papel dos flagelos podem ser atribuídos a possíveis diferenças nos isolados bacterianos, na espécie de planta e nas condições físicas do solo, particularmente a umidade. Outros fatores não inerentes à bactéria podem facilitar ou não a colonização de raízes; dentre estes, pode-se mencionar o potencial matricial, embora a bactéria introduzida possa se difundir a partir do material semeado para as raízes numa ampla faixa de potencial osmótico (WELLER, 1988).

De acordo com alguns estudos, as maiores populações de bactérias ocorrem em pressões na faixa de -0,3 a 0,7 bar, na qual Howie *et al.* (1987) observaram que a disponibilidade de oxigênio e o potencial de turgor das células e/ou a disponibilidade de nutriente seriam adequados para o desenvolvimento de células bacterianas. A área de percolação pode servir também para estender a população bacteriana introduzida na direção das extremidades das raízes.

O pH e a temperatura são também fatores importantes na colonização. Para o crescimento *in vitro* de linhagens de *P. fluorescens* e *P. putida*, a temperatura seria de 25-30°C, e o pH de neutro a alcalino. No solo, porém, a colonização é favorecida nas temperaturas de 12 a 18°C e em pH de 6,0 a 6,5. Isso ocorre porque temperatura e pH abaixo do ideal refletem uma menor competição com a microbiota indígena.

A colonização de raízes, portanto, diz respeito ao crescimento da bactéria ao longo das raízes. Essa característica é pré-requisito primário na rizosfera, onde a colonização de novas superfícies radiculares formadas é realizada pela migração da microflora existente ou pelo inóculo do solo.

7. Biodegradação de xenobióticos por rizobactérias

Plantas usadas para fitorremediação (ver capítulo 25) deveriam ser capazes de acumular altas quantidades do contaminante e também de produzir um grande volume de biomassa. Contudo, muito freqüentemente, plantas podem ser comprometidas por se desenvolverem em solos contaminados devido à toxicidade inerente do poluente. Assim, a inoculação de RPCP pode auxiliar o crescimento dessas plantas. A sobrevivência e estabelecimento de RPCP são essenciais para uso em fitorremediação. No entanto, tem sido comprovado que altos níveis de contaminantes podem ter efeitos inibitórios ao crescimento de RPCP. Por exemplo, o crescimento de *Enterobacter cloacae* CAL2 foi inibido em 50% em solos contaminados com 20 mM de arsenato (NIE *et al.*, 2002). Está também provado que algumas bactérias são sensíveis a um contaminante, mas não a outro. É o caso de *Flavobacterium* sp. que é muito sensível a cadmio, mas não a chumbo (BELIMOV *et al.*, 1998). Na prática, é essencial que bactérias usadas em biorremediação sejam resistentes aos níveis dos contaminantes endógenos do ambiente a ser descontaminado.

No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que os exsudados radiculares são estimulados na presença de xenobióticos. Em cultivos hidropônicos de milho, a presença do herbicida simazina, causou um aumento na exsudação de ácidos orgânicos (KEIPER & REBER, 1970). Quando microrganismos foram introduzidos à solução nutritiva, o herbicida aumentou o peso e comprimento das raízes de milho. Os autores desse estudo não explicam o fenômeno sobre o aumento da exsudação, mas especulam que pode ser uma resposta da planta ao ataque e nourish mais microrganismos ou pode ser simplesmente um efeito fisiológico do composto químico sobre a planta.

A maioria dos herbicidas usados para controlar ervas daninhas são prontamente metabolizados por plantas não-alvo. Por sua vez, as bactérias da rizosfera podem exercer um papel fundamental quanto à proteção da planta contra os efeitos tóxicos dos poluentes. Isso tem sido recentemente comprovado em pesquisas envolvendo alguns xenobióticos. Herring & Berring, (1988) verificaram que os efeitos tóxicos de ésteres fitalato sobre plântulas de espinafre e ervilha foram sido abolidos pela presença de microrganismos do solo. Os estudos de Kruger *et al.* (1997) também mostraram que três linhagens de microrganismos capazes de degradar dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) poderiam ser usadas para reduzir a atividade desse produto na rizosfera de ervilha.

Em um estudo similar, Roque (2000) mostrou que uma rizobactéria, *Acinetobacter baumanii*, envolvida na degradação do herbicida diuron protege plântulas de milho dos efeitos tóxicos desse herbicida em solos contaminados. De fato, a biodegradação de certos herbicidas é acelerada na rizosfera de plantas que são relativamente insensíveis aos efeitos herbicidas do composto químico. Nesse sentido, Sandmann & Loos 1984 constataram um aumento no número de microrganismos envolvidos na degradação de 2,4-D na rizosfera de cana-de-açúcar comparados com cravo africano. Os autores sugeriram que o aumento no número dos degradadores foi o possível mecanismo de proteção da cana-de-açúcar dos efeitos de 2,4-D e que análogos fenólicos nos exsudados selecionaram microrganismos responsáveis pela degradação de 2,4-D.

Os efeitos de 3-cloro e 4-clorobenzoato (3-CBA, 4-CBA) sobre a germinação de sementes de berinjela e tomate foram estudos por Ajithkumar *et al.* (1998). Estas plantas foram altamente sensíveis a 200 mg L⁻¹ de 3-CBA e 4-CBA e mostraram redução drástica na germinação de sementes e vigor de plântulas. Na concentração de 400 µg L⁻¹ a germinação de sementes de tomate foi completamente inibida. Por outro lado, quando solo contaminado com 3-CBA e 4-CBA foi tratado com *P. aeruginosa* 3mT, envolvida na degradação de clorobenzoato, houve uma proteção completa de sementes e plântulas de tomate.

O grau de degradação de xenobióticos em solos rizosféricos parece relacionar-se com as espécies de plantas envolvidas, pois estas variam em morfologia, metabólitos e interações ecológicas com outros organismos. Espécies de plantas determinam a composição da rizosfera. Lemanceau *et al.* (1995) mostraram a influência de espécies de linho e de tomate sobre a diversidade de pseudomonas fluorescentes. A diversidade de isolados de *Pseudomonas* do solo, determinada pela oxidação de 147 compostos orgânicos e por “fingerprinting” PCR (REP-PCR) foi diferente da diversidade obtida com isoladas da rizosfera dessas duas espécies de plantas. A capacidade de linhagens de *Pseudomonas* em metabolizar compostos presentes nos exsudados radiculares

deveria dar uma vantagem competitiva sobre as bactérias do solo sem esta habilidade. Assim, a ação seletiva dessas plantas poderia ser causada pelos exsudados específicos que elas produzem. As espécies vegetais ou tipo botânico (monocotiledôneas, dicotiledôneas, halófitas, leguminosas etc) determinaram os parâmetros que são significantes em termos de degradação na rizosfera (SHANN & BOYLE, 1994). É, pois, sugerido que exsudados radiculares podem influenciar a biodegradação, alterando diretamente a comunidade microbiana.

8. Rizorremediação

Para entender a eficácia das tecnologias de biorremediação, tanto *ex situ* como *in situ*, é necessário o conhecimento sobre a cinética da biodegradação. Estudos em laboratório visando determinar as taxas de biodegradação podem ser usados como testes de varredura para determinar a rapidez e extensão da biorremediação, fornecendo, assim, um desenho criterioso na obtenção de uma biorremediação ótima. No entanto, nem todos os ensaios de laboratório sobre biodegradabilidade podem ser usados para simular os complexos processos de biorremediação em condições naturais de campo. Os parâmetros mais importantes a serem avaliados antes da implementação de um projeto nessa área são determinar se o composto é biodegradável e conhecer o mecanismo mais efetivo e a taxa de biodegradação.

A seleção da estratégia mais efetiva de biorremediação está baseada nas características dos contaminantes (solubilidade, lipofilicidade, estrutura molecular, volatilidade, peso específico e susceptibilidade ao ataque microbiano) e da área contaminada. Além disso, outros fatores também interferem no sucesso da biorremediação como, por exemplo, comunidade microbiana nativa, aeração, suplementação nutricional, potencial de água, dentre outros. Compostos que são mais suscetíveis ao metabolismo microbiano apresentam estruturas moleculares simples, são solúveis em água, não são tóxicos e servem como substratos para o crescimento aeróbio de microrganismos. Ao contrário, compostos que são resistentes ao metabolismo microbiano exibem estruturas moleculares complexas, apresentam baixa solubilidade, forte sorção, toxicidade e não suportam o crescimento microbiano.

A complexidade das técnicas de biorremediação requer que cada tratamento seja adaptado à situação individual do local contaminado. Todo planejamento de biorremediação deve começar por definir os parâmetros de tratamento. No entanto, mesmo tendo sido levantados esses parâmetros, não é uma tarefa fácil o delineamento experimental e o início dos trabalhos. Os parâmetros mais importantes são: concentração e lista de contaminantes a serem removidos e propriedades físico/químicas (volatilidade, solubilidade, gravidade específica, coeficiente de partição octanol/água). Deve ser lembrado que os ensaios laboratoriais, sob condições controladas, devem ser usados para predizer o que acontecerá em condições naturais.

Outras características de importância devem ser avaliadas em um planejamento de biorremediação, para garantir o sucesso do tratamento. Skladany & Metting Junior (1992), apontam alguns desafios para o sucesso do tratamento biológico de solos contaminados:

- **Heterogeneidade do resíduo:** resíduos orgânicos e inorgânicos são heterogeneamente dispersos no solo. Os contaminantes podem estar presentes na forma de sólidos, líquidos ou gases, livres na solução do solo ou fisicamente sorvidos ou quimicamente ligados à partícula.
- **Efeitos de concentração:** os contaminantes podem estar presentes em concentrações extremamente baixas (ppm ou ppb), ou em concentrações muito altas. Baixas concentrações podem não ser adequadas para suportar o crescimento microbiano. Altas concentrações, por outro lado, podem ser inibitórias ou tóxicas à vida microbiana.
- **Persistência ou toxicidade:** muitos contaminantes são relativamente resistentes à biodegradação ou podem requerer esforços metabólicos combinados de várias espécies microbianas, com ou sem a presença adicional de fontes de carbono.
- **Condições adequadas para o crescimento microbiano:** a atividade microbiana adequada terá lugar somente sob condições ambientais favoráveis. Criar e manter essas condições ótimas é uma tarefa difícil e desafiadora. Condições específicas da área contaminada podem limitar severamente a capacidade para se criar condições aceitáveis para o crescimento microbiano, particularmente para aplicações *in situ*.

Entre os muitos métodos de biorremediação disponíveis, alguns podem ser empregados para tratamento de grandes extensões de solos agrícolas contaminados. O nível de contaminação, para que haja intervenção, pode ser simplesmente aqueles onde os níveis de resíduos presentes afetam o desenvolvimento de outras culturas agrícolas susceptíveis, ou que estejam além dos níveis aceitáveis. Dentro dessa abordagem, a fitorremediação e a utilização de rizobactérias aparecem como alternativas mais práticas.

Um grande número de pesquisas tem evidenciado um aumento na degradação de pesticidas na rizosfera de uma variedade de espécies vegetais (Tabela 1). Mais recentemente, essas pesquisas têm se voltado para compostos químicos industriais, como HAPs, petróleo, surfactantes, PCP etc.

O sistema “rizosfera” é uma tecnologia apropriada para contaminantes dispersos próximos à superfície do solo. O sistema radicular servindo, portanto, como um meio para efetiva colonização do solo, assim como uma fonte prontamente disponível de nutrientes. A rizosfera é particularmente atrativa quando a capacidade metabólica de interesse é restrita a certas bactérias, como no caso da degradação cometabólica de tricloroetileno (TCE) (WALTON & ANDERSON, 1990). TCE está presente em 27,9% dos sítios com resíduos tóxicos nos USA, sendo considerado um dos 10 poluentes mais comuns detectados nessas áreas (www.hsia.org/trichloro.htm). Esse mesmo poluente foi removido do solo por meio de uso de uma rizobactéria, *Pseudomonas fluorescens* associada às raízes de trigo. Essa bactéria expressa, portanto, os genes tom A⁺ (tolueno o-monoxigenase) de *Burkholderia cepacia* PR1₂₃ (TOM--₂₃) envolvidos na degradação de TCE (YEE *et al.*, 1998). Embora rizobactérias indígenas e plantas sejam empregadas para tratar solos contaminados, bactérias capazes de colonizar plantas específicas podem ser transformadas geneticamente para

TABELA 1. Exemplificação de trabalhos mostrando aumento da degradação de pesticidas na rizosfera.

Xenobióticos	Planta	Referências
Atrazina	Milho	Hueck & Seibert (1981)
Atrazina		
Metolachlor	Kochia	Anderson <i>et al.</i> , (1994)
Tritlesalina		
Atrazina	Milho	Piretti <i>et al.</i> , (2002)
Atrazina	Milho	Alvey & Crowley (1996)
Mecoprop, 2,4D	Trigo	Lappin <i>et al.</i> , (1985)
Mecoprop, 2,4D	Cana-de-açucar, trevo	Sandmann & Loos (1984)
Diazinon, paraton	Feijão	Hsu & Bartha (1979)
Tricloroetileno	Trigo	Yee <i>et al.</i> , 1998
Paration	Arroz	Reddy & Sethumathan (1983)
Hidrocarbonetos poliaromáticos (benzo[a]pireno, benzo[a]anthraceno, criseno e dibenzo[a,h] antraceno)	Gramíneas	Aprill & Sims (1990)
Propanil	Arroz	Hoagland <i>et al.</i> , (1994)
Surfactantes	Milho, soja	Knaebel & Vestal (1992)
Pentaclorofenol	Gramínea (<i>Agropyron</i> <i>desortorum</i>)	Ferro <i>et al.</i> , (1994)
Petróleo	Leguminosas	Gudin (1978)

melhor controle do processo. Uma linhagem de *P. fluorescens* colonizadora de raízes foi construída por integração cromossomal dos genes bph (codificando a degradação de PCB) com um vetor de integração suicida (BRAZIL *et al.*, 1995).

A degradação de PCB com esta bactéria recombinante foi demonstrada em microcosmos contendo planta-solo-bactéria, usando um gene repórter inserido próximo aos genes envolvidos na degradação de PCB. Esse sistema foi eficaz em remover 63% de TCE após 4 dias, demonstrando a possibilidade da rizorremediação para o tratamento de solos superficiais contaminados com TCE. Uma diferente linhagem de *P. fluorescens* capaz de colonizar raízes de feijão foi também construída.

A bactéria recombinante, quando aplicada à rizosfera de feijão foi capaz de degradar 2,5-diclorobenzoato, utilizando-o com fonte de carbono (CROWLEY *et al.*, 1996).

Vários estudos sob condições controladas têm mostrado a influência de plantas sobre a biodegradação acelerada na rizosfera. A adição de uma linhagem de *P. fluorescens* capaz de degradar 2,5-diclorobenzoato causou o desaparecimento desse composto em 3 dias na presença de plantas de feijão, visto que quantidades consideráveis do poluente ainda permaneciam no solo sem plantas (CROWLEY *et al.*, 1996).

Estudos feitos com atrazina, mostraram que as taxas de mineralização desse herbicida foi significantemente superior na rizosfera de milho do que em solo sem vegetação (PIUTTI *et al.*, 2002). A rizosfera do milho também mostrou um aumento da biomassa de C microbiana. Análise do gene *atzC*, que codifica uma enzima envolvida na mineralização de atrazina, conduzida por PCR, revelou sua presença em um nível superior na rizosfera do que no solo não vegetado. Estes resultados sugeriram que a estimulação da mineralização de atrazina na rizosfera depende da abundância das comunidades microbianas.

Do mesmo modo como a presença de vegetação pode aumentar a degradação de pesticidas, ela também pode aumentar a velocidade de degradação de compostos recalcitrantes, como, por exemplo, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA). Pesquisas comprovando esses efeitos têm sido publicadas mais recentemente, mostrando o potencial da rizorremediação de vários compostos químicos industriais. Em um experimento em condições controladas sob casa-de-vegetação foi verificado que a degradação de HPA foi maior na presença de plantas do que na sua ausência (SCHWAB *et al.*, 1995). HPAs alvo foram detectáveis nos tecidos da planta, mas a quantidade total de absorção foi insignificante. A maior atividade microbiana detectada foi aparentemente responsável pela dissipaçāo aumentada dos HPAs.

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas podem também conter altos níveis de metais pesados. A hiperacumulação de metais (até 1% do peso seco) é comum para plantas que têm se adaptado a solos com alta concentração de Co, Cu, Cr, Pb, Ni e Zn (BAKER e BROOKS, 1989). Há bactérias isoladas da rizosfera, no entanto, que degradam xenobióticos e/ou bioacumulam metais, mas não necessariamente são consideradas RPCP. Neste caso, raízes de plantas atuam como sítios para transformação do contaminante pelas rizobactérias (ANDERSON *et al.*, 1993). *Kluyvera ascorbata* (SUD165), por exemplo, uma rizobactéria, foi resistente aos efeitos tóxicos de Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} e CrO_4^- . Esta bactéria, quando inoculada em sementes de canola e plantada sob altas concentrações de cloreto de níquel, protegeu parcialmente a planta contra a toxicidade (BURD *et al.*, 1998).

Segundo os autores, a bactéria não teve nenhuma influência mensurável sobre a quantidade de níquel acumulada nas plantas de canola. Entretanto, o efeito sobre a promoção de crescimento da planta na presença do metal foi, provavelmente, não atribuído à redução da absorção do níquel pelas plântulas, mas sim, à habilidade da bactéria de baixar o nível de estresse de etileno induzido pelo níquel.

As propriedades da planta que são melhoradas com a inoculação RPCPs durante a biorremediação incluem biomassa, absorção do contaminante e nutrição e saúde da planta.

Algumas plantas acumulam mais contaminantes por grama de material vegetal com a adição de RPCRs, conforme verificado por Hoflich & Metz (1997) e por Whiting *et al.* (2001). Esses estudiosos mostraram que a inoculação bacteriana de milho e *Thlaspi caerulescens* aumentou a absorção de metais pesados por essas plantas. Do mesmo modo que os autores acima, de Souza *et al.* (1999) também encontraram um aumento na acumulação de selenium por *Brassica juncea* após inoculação com rizobactérias.

O sucesso da aplicação de RPCPs para biorremediação dependerá da sobrevivência e estabilidade da bactéria em solos com altos níveis de contaminação. Nessas condições, a bactéria pode ser completamente inibida. Um exemplo que ilustra bem esse efeito é a inibição do crescimento de, aproximadamente, 50% de *Enterobacter cloacae* em solos contaminados com 20 mM de arsenato. Já em solos com somente 2mM arsenato, a bactéria foi inibida em 2% (NIE *et al.*, 2002).

Referências

- AJITHKUMAR, P.V.; GANGADHARA, K.P.; MANILAL, P.; KUNHI, A.A.M. Soil inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* 3mT eliminates the inhibitory effect of 3-chloro and 4-chlorobenzoate on tomato seed germination. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.8/9, p.1053-1059, 1998.
- ANDERSON T.A.; GUTHRIE E.A.; WALTON B.T. Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. **Environmental Science and Technology**, v.27, p.2630-2636, 1993.
- ANDERSON, A.J.; P. HABIBZADEGAH-Tari; C.S. TEPPER. Molecular studies on the role of root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.375-380, 1988.
- ANDERSON, T.A.; KRUGER, E.L.; COATS, J.R. Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant. **Chemosphere**, v.28, p.1551-1557, 1994.
- ARSHAD, M.Y.; FRANKENBERGER, W.T.Jr. Microbial production of plant hormones. **Plant and Soil**, v.133, p.1-8, 1991.
- BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81-126, 1989.
- BARBER, D.A.; MARTIN, J.K. The release of organic substances by cereal roots into soil. **New Phytologist**, v.76, p.69-80, 1976.
- BELIMOV A.A.; KUNAKOVA A.M.; VASILYEVA N.D.; KOVATCHEVA T.S.; DRITCHKO V.F.; KUZOVATOV S.N.; TRUSHKINA I.R.; ALEKSEYEV Y.V. Accumulation of radionuclides by associative bacteria and the uptake of ^{134}Cs by the inoculated barley plants. **Developments in Plant and Soil Sciences**, v.79, p.275-280, 1998.
- BELIMOV, A.A.; DIETZ, K.J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. **Microbiology Research**, v.155, p.113-121, 2000.
- BEYELER M.; MICHAUX, P.; KEEL, C.; HAAS, D. Effect of enhanced production of indol-3-acetic acid by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO on plant growth. In: Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) **Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**, Sapporo, Japan, October 18-22, 1997, Sapporo University, pp 310-312
- BRAZIL, G.M.; KENEFICK, L.; CALLANAN, M.; HARO, A.; V. de LORENZO; DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1946-1952, 1995.
- BROWN M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.181-197, 1974.
- BROWN, M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.35, p.443-445, 1972
- BROWN, M.E.; JACKSON, R.M.; BURLINGHAM, S.K. Studies on *Azotobacter* species in soil. II. Effects of artificial inoculation on crops yields. **Plant and Soil** Dordrecht, v.17, n.3, p.320-332, 1962.
- BROWN, M.E.; JACKSON, R.M.; BURLINGHAM, S.K. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Populations of *Azotobacter* in the rhizosphere and effects of artificial inoculation. **Plant and Soil**, v.20, n.2, p.194-214, 1964.
- BURD G.I.; DIXON D.G.; GLICK B.R. A plant-growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3663-3668, 1998.
- CHRISTENSEM, C.M. **Storage of cereal grains and their products**. Saint Paul, Minnesota, A.A.C.C., 1974. 568 p.
- CHRISTENSEN, B.E. The role of extracellular polysaccharide in biofilms. **Journal of Biotechnology**, v.10, p.181-202, 1989.

- CROWLEY, D.E.; M.V. BRENNEROVA; C. IRWIN; V. BRENNER; D.D. FOCHT. Rhizosphere effects on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Ecology*, v.20, p.79-89, 1996.
- CURI, E.A.; TRUELOVE B. The rhizosphere. In: **Advances series in agricultural sciences** No. 15. Springer-Verlag, 1986. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- de SOUZA M.P.; CHU D.; ZHAO M.; ZAYED A.M.; RUZIN S.E. *et al.* Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiology*, v.119, p.565-73, 1999.
- de WEGER, L.A.; van der VLUGT, C.I.M.; WIJFJES, A.H.M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B.; LUGTENBERG, B.J.J. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *Journal of Bacteriology*, v.169, p.2769-2773, 1987.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v.41, p.109-117, 1995.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v.41, p.109-117, 1995.
- GLICK, B.R.; JACOBSON, C.B.; SCHWARZE, M.M.K.; PASTERNAK, J.J. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. *Canadian Journal of Microbiology*, v.40, p.911-915, 1994.
- HALE, M.G.; L.D. MOORE; G.J. GRIFFIN. Root exudates and exudation, p. 163-203. In Y. R. DOMMERGUES; S.V. KRUPA (ed.), **Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants**. Amsterdam: Elsevier, 1978.
- HALVERSON, L.J.; STACEY, G. Effect of lectin on nodulation of wild type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation defective mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, p.753-760, 1986.
- HILTNER, L. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft*, v.98, p. 59- 78, 1904.
- HOFLICH G.; METZ R. Interactions of plant-microorganism-associations in heavy metal containing soils from sewage farms. *Bodenkultur*, v.48, p.239-247, 1997.
- HOWIE W.J.; COOK R.J.; WELLER D.M. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*, v.77, p.286-292, 1987.
- JACOBSON, C.B.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, v.40, p.1019-1025, 1994.
- JIMENEZ, J.I.; MINAMBRES, B.; GARCIA, J.L.; DIAZ, E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, v.4, p.824-841, 2002.
- KATZNELSON, H.; COLEM, S.E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, v.11, p.733-741, 1965.
- KLOEPPER J.W.; LIFSHITZ R.; ZABLOTOWICZ R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, v.7, p.39-43, 1989.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, v.286, p.885-886, 1980a.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiology*, v.4, p.317-320, 1980b.
- KLOEPPER, J.W. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato root and daughter tubers. *Phytopathology*, v.73, p.217-219, 1983.
- KRUGER E.L.; RICE P.J.; ANHALT J.C.; ANDERSON T.A.; COATS J.R. (1997) "Comparative fates of atrazine and deethylatrazine in sterile and nonsterile soils". *Journal of Environmental Quality*, v.26, p.95-101, 1997.
- LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews*, v.43, p.422-442, 1979.
- LEMANCEAU P., ALABOUVETTE C., Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications, *Biocontrol Science and Technology*, v.3, p.219-234, 1993.
- LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFRAS, J.; ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.), on the diversity of soilborn populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.11004-1012, 1995.
- LEWIS D.G.; QUIRK J.P. Phosphate diffusion in soil and uptake by plants. *Plant and Soil*, v.26, p.445-453, 1967.

- LIFSHITZ, R.; KLOEPER, J.W.; KOZLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; TIPPING E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola(rape-seed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnoto-tropic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, v.23, p.390-395, 1987.
- LUCON, C.M.M. Sideróforos e controle biológico de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Controle Biológico*, Jaguariúna – Embrapa Meio Ambiente, v.3, cap.6, p.141-161, 2000.
- MISAGHI, I.J.; STOWELL, L.J.; GROGAN, R.G.; SPEARMAN, L.C. Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonds. *Phytopathology*, v.72, p.33-36, 1982.
- NELSON, K.E. et al. Complete genome sequence and comparative analisis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, v.4, p.799-808, 2002.
- NIE, L.; SHAH, S.; RASHID, A.; BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK B.R. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.40, p.355-361, 2002.
- PIUTTI, S.; HALLET, S.; ROUSSEAU, S.; PHILIPPOT, L.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. Accelerated mineralization of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils*, v.36, p.434-441, 2002.
- ROQUE, M.R.A. Isolamento, Caracterização e Ecologia de *Acinetobacter baumannii* Degradadora de Herbicida Diuron. Rio Claro: Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2000. 119f. Tese (Doutorado).
- ROVIRA, A.D. Microbial inoculation of plants. Establishment of free-living N₂-fixing bacteria on maize and wheat. *Plant and Soil*, v.19, p.304-314, 1963.
- ROVIRA, A.D. Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. *Soils and Fertilizers* v.25, p.167-172, 1962.
- ROVIRA, A.D.; FOSTER, R.C.; MARTIN, J.R. Note on Terminology: Origin, Nature, and Nomenclature of Organic Materials in the Rhizosphere In: *The Soil-Root Interface*. 1979, Academic Press, New York.
- ROVIRA, A.D.; SANDS, D.C. Fluorescent pseudomonads: A residual component in the soil microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, v.34, p.253-259, 1971.
- SANDMANN, E.R.I.C.; LOOS, M.A. Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media; high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Chemosphere*, v.13, p.1073-1084, 1984.
- SCHER, F.M.; KLOEPER, J.W.; SINGLETON, C.; ZALESKI, I.; LALIBERTE, M. Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacteria motility, chemotaxis and generation time. *Phytopathology*, v.78, p.1055-1059, 1988.
- SCHIPPER, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.R.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*. Palo Alto, v.25, p.339-388, 1987.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, v.216, p.1376-1381, 1982.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Select topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.35, p.453-476, 1981.
- SCHWAB, A.P.; BANKS, M.K.; ARUNACHALAM, M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soils, p.23-29. In: HINCHEE, R.E.; ANDERSON, D.B.; HOEPPEL, R.E. (Ed.). *Bioremediation of recalcitrant organics*. Columbus: Battelle Memorial Institute, 1995.
- SHANN, J.R.; BOYLE, J.J. Influence of the plant species on *in situ* rhizosphere degradation. In: *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. ANDERSON, T.; COATS, J. (Ed.). Washington, DC: ACS, 1994.
- SKLADANY, G.J.; METTING JUNIOR, F.B. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING JUNIOR, F. B. (Ed.). *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. New York: M. Dekker, 1992. p.483-513.
- SMILEY, R.W. Rhizosphere pH as influenced by plants, soils, and nitrogen fertilizers. *Soil Science Society of America Journal*, v.38, p.795-799, 1974.
- SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, v.72, p.199-206, 1982b.
- SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*, v.72, p.111-115, 1982a.
- TARI, P.H.; ANDERSON, A.J. *Fusarium* wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.2037-2041, 1988.
- VANCURA, V.; STANEK, M. Root exudates of plants. V. Kinetics of exudates from bean roots as related to the presence of reserve compounds in cotyledons. *Plant and Soil*, v.43, p. 547-559, 1975.

- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1012-1016, 1990.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. **Applied and Environmental Microbiology**, p.1012-1016, 1991.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.
- WHITING, S.N.; LEAKE, J.R.; MCGRATH, S.P.; BAKER, A.J.M. Assessment of Zn mobilization in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* by bioassay with non-accumulator plants and soil extraction. **Plant and Soil**, v.237, p.147-156, 2001.
- XU G.W.; GROSS D.C. Field evaluations of the interactions among fluorescent Pseudomonads, *Erwinia carotovora*, and potato yields. **Phytopathology**, v.76, p.423-430., 1986.
- YEE, D.C.; MAYNARD, J.A.; WOOD, T.K. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. **Applied and Environmental Microbiology**, p.112-118, 1998.
- YUNG K.H.; S.F. YANG; F. SCHLENK. Methionine synthesis from 5-methylthioribose in plant tissue. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.104, p.771-777, 1982.

Microbiologia Aquática Marinha

**Irma Nelly G. Rivera¹, Claudete Rodrigues Paula¹ e
Claudiana Paula de Souza²**



Fotos: I.N.G. Rivera

TABELA 1. Classificação pelo tamanho das células dos grupos de microrganismos e vírus no ecossistema marinho.

Classificação	Grupos de Microrganismos/vírus	Tamanho (μm)
Fentoplâncton	Vírus	0,01-0,2
	Procariotos/Bactérias	
	Fotoautotrófico	0,5-1,0
	Cianobactéria	1,0-2,0
	Cianobactéria filamentosa	7-10
Picoplâncton	Quimioautotrófico	0,3-1,0
	Heterotrófico	0,3-1,0
	Archaea	
	Eucariotos	
	Picoalgas, picoheterotróficos flagelados	1,0-2,0
Nanoplâncton	Nanoalgas, nanoheterotróficos protistas (principalmente flagelados) Fungos	2-20
Micoplâncton	Microalgas Microheterotrófico protistas (ciliados e dinoflagelados heterotróficos) Fungos	20-200

Adaptado de Sherr & Sherr, 2000.

2. Saúde ambiental, poluição microbiana e eutrofização

Atualmente, em virtude das influências do homem no meio ambiente, importantes mudanças estão ocorrendo. Um ambiente antes classificado como natural pode estar se transformando em um ambiente impactado, ou seja, o ecossistema está perdendo suas características naturais, assim como está ocorrendo a introdução de espécies invasoras. A maior causa de introdução de novas espécies é a intervenção humana (NRC, 1995; NRC, 1996; Relatório Probio, 2005).

Invasões biológicas ocorrem quando uma espécie exótica, introduzida em determinado ambiente, se adapta, se estabelece, passa a se propagar e a dominar espécies nativas, expulsando-as e gerando, consequentemente, perda de biodiversidade e alterações nos ciclos ecológicos naturais. Nem todas as espécies exóticas, introduzidas a outros ambientes, se tornam invasoras, pois isto dependerá do seu nível de agressividade e dominação sobre as espécies nativas. Ou seja, uma única espécie pode causar distúrbios em grandes áreas (Relatório Probio, 2005).

Espécies exóticas invasoras são consideradas, na atualidade, a segunda grande causa de perda da biodiversidade biológica no planeta, perdendo apenas para a conversão direta de ambientes pelo homem, mas as consequências da invasão por espécies exóticas dependem de cada situação. Alguns impactos são mais comuns e generalizados, outros variam com as condições de cada local. De forma genérica, pode-se afirmar que ocorre: (1) ocupação do espaço das espécies nativas, levando ao seu deslocamento e a perda de populações ou espécies, (2) modificação estrutural do ambiente, (3) perda da biodiversidade local ou regional,

(4) quebra de ciclos ecológicos e da resistência dos ambientes naturais, (5) deslocamento de exemplares da fauna, quebra de processos ecológicos como cadeias alimentares e polinização, e (6) modificação da paisagem (NRC, 1996; Relatório Probio, 2005).

Espécies invasoras de microrganismos introduzidos em regiões costeiras podem desenvolver ou potencializar a patogenicidade das espécies locais; aumentar a população de microrganismos patogênicos já existentes e/ou desenvolver populações exóticas, levando a um enorme prejuízo como o surgimento de doenças em certos locais. Em ambientes ainda virgens é mais difícil a proliferação dessas espécies, mas o contrário ocorre em ambientes muito poluídos, onde a disseminação dessas espécies é facilitada. Portanto, o grau de balneabilidade das praias poderia ser considerado como um parâmetro indireto para avaliar o risco de colonização de uma espécie e o possível surgimento de uma espécie invasora.

Muitos ecossistemas aquáticos continentais e águas costeiras marinhas recebem despejos de esgotos domésticos, industriais e descarga de fertilizantes, aplicados na agricultura, os quais são compostos principalmente de fósforo e nitrogênio, que servem como nutrientes para as plantas e dão origem a eutrofização dos ecossistemas.

Nos últimos anos, em razão da expansão das atividades antrópicas na região costeira marinha, tornou-se imperativa a necessidade de uma avaliação contínua da qualidade das águas litorâneas. A descarga de esgotos não tratados afeta a saúde do ecossistema marinho em duas formas: (1) poluição microbiana pela introdução de microrganismos patogênicos levados pelo homem, os quais podem afetar a saúde humana, e (2) os poluentes químicos orgânicos e inorgânicos, que dependendo do tipo, podem afetar severamente as estruturas das comunidades dos ecossistemas.

A balneabilidade constitui a qualidade da água para fins de recreação. Os corpos de água contaminados por esgotos domésticos, ao atingirem as águas das praias, podem expor os banhistas a bactérias, fungos, vírus e protozoários, podendo levar ao desenvolvimento de doenças ou infecções após o banho em águas contaminadas (RIVERA & MARTINS, 1996; CETESB, 2004).

Descargas excessivas de esgoto nas áreas urbanas e industriais levam a eutrofização das águas costeiras, o que pode alterar a composição das populações do plâncton. O crescimento acelerado do plâncton, em virtude do elevado teor de nutrientes dos esgotos, pode levar ao esgotamento do oxigênio disponível para os peixes, causando sua morte. A presença de bactérias patogênicas no esgoto tem levado a interdição das praias e as proibições de pesca de moluscos e crustáceos, que concentram bactérias em seus tecidos.

No estado de São Paulo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, há 32 anos, realiza de forma sistemática seu programa de balneabilidade das praias e outros programas de monitoramento das águas marinhas, costeiras e profundas, de sedimentos e de emissários submarinos (CETESB, 2004).

“A preservação dos ambientes aquáticos é essencial para proteger a biodiversidade dos ecossistemas”.

3. Biodiversidade de microrganismos

"Biodiversidade é consequentemente essencial para manter a estabilidade dos sistemas vivos que estão ao nosso redor e assegurar a nossa sobrevivência a partir da morte, excrementos e detritos de membros contemporâneos da nossa própria espécie, bem como de outros organismos". Hawksworth & Mount

A biodiversidade é definida como a coleção de genomas, espécies e ecossistemas presentes em cada região geográfica definida (NRC, 1995).

Os oceanos ocupam 71% da superfície terrestre e essa grande massa de água tem uma grande importância na vida dos seres vivos, moderando o clima terrestre e é receptor e reservatório do ciclo global da água. Os ambientes marinhos possuem uma salinidade que varia de 33% até 37%, pH 8,3-8,5, e temperaturas de 0°C a 5°C, a 100 m de profundidade. Como todo sistema biológico, possui uma grande diversidade de formas de vida, variando de mamíferos até seres microscópicos. Os estuários, mistura de rios e lençol freático com águas marinhas, são regiões mais produtivas que o próprio oceano e águas doces. A diversidade do ecossistema aquático marinho, em geral, vai depender dos parâmetros abióticos como carga orgânica, concentração de nutrientes, corrente marinha, intensidade de luz, magnetismo, pH, potencial redox, profundidade, salinidade, temperatura, turbulência, e dos fatores bióticos como a presença de micro e macrorganismos (ATLAS & BARTHA, 1993; REPORT AAM, 2005).

A relação da proporção das espécies existentes e conhecidas na biosfera pode ser observada na Figura 2 que ilustra o paradoxo do número de organismos vivos conhecidos de animais, plantas e microrganismos e o número de organismos existentes ou conhecidos. Tiedje (1994) e Allsopp e colaboradores (1995), sugerem que aproximadamente 300.000 a um milhão de espécies de bactérias habitam a terra, e que no Manual Bergey somente estão listados e descritos 3.100 espécies (COLWELL, 1996; COLWELL & GRIMES, 2000).

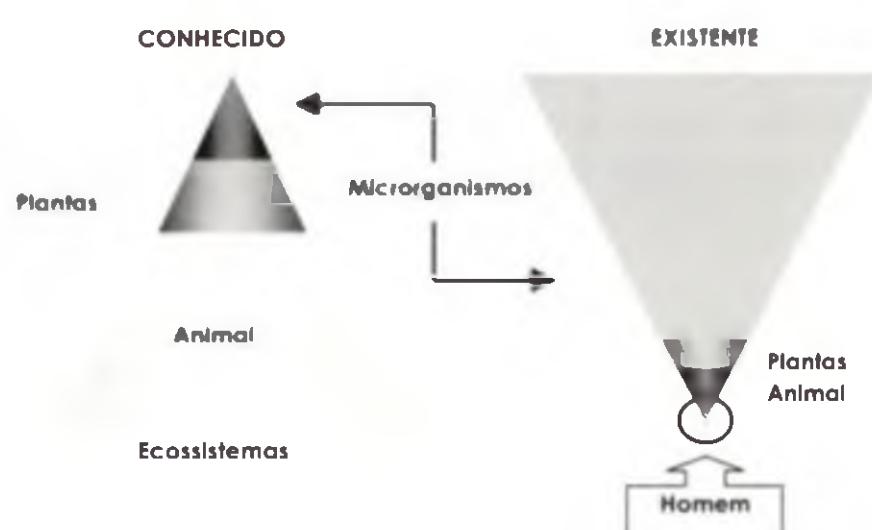


FIGURA 2. Distribuição de espécies na biosfera (Cases & Lorenzo, 2002).

Considerando a classificação tradicional dos microrganismos, até 1997, foram descritas aproximadamente 1% das 5×10^5 espécies virais, 5 a 10% de $1,5 \times 10^6$ espécies de fungos e 0,1 a 1% de um valor estimado de 4×10^5 até 3×10^6 de bactérias (COLWELL, 1997). Entretanto, nos oceanos, hoje o número total de células procariotas é estimado em aproximadamente 10^{29}

(PEDROS-ALIO, 2006) e das mesmas, aproximadamente 6000 espécies estão formalmente descritas, baseado em cultura tradicional (<http://www.bacterio.cict.fr/number.html>).

As proteobactérias consistem em mais de 200 gêneros conhecidos e a maioria são gram-negativas (80-95%), móveis e pigmentadas; entretanto, pesquisas realizadas na Rússia indicam que a proporção das mesmas é pequena. Podem ser incluídos os seguintes gêneros de bactérias *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Leucothrix*, *Planococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Spirillum* e *Vibrios*. A bactéria predatória *Bdellovibrio* também tem sido relatada (CAMPBELL, 1983; BALOWS *et al.*, 1992; HOLT *et al.*, 1994; STACKEBRANDT *et al.*, 1998; WEINER, 1999; URAKAWA & RIVERA, 2006).

A sistemática do bacterióplâncton cultivável, baseado no seqüenciamento do gene 16S rRNA (SSU “small subunit” 16 rRNA), divide as proteobactérias em cinco grupos: alpha (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) e epsilon (ϵ) (MADIGAN, *et al.*, 2004; GIOVANNONI & RAPPE, 2000). As bactérias mais comumente encontradas no ecossistema marinho pertencem às proteobactérias do grupo gamma e estão divididas em dois grandes sub-grupos: Gênero *Alteromonas*, e a Família *Vibrionaceae* que incluem os gêneros *Vibrio* e *Photobacterium*. O grupo gamma é considerado o grupo mais importante no ambiente marinho que, algumas vezes, domina às bactérias heterotróficas e interage com organismos marinhos em uma relação que varia de simbótico a patogênico (URAKAWA & RIVERA, 2006).

O Brasil possui uma costa extensa de aproximadamente 8.500 km. As primeiras pesquisas oceanográficas ocorreram entre 1925-1927, realizadas pelo navio oceanográfico alemão Meteor, que executava o reconhecimento do Atlântico Sul. Apenas em 1946 foi criada a primeira instituição de pesquisa que, posteriormente, em 1951, foi incorporada à Universidade de São Paulo com o nome de Instituto Oceanográfico (SEVERO DE SOUZA, 1999).

No Brasil, trabalhos pioneiros para determinar a biomassa bacteriana em ecossistemas marinhos foram realizados entre 1985 e 2004 em diversos estados (Ceará, Pará, Paraná, Recife, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo). Utilizando diversos métodos como a contagem em placas, coloração das células com DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole) ou alaranjado de acridina (AO), determinação do peso seco e citometria de fluxo, os pesquisadores mostraram contagens da ordem de 10^6 céls/mL, ou 284,44 mg C/m³ ou 6,2 g/m², como valores máximos da biomassa. Os resultados variaram muito de local para local e a contagem em placa foi menos sensível quando comparada com a contagem utilizando a microscopia de epifluorescência, em duas até três escalas logarítmicas (MESQUITA & FERNANDES, 1991; MESQUITA, 1993; ODEBRECHT & ABREU, 1997; SUSINI-RIBEIRO, 1999; CARVALHO, 2000; CÉSAR & ABREU, 2001; ABREU *et al.*, 2003; ROCHA, 2003; ANDRADE, 2004; MARKMAN *et al.*, 2004; RIVERA, 2004; ALMEIDA, 2005).

As publicações pioneiras sobre o estudo das leveduras em ambientes marinhos foram realizadas por Zobell & Feltham (1934) e Zobell (1946). Foram identificados e relatados vários gêneros de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*,

Debaryomyces, Hansenula, Hanseniaspora, Kloeckera, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Sporobolomyces, Torulopsis e Trichosporon (FELL, 1960; JOHNSON & SPARROW, 1961; ROTH *et al.*, 1962; MORRIS, 1975). A biodiversidade de leveduras depende muito da variação da salinidade estacional da região costeira e de acordo com as marés. Foram descritos também fungos filamentosos como *Cephalosporium, Cladosporium* e *Penicillium* (CAMPBELL, 1983). As leveduras já foram isoladas da maioria dos animais marinhos, com exceção das esponjas, sendo encontradas comumente no intestino, em secreções viscosas e guelras dos peixes (MORRIS, 1975). As leveduras e organismos semelhantes participam de vários processos ecologicamente significativos no mar, especialmente em estuários. Dentre estas atividades podemos citar a decomposição de substratos de plantas, a reciclagem de nutrientes, a biodegradação de óleo e compostos recalcitrantes e o parasitismo de animais marinhos (MEYERS & AHEARN, 1974). Baseado nestes fatos foi discutido a possibilidade do emprego de leveduras, a semelhança dos coliformes como indicador de águas poluídas (SIMARD, 1971) e verificou-se o aumento da população das leveduras após a degradação bacteriana de compostos mais facilmente metabolizáveis.

No Brasil, são poucas as publicações sobre leveduras marinhas, entretanto, trabalhos pioneiros foram realizados nos estados do Rio de Janeiro (HAGLER, 1978) e São Paulo (PAULA, 1978; 1983). Paula (1978), conclui que as leveduras podem ser utilizadas como indicadores de poluição em águas de estuários marinhos, já que a concentração das leveduras foi correlacionada com o índice de coliformes fecais nas amostras estudadas nas praias da Ilha de São Vicente e de Bertioga.

No ecossistema marinho, poucos são os estudos avaliando a freqüência e diversidade de vírus. Entretanto, sabe-se que são muito abundantes no plâncton marinho, por serem parasitas obrigatórios, na ordem de 10^7 por mililitro. Estudos sugerem que os vírus são responsáveis por cerca de 10-40% da mortalidade das bactérias e, muitas vezes, a morte é causada pela lise viral. Uma outra função dos vírus inclui a influência na composição e diversidade das comunidades e espécies e, principalmente, na transferência genética (FUHRMAN, 2000; WOMMACK & COLWELL, 2000). Chiang & Mekalanos (1999) propuseram a transferência genética horizontal, por transdução de fagos, em *Vibrio cholerae* para a emergência de cepas patogênicas.

O problema maior para o estudo da biodiversidade microbiana é a metodologia usada. Normalmente, as técnicas de isolamento e de cultivo de amostras ambientais em placas, são insuficientes para se estudar as comunidades microbianas, uma vez que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza (entre <0.1 a 1%) é cultivável por meio do uso de técnicas microbiológicas de rotina (BOWDEN, 1977; DALEY, 1979; FRY, 1988; HERBERT, 1990; KEPNER & PRATT, 1994; AMANN *et al.*, 1995; COTTRELL & KIRCHIMAN, 2000). A maioria das bactérias em amostras naturais não consegue ser detectada, através deste método, pois as mesmas podem se apresentar na forma viável mas não cultivável (VBNC). Este estágio, apresentado e descrito para alguns microrganismos pode ocorrer quando as bactérias não têm função enzimática no ecossistema (estado de dormência) ou quando mudam de ambiente enfrentando baixas temperaturas, choque térmico, altas concentrações

de salinidade, falta de nutrientes e outros fatores (ROSZACK *et al.*, 1984; GRIMES *et al.*, 1986; ROSZACK & COLWELL, 1987; COLWELL *et al.*, 1990; COLWELL & HUQ, 1994; AMANN *et al.*, 1995; CHOWDHURY *et al.*, 1997; HUQ *et al.*, 2000; RUBIN, 2000).

A quantificação de bactérias e a determinação da biomassa são importantes para que possamos entender o seu papel ecológico. Assim, também, é necessário identificar os fatores primários responsáveis pela regulação dos números bacterianos, principalmente quando se trata de bactérias que tenham significado epidemiológico (HUQ *et al.*, 2000).

As técnicas epifluorescentes de contagem direta são os métodos mais freqüentemente escolhidos na análise direta da diversidade de bactérias no meio ambiente. Técnicas moleculares como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para grupos bacterianos, baseada em bibliotecas de genes da região 16S rRNA, estão sendo utilizadas em amostras de ambientes marinhos (DELONG *et al.*, 1989; WARD *et al.*, 1990; BRITSCHGI & GIOVANNONI, 1991; DELONG *et al.*, 1993; FUHRMAN *et al.*, 1993; AMANN *et al.*, 1995; BORNEMA & TRIPLETT, 1997; KUSKE *et al.*, 1997; LUDWIG *et al.*, 1997; PACE, 1997; HUGENHOLTZ *et al.*, 1998 a, b; GIOVANNONI & RAPPÉ, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A hibridização fluorescente *in situ* da região 16S rRNA aproxima as áreas da ecologia microbiana e a evolução (OLSEN *et al.*, 1986). Desde sua primeira aplicação, em 1989, sondas de oligonucleotídeos, marcadas com corantes fluorescentes, tornaram-se uma ferramenta mundialmente usada para a identificação direta e independente do cultivo em amostras ambientais complexas. (DELONG *et al.*, 1989),

Atualmente, a contagem de células totais, sem o cultivo tradicional, em amostras de água, é determinada pela combinação de membrana filtrante, marcadores com corantes específicos para ácidos nucléicos e microscópio epifluorescente (KEPNER & PRATT, 1994). A hibridização *in situ*, com sondas de ácidos nucléicos específicos, pode facilitar a identificação de grupos bacterianos e espécies de microrganismos (GLÖCKNER *et al.*, 1996).

Finalmente, a clonagem de genes obtidos de amostras do ambiente marinho mostrou 616 seqüências que não pertenciam a espécies cultiváveis, e que as arqueobactérias são abundantes e 80% das mesmas pertencem a nove grupos filogenéticos (GIOVANNONI & RAPPÉ, 2000).

Maiden e colaboradores (1998) propuseram uma metodologia para identificar as espécies microbianas denominada MLST “multilocus sequence typing” baseado no seqüenciamento de três genes: *rpoA*, *recA*, *pyrH*, e a mesma foi aplicada para o gênero *Vibrios* (THOMPSON *et al.*, 2005).

4. Ecologia e patogenicidade de bactérias

As pesquisas microbiológicas enfocaram, por muito tempo, que todos os microrganismos são patogênicos, entretanto, em nossos dias, sabe-se que eles possuem funções específicas nos ecossistemas e que apenas uma pequena fração dos microrganismos é patogênica.

Existem poucos trabalhos no Brasil mostrando a diversidade de microrganismos em ecossistemas não poluídos e, por isso, enfoca-se dois exemplos de estudos ecológicos e patogênicos de microrganismos no ambiente marinho: *Vibrio cholerae* e *Salmonella* spp. realizados no Brasil (RIVERA & MARTINS, 1996).

4.1 *Vibrio cholerae* no ecossistema marinho

No mundo inteiro, os vibrios pertencentes à Família *Vibrionaceae* e a Divisão das Gammaproteobacteria são as bactérias mais encontradas no ecossistema aquático desde águas salobras até o mar profundo (URAKAWA & RIVERA, 2006). Os vibrios requerem sal para o seu crescimento (1 até 3% de NaCl), possuem enzimas quitinolíticas que fazem a digestão da quitina. *Vibrio cholerae*, o primeiro vibrio seqüenciado, possui dois cromossomos circulares (HEILDELBERG *et al.*, 2000). Os vibrios encontram-se associados com plâncton, incluindo fito e zooplâncton (KANEKO & COLWELL, 1975, HUQ *et al.*, 1983). A concentração de espécies de *Vibrios*, algumas vezes, chega até 10^9 células por grama de plâncton (peso seco) e na coluna de água até 10^2 células por mL. Foi mostrado que, durante os meses de verão, em Chesapeake Bay, EUA, o número de bactérias é quase totalmente de vibrios (KANEKO & COLWELL, 1973). No Brasil, *Vibrios* foram isolados de ambientes aquáticos, de esgotos, de águas doces e de bivalves (RODRIGUES, 1981, RODRIGUES & HOFER, 1986; MARTINS, 1988; MATTÉ *et al.*, 1994a, 1994b).

Das 65 espécies do gênero *Vibrio* (THOMPSON & SWINGS, 2006), somente três espécies, *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, são responsáveis pela maioria das infecções veiculadas por alimentos e foram selecionadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para avaliar o risco da presença destas três espécies nos produtos marinhos. A crescente globalização da produção e comercialização de alimentos faz surgir possibilidades de disseminação destas bactérias patogênicas para além das fronteiras dos países produtores, resultando em novas situações de risco à saúde do consumidor. Com o objetivo de minimizar este impacto na saúde pública a OMS elaborou algumas publicações de análise de riscos microbiológicos relacionadas às três espécies de vibrios em alimentos marinhos (ostras e camarão) (www.fao.org) (www.codexalimentarius.net).

A cólera é uma doença diarréica ocasionada por *Vibrio cholerae* O1, toxigênico, levando a uma desidratação rápida. Apresenta alta letalidade quando não diagnosticada e tratada imediatamente. A infecção no homem se dá através da ingestão de água, alimentos contaminados ou pelo contato direto com indivíduos infectados. As epidemias de cólera, normalmente, acontecem próximas às regiões costeiras e, de modo geral, estiveram associadas ao transporte de pessoas ou às guerras. A cólera foi endêmica na Índia, por vários séculos, e não há registro de sua disseminação até 1817, quando se iniciou a primeira pandemia. A partir desta data, outras pandemias foram registradas, com alta incidência de casos letais, envolvendo Europa, Ásia, Norte da África e Américas (COLWELL *et al.*, 1998).

Outros sorovares de *V. cholerae*, os não-O1 (vibrios não aglutináveis pelo antissoro para *V. cholerae* do grupo O1), que anteriormente eram denominados vibrios

não aglutináveis (NAG) ou não coléricos (NCV) foram associados a doenças diarréicas, gastroenterites e infecções extra-intestinais (MORRIS *et al.*, 1994).

V. cholerae pode ser subdividido com base em seus抗ígenos somáticos "O" e até hoje foram descritos mais de 200 sorogrupos e somente dois deles podem causar cólera. As cepas epidêmicas de *V. cholerae* O1 são divididas em dois biotipos, "Clássico" e "El Tor" e estes podem ser diferenciados através da atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro, teste de Voges Proskauer, hemaglutinação de eritrócitos de galinha, sensibilidade à polimixina B (50 UI) e sensibilidade ao fago IV ou ao fago V (KAY *et al.*, 1994).

Em 1978 foi estabelecido, no estado de São Paulo, um programa de vigilância epidemiológica da cólera em parceria com a OMS e a CETESB. Durante o período de 1981 a 1983 foram analisadas 288 amostras de água do mar no litoral de São Paulo e a presença de *V. cholerae* não-O1 foi verificada em 52,8% das amostras coletadas em Santos; 45,8% em São Vicente; 30,5% no Guarujá e 38,9% em Bertioga. A sua concentração variou de <0,03 a >= 24/100 mL de água de mar. *V. cholerae* O1 não toxigênico foi detectado em 0,3% do total de amostras. A presença de *V. cholerae* O1 não toxigênico e *V. cholerae* não-O1, no meio aquático marinho da região costeira de São Paulo, foi demonstrada e pôde-se afirmar que a bactéria *V. cholerae* é um microrganismo autóctone do ecossistema marinho, desde 1981, sem ocasionar surtos de cólera e/ou gastroenterites (MARTINS, 1988). Pesquisas nas águas do mar de Sepetiba RJ, também foram realizadas (RODRIGUES, 1981). Entretanto, programas de vigilância ambiental, sanitária e epidemiológica foram estabelecidos para evitar o surgimento de casos de cólera no país.

Na América Latina houve dois surtos grandes de cólera, em 1991 na Costa Peruana e, em 1999, no Porto de Paranaguá-PR, e *V. cholerae* O1 toxigênico exótico, invasor, poderia ter sido o responsável pelo surgimento das epidemias.

Uma das teorias que sustenta a chegada da cepa patogênica ao continente latino-americano é a possibilidade de ter sido transportada através da água de lastro de navios vindos de regiões endêmicas. A gerência de portos, aeroportos e fronteiras da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2001, preocupada com o fato promoveu a pesquisa intitulada: "Estudo exploratório para a identificação e caracterização de espécies patogênicas em águas de lastro em portos selecionados no Brasil". Após a análise de 105 amostras de água de lastro, sete amostras transportavam *V. cholerae* O1 e duas delas continham *V. cholerae* O1 toxigênico, mostrando o risco de invasão dos ambientes portuários e a possível ocorrência de epidemias (AGÊNCIA BRASIL, 2002; SOUZA *et al.*, 2003).

Fatores associados à virulência foram pesquisados em isolados brasileiros de *V. cholerae* O1 e não-O1, do ambiente marinho, e comparado com cepas clínicas epidêmicas (RIVERA *et al.*, 1995a; 1995b; IPARRAGUIRRE, 1997; RIVERA *et al.*, 2001; VITAL BRAZIL *et al.*, 2002). Metodologias de biologia molecular foram desenvolvidas para serem aplicadas em programas de vigilância epidemiológica da cólera, como a diferenciação de cepas patogênicas e não patogênicas utilizando o método ERIC-PCR (RIVERA *et al.*, 1995b), a contagem de *V. cholerae* pelo método de hibridação de colônias (CHUN *et al.*, 2001), a metodologia para extração do DNA de ecossistemas aquáticos com posterior detecção da espécie de *V. cholerae*,

a determinação do sorogrupo O1/O139 e para os fatores associados à virulência (toxina colérica e toxina co-reguladora do pilus) por multiplex PCR (RIVERA *et al.*, 2003). Esta última metodologia foi aplicada na contenção do surto de cólera em São Bento de Una, Recife-PE, em 2004.

4.2 *Salmonella* spp. no ecossistema marinho

Outro microrganismo presente nas águas marinhas é a *Salmonella* spp., que tem uma grande importância do ponto de vista de saúde pública, pois este microrganismo pode indicar a presença de contaminação da água por esgotos ou fezes de pássaros e animais de sangue quente. Entretanto, novas espécies estão sendo introduzidas no ecossistema marinho.

A importância da pesquisa de salmonelas de origem animal, em esgotos e águas poluídas, só foi considerada a partir de 1941. Antes, todas as pesquisas eram orientadas para a detecção de *S. typhi* e *S. paratyphi*, ou seja, para salmonelas de origem humana, causadoras da febre tifóide e paratifóide.

Em São Paulo, em razão da grande importância da presença de *Salmonella* spp. em ecossistemas aquáticos marinhos, do ponto de vista de saúde pública, trabalhos foram realizados para verificar a prevalência de seus sorotipos e analisar sua variação sazonal. No período de novembro de 1974 a dezembro de 1977, foram analisadas amostras de água de praias e estuários das regiões de São Vicente, Santos, Bertioga e Guarujá. Das 412 amostras, 51,7% foram positivas para *Salmonella*. Os sorotipos predominantes foram: *S. anatum*, *S. binza*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. miami*, *S. oslo*, *S. pomona*, *S. saphra*, *S. typhimurium*. Os grupos sorológicos predominantes variavam de acordo com a poluição fecal de esgotos (MARTINS, 1979). Estudos recentes no laboratório de Microbiologia Ambiental do ICB-USP mostraram a presença de *Salmonella* spp. em 20% das amostras de água do mar e em 25% de amostras de bivalves, coletadas em regiões costeiras do Brasil, e os sorogrupos encontrados mais freqüentes foram B, C2-C3 e D1 (NUNES, 2004).

Apesar das várias pesquisas destes microrganismos (*V. cholerae* e *Salmonella* spp.), mais estudos deveriam ser realizados em epidemiologia molecular para estabelecer a origem e patogenicidade dos isolados. Assim, estudos evolutivos deveriam ser realizados para definir quais são as espécies nativas do ecossistema aquático marinho.

5. Biotecnologia e o ecossistema marinho

"Recursos do mar são considerados todos aqueles recursos vivos e não vivos que se encontram na coluna d'água, no solo e subsolo marinhos, bem como nas áreas costeiras adjacentes, cuja exploração sustentável é relevante sob os pontos de vista econômico, social e ecológico"

O oceano é um sistema complexo, e como tal deve ser entendido e estudado. A aplicação correta deste conceito depende, fundamentalmente, de que se tenha o conhecimento dos elementos que compõem os diversos ecossistemas de forma integrada e global, assim como das relações antrópicas que os modificam.

O mar é fonte de alimento, de metais, e energia alternativa como petróleo e gás, e é usado para o transporte de mercadorias no comércio globalizado, sendo que a sua diversidade biológica deve ser preservada.

O Brasil representa, em nível mundial, um dos quatro pólos potenciais de biodiversidade e isto significa uma fonte de recursos que deve ser aplicada na biotecnologia nas áreas de biosíntese, bioconversão e biorremediação.

O ambiente marinho é uma rica fonte tanto em diversidade biológica como de compostos químicos. Essa diversidade possibilita a descoberta de importantes produtos que são usados, atualmente, na indústria farmacêutica e de cosméticos, na produção de suplementos nutricionais e enzimas. Os oceanos representam, então, uma fonte virtualmente não explorada para a descoberta de novos compostos com atividades extremamente úteis, em vários setores das indústrias de biotecnologia. Microrganismos autóctones do ambiente marinho podem ser utilizados em uma ampla variedade de processos, e microrganismos modificados geneticamente podem produzir produtos úteis e essenciais para a população (COLWELL, 1997).

Nas últimas décadas, com o aparecimento de novas doenças e de microrganismos resistentes aos medicamentos já existentes, houve um grande interesse pela busca de novos produtos bioativos naturais e, com isso, viu-se no ambiente marinho um campo bastante atrativo e pouco explorado do ponto de vista biotecnológico e microbiológico (KELECOM, 1999).

A busca crescente por novos produtos provenientes de organismos marinhos resultou no isolamento de aproximadamente 10.000 metabólitos, dos quais grande parte apresenta importantes propriedades farmacológicas (FUSETANI, 2000). Um significante número de bioproductos está sendo identificado a partir de microrganismos heterotróficos marinhos isolados de sedimentos costeiros (FENICAL, 1993; DAVIDSON, 1995). Ainda, verificou-se que alguns bioproductos que foram isolados originalmente de macrorganismos, como esponjas, estão, na realidade, localizados em associados microbianos (BEWLEY *et al.*, 1996).

A engenharia genética aplicada e a aquicultura são as maiores oportunidades para o universo

6. Bactérias quitinolíticas

No ecossistema marinho, a quitina é o mais abundante polímero biodegradável e é o maior constituinte do exoesqueleto dos artrópodes, podendo ainda ser encontrada na parede celular de fungos, carapaças de zooplâncton marinho e algas verdes (GOODAY, 1990a). As bactérias quitinolíticas têm um importante papel na degradação e utilização de quitina, que é uma valiosa fonte de carbono e nitrogênio em ambientes marinhos (TAKAHASHI *et al.*, 1993). Se as formas insolúveis de quitina, liberadas nos oceanos, não retornarem ao ecossistema em formas biologicamente utilizáveis, o

ambiente marinho poderá ter sua reserva de carbono e nitrogênio totalmente esgotada em um curto espaço de tempo (YU *et al.*, 1991), visto que esses dois compostos são geralmente limitados nesse ambiente (GOODAY, 1990a).

A produção anual de quitina no oceano é estimada em 10^9 até 10^{11} toneladas métricas. A capacidade para degradar quitina está difundida entre diversos grupos taxonômicos de procariotos incluindo, *Vibrios*, *Photobacterium* spp., bactérias entéricas, *Actinomycetes*, *Clostridium*, (GOODAY, 1990b) e arqueobactérias (HUBER *et al.*, 1995).

Portanto, o controle da qualidade do ecossistema marinho deve ser constante na área destinada aos banhistas e também nas áreas portuárias, pois quando estas estão poluídas e são utilizadas como água de lastro de navios de carga podem disseminar para outros locais espécies exóticas e/ou patogênicas causando importante desequilíbrio, tanto no ambiente quanto na higidez do homem e animais.

Referências

- ABREU, P.C.; RORIG, L.R.; GARCIA, V.; ODEBRECHT, C.; BIDDANDA, B. Decoupling between bacteria and the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* at Cassino Beach, Brazil. *Aquat. Microb. Ecol.*, v.32, p.219-228, 2003.
- AGÊNCIA BRASIL. 2002. ANVISA prepara barreira sanitária contra espécies marinhas patogênicas. Disponível em: <http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia_310502_2.htm> [08/03/2005].
- ALLSOPP, D.; COLWELL, R.R.; HAWKSWORTH, D.L. **Microbial diversity and ecosystem function**. CAB International, Wallingford, U.K. 1995.
- ALMEIDA, B.C.; PAPASIDERO, A.; MARKMAN, C.; NUNES, S.L.; RIVERA, I.N.G. Determinação da biomassa bacteriana em ambiente aquático portuário através da contagem em placas e da microscopia pela coloração com DAPI. **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Santos, SP, 2005.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, p.143-169, 1995.
- ANDRADE, L.; GONZALEZ, A.M.; ARAUJO, F.V.; PARANHOS, R. Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. *Journal of Microbiological Methods*, v.55, p.841-850, 2004.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: fundamentals and applications**. Benjamin/Cummings publ. 3^{ed}. p.246-285, 1993.
- BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORAKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The Prokaryotes**. Springer-Verlag, New York, 1992.
- BEWLEY, C.A.; HOLLAND, N.D.; FAULKNER, D.J. Two classes of metabolites from *Theonella swinhonis* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, v.52, p.716-722, 1996.
- BORNEMA, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.2647-2653, 1997.
- BOWDEN, W.B. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.33, p.1229-1232, 1977.
- BRASIL. “Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro II (PNGC II)”. Comissão Interministerial para os recursos do Mar. Brasília, 1997.
- BRITSCHGI, T.B.; GIOVANNONI, S.J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.1707-1713, 1991.
- CAMPBELL, R. The structure and dynamics of microbial populations in water. Vol.5. *Microbial Ecology*. In: WILKINSON, J.F. (Ed.). **Basic Microbiology**. Blackwell Scientific Publications, London. p.106-146. 1983.
- CARVALHO, W.F.C. 2000. **Produção bacteriana e fitoplancônica da região de ressurgência de Arraial do Cabo**. RJ. Tese, UFF, Junho.
- CASES, I.; LORENZO, V. The grammar of (micro)biological diversity. *Environmental Microbiology*, v.4, n.11, p.623-627, 2002.

- CÉSAR, D.E.; ABREU, P.C. Ecology of aquatic microrganisms in Southern Brazil: state of art. In: FARIA, B.M.; FARJALLA, V.F.; ESTEVES, F.A. (Ed.). **Aquatic Microbial Ecology in Brasil**. Oecologia Brasiliensis. p.153-172, 2001.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2004. **Relatório das águas litorâneas do Estado de São Paulo: balneabilidade das praias 2003**. São Paulo.
- CHIANG, S.L.; MEKALANOS, J.J. Horizontal gene transfer in the mergence of virulent *Vibrio cholerae*. In: ROSENBERG, E. (Ed.). **Microbial ecology and infectious disease**. ASM Press, Washington, D.C. p.156-169, 1999.
- CHOWDHURY, N.R.; HUQ, A.; XU, B.; MADEIRA, F.J.; COLWELL, R.R. Effect of allum on free living and copepods associated *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3323-3326, 1997.
- CHUN, J.; RIVERA, J.N.G.; COLWELL, R.R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. **Methods in Molecular Biology**, v.179, p.171-178, 2001.
- COLWELL, R.R.; EPSTEIN, P.R.; GUBLER, D.; MAYNARD, N.; MCMICHAEL, A.J.; PATZ, J.A.; SACK, R.B.; SHOPE, R. Climate change and human health. **Science**, v.279, p.963, 1998.
- COLWELL, R.R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.18, p.302-307, 1997.
- COLWELL, R.R. Microbial diversity-global aspects. In: COLWELL, R.R.; SIMIDU, U.; OHWADA, K. (Ed.). **Microbial diversity in time and space**. Plenum Press, New York, N.Y. p.1-11, 1996.
- COLWELL, R.R.; TAMPLIN, M.L.; BRAYTON, P.R.; GAUZENS, A.L.; TALL, B.D.; HERRINGTON, D.; LEVINE, M.M.; HALLS, S.; HUQ, A.; SACK, D.A. Environmental aspects of *Vibrio cholerae* in transmission of cholera. In: SACK, R.B. & ZINNAKA, Y. (Ed.). **Advances in research on cholera and related diarrheas**. Tokyo: KTK Scientific., p.327-343, 1990.
- COLWELL, R.R.; GRIMES, J. Semantics and strategies. In: COLWELL, R.R.; GRIMES, D.J. **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.1-6, 2000.
- COLWELL, R.R.; HUQ, A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. Washington D.C. American Society for Microbiology. p.117-133, 1994.
- COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Community composition of marine Bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5116-5122, 2000.
- DALEY, R.J. Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: uses, limitations and comparative accuracy. In: COSTERTON, J.W.; COLWELL, R.R. (Ed.). **Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology**. ASTM STP 605. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1979. p.29-45.
- DAVIDSON, B.S. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. **Current Opinions in Biotechnology**, v.6, p.284-291, 1995.
- DELONG, E.F.; FRANKS, D.G.; ALLDREDGE, A.L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached versus free-living marine bacterial assemblages. **Limnology and Oceanography**, v.38, p.924-934, 1993.
- DELONG, E.F.; WICKHAM, G.; PACE, N. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, v.243, p.1360-1363, 1989.
- FELL, J.W.; AHEARN, D.G.; MEYERS, P.S.; ROTH, F.J.Jr. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida and adjacent areas. **Limnology and Oceanography**, v.5, p.366-71, 1960.
- FENICAL, W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. **Chemical Reviews**, v.93, p.1673-1683, 1993.
- FRY, J.C. Determination of biomass. In: AUSTIN, B. (Ed.). **Methods in aquatic bacteriology**. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 1988. p.27-72.
- FUHRMAN, J.A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A.A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1294-1302, 1993.
- FUHRMAN, J. Impact of viruses on bacterial processes. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. Wiley-Liss, New York, N.Y. p.327-350, 2000.
- FUSETANI, N. Introduction. In: FUSETANI, N. (Ed.). **Drugs from the Sea**. Basel: Karger. p.1-5, 2000.
- GIOVANNONI, S.; RAPPÉ, M. Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. Wiley-Liss, New York, N.Y. 2000. p.47-84.
- GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v.345, p.60-63, 1990.

- GLÖCKNER, F.O.; AMANN, R.; ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; PSENNER, R.; TREBESIUS, K.; SCHLEIFER, K-H. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v.19, p.403-406, 1996.
- GOODAY, G.W. The ecology of chitin degradation. *Advances in Microbial Ecology*, v.11, p.387-430, 1990b.
- GOODAY, G.W. The ecology of chitin degradation. In: MARSHALL, K.C. (Ed.). *Advances in Microbial Ecology*, v.11, p.387-430. 1990a.
- GRIMES, D.; ATWELL, R.W.; BRAYTON, P.R.; PALMER, L.M.; ROLLINS, D.M.; ROSZACK, D.B.; SINGLETON, F.L.; TAMPLIN, M.L.; COLWELL, R.R. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiology Science*, v.3, p.324-329, 1986.
- HAECKEL, E. *Generelle Morphologie der Organismen*. 2 vols. G. Reimer, Berlin, 1866.
- HAGLER, A.N. *Ecologia e Taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro. Tese de Doutoramento. Instituto de Microbiologia, UFRJ. 1978.
- HEIDELBERG, J.F.; EISEN, J.A.; NELSON, W.C.; CLAYTON, R.A.; GWINN, M.L.; DODSON, R.J.; HAFT, D.H.; HICKEY, E.K.; PETERSON, J.D.; UMAYAM, L.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; READ, T.D.; TETTELIN, H.; RICHARDSON, D.; ERMOLAEVE, M.D.; VAMATHEVAN, J.; BASS, S.; QIN, H.; DRAGOI, I.; SELLERS, P.; MCDONALD, L.; UTTERBACK, T.; FLEISMANN, R.D.; NIERNAN, W.C.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; SMITH, H.O.; COLWELL, R.R.; MEKALANOS, J.J.; VENTER, J.C.; FRASER, C.M. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, v.406, p.477-483, 2000.
- HERBERT, R.A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. *Methods in Microbiology*, v.22, p.1-40, 1990.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; STANLEY, T.W. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 1994.
- HUBER, R.; STOHR, J.; HOHENHAUS, S.; RACHEL, S.; BURGGRAF, S.; JANNASCH, H.; STETTER, K.O. *Thermococcus chitonophagus*, a novel, chitin degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep sea hydrothermal vent environment. *Archives of Microbiology*, v.164, p.255-264, 1995.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v.180, p.4765-4774, 1998a.
- HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology*, v.180, p.366-376, 1998b.
- HUQ, A.; SMALL, E.B.; WEST, P.A.; HUQ, M.I.; RAHMAN, R.; COLWELL, R.R. Ecological relationship between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p.275-283, 1983.
- HUQ, A.; RIVERA, I.N.G.; COLWELL, R.R. Epidemiological significance of viable but nonculturable microorganisms. In: Colwell, R.R., Grimes, D.J. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Washington, D.C., ASM Press, p.301-323, 2000.
- IPARRAGUIRRE, D. *Detecção de seqüências genéticas associadas a virulência em cepas de Vibrio cholerae não O1 e não O139 isoladas de ambientes marinhos do Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. ICB. Universidade de São Paulo, 1997.
- JOHNSON, T.W.; SPARROW, F.K. *Fungi in oceans and estuaries*. Weinheim J. Cramer, 1961.
- KANEKO, T.; COLWELL, R.R. Adsorption of *V. parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Applied Microbiology*, v.29, p.269-274, 1975.
- KANEKO, T.; COLWELL, R.R. Ecology of *V. parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*, v.113, p.24-32, 1973.
- KAY, B.A.; BOPP, C.A.; WELLS, J.G. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. In: WACHSMUTH, I.K., BLAKE, P.A., OLSSVIK, O. (Ed.). *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to Global Perspectives*. ASM. Press, 1994.
- KELECOM, A. *Chemistry of Marine Natural Products: Yesterday, Today and Tomorrow*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.71, p.249-263, 1999.
- KEPNER, R.L. Jr.; PRATT, J.R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiology Review*, v.58, p.603-615, 1994.
- KIRCHMAN, D.L.; WILLIAMS, P.J. Introduction. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, Inc. EUA. p.1-11, 2000.
- KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.3614-3620, 1997.

- LUDWIG, W.; BAUER, S.H.; BAUER, M.; HELD, I.; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R.; HUBER, I.; SPRING, S.; HARTMANN, A.; SCHLEIFER, K. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**, v.153, p.181-190, 1997.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Prentice Hall, São Paulo. p.608, 2004.
- MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J.E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.A.; FEAVERS, I.M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, v.95, p.3140-3145, 1998.
- MARKMAN, C.; PAPASIDERO, A.A.S.; ALMEIDA, B.C.; UENO, P.M.; NUNES, S.L.; SOUZA, K.M.C.; MENUCCI, D.L.; SCHNEIDER, M.H.; RIVERA, I.N.G. "Microbiological Characterization and Risk Evaluation of areas in seven Brazilian Ports". **10th International Symposium on Microbial Ecology**. Cancun, México. PO - 327, 2004.
- MARTINS, M.T. **Ecologia de Vibrio cholerae no ecossistema aquático**. Tese de livre docência. São Paulo, 1988.
- MARTINS, M.T. **Salmonella no ambiente aquático: significado sanitário**. Tese de Doutorado. ICB, Universidade de São Paulo, S. Paulo, 1979.
- MATTE, G.R.; MATTE, M.H.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical region. **Journal of Food Protection**, v.57, p.870-873, 1994a.
- MATTE, G.R.; MATTE, M.H.; ZATO, M.I.Z.; SANCHEZ, P.S.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p. 281-287, 1994b.
- MESQUITA, H.S.L.; FERNANDES, A.J. Trabalho de Evento- Resumo: Estudo quantitativo da população microbiana da região de Ubatuba, SP: verão. **Simpósio sobre Oceanografia – IOUSP**. 2: São Paulo, 1991.
- MESQUITA, H.S.L. Densidade e distribuição do bacterióoplâncton nas águas de Ubatuba, SP. **Publicação especial do Instituto Oceanográfico – USP**, v.10, p.45-63, 1993.
- MEYERS, S.P.; AHEARN, D.G. Implications of yeasts and yeast-like fungi in marine processes. **Veroff. Inst. Meeresforsch Bremerhaven, Suppl.**, v.5, p.321-38, 1974.
- MORRIS JR., J.G. Non-O Group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. In: WACHSMUTH, I.K.; BLAKE, P.A.; OLSSON, O. (Ed.). **Vibrio cholerae and cholera: Molecular to Global Perspectives**. ASM, Press, 1994.
- MORRIS, E.O. Yeasts from the marine environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v.38, p.211-23, 1975.
- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Stemming the tide. Controlling introductions of nonindigenous species by ships ballast water**. National Academy Press, Washington, D.C. 141 p, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Understanding marine biodiversity**. A Research agenda for the nation. National Academy Press, Washington. D.C. 114p, 1995.
- NUNES, S.L.; SOUZA, K.M.C.; ALMEIDA, B.C.; SILVA, O.R.; MENUCCI, D.L.; RIVERA, I.N.G. Molecular characterization of *Salmonella* spp. strains isolated from Brazilian aquatic ecosystems. **Abstracts 10th International Symposium on Microbial Ecology**. Cancun, México. PO -337, 2004.
- ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Microrganismos em praias arenosas expostas: Importância, aspectos metodológicos e estado da arte para o Sul do Brasil. In: ABSALÃO, R. (Ed.). **Oecologia Brasiliensis**, v.3, p.01-18, 1997.
- OLIVEIRA, S.S.; WASIELESKY JR., W.; BALLESTER, E.C.; ABREU, P.C.O.V. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método fluorescent *in situ* hybridization (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, v.28, p.33-45, 2006.
- OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; PACE, N.R.; STAHL, D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal rRNA approach. **Annual Review Microbiology**, v.40, p.337-365, 1986.
- PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-740, 1997.
- PAULA, C.R. **Contribuição ao estudo das leveduras em praias da baixada santista**. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia, USP, 1978.
- PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the Southern area of São Paulo State (Baixada Santista), Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.14, n.2, p.136-143, 1983.

- PEDROS-ALIO, C. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*. v.14, n.6, p.257-263, 2006.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; PELCZAR, M.F. *Elements of microbiology (illustrated)*. p.698, 1981.
- RELATÓRIO PROBIO. Informe sobre as espécies exóticas invasoras. Subprojeto: **Organismos que afetam o ambiente marinho - Microrganismos**. Projeto Probio, CNPq, 2005.
- REPORT. AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY. **Marine microbial diversity: the key to earth's habitability**. Hunter-Vevera, J., Karl, D., Buckley, M. Washington. D.C. 22p, 2005.
- RIVERA, I.N.G.; MARTINS, M.T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, (UNESP), v.17, p.115-136, 1996.
- RIVERA, I.N.G. **Diagnóstico microbiológico de áreas de risco nos Portos de Belém-PA; Fortaleza-CE; Paranaguá-PR; Recife-PE; Rio Grande do Sul-RS; Santos-SP; Sepetiba-RJ**; – Relatório ANVISA/USP, São Paulo – Laboratório de Microbiologia Ambiental, 2004.
- RIVERA, I.N.G.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, R.B.; COLWELL, R.R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2421-2429, 2001.
- RIVERA, I.N.G.; LIPP, E.; GIL, A.I.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, v.5, n.7, p.599-606, 2003.
- RIVERA, I.N.G.; CHOWDHURY, M.A.R.; HUQ, R.R.; JACOBS, D.; MARTINS, M.T.; COLWELL, R.R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.2898-2904, 1995.
- RIVERA, I.N.G.; CHOWDHURY, M.A.R.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; HUQ, R.R.; COLWELL, R.R.; MARTINS, M.T. Detection of cholera (ctx) toxin and zonula occludens (zot) toxin genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.11, p.572-577, 1995.
- ROCHA, G.R.A.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.L.D.B.; PIRES-VANIN, A.M.S.; JARRE-TEICHMANN, A. Seasonal budgets of organic matter in the Ubatuba shelf system, SE, Brazil. I. Planktonic and benthic components. *Oceanologica Acta*, v.26, p.487-495, 2003.
- RODRIGUES, D.P.; HOFER, E. *Vibrios* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v.17, p.332-338, 1986.
- RODRIGUES, D.P.R. **Ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas no ecossistema água-obra da Baía de Sapetiba**. RJ, 1981.
- ROSZACK, D.B.; COLWELL, R.E. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Review*, v.51, p.365-379, 1987.
- ROSZACK, D.B.; GRIMES, D.J.; COLWELL, R.R. Viable but non recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic system. *Canadian Journal of Microbiology*, v.30, p.334-338, 1984.
- ROTH, F.J. Jr.; AHEARN, D.G.; FELL, J.W.; MEYERS, S.P.; MEYERS, S.A. Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limnology and Oceanography*, v.7, p.178-85, 1962.
- RUBIN, A. **Pesquisa de *Vibrio cholerae* na água do mar e zooplâncton na região costeira de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo**. São Paulo. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.
- SCHMIDT, T.M.; DE LONG, E.F.; PACE, N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*, v.173, p.4371-4378, 1991.
- SEVERO DE SOUZA, M.H. **Recursos do mar brasileiro: histórico, atualidades e perspectivas**. Monografia CAEPE. Escola Superior de Guerra, 1999.
- SHERR, E.; SHERR, B. Marine microbes an overview. In: KIRCHMAN, D.L. *Microbial ecology of the oceans*. Portland: Wiley-Liss; p.13-41, 2000.
- SHIKLOMANOV, I. **World water resources: a new appraisal and assessment for the 21th century**. IHP. Unesco, p.32, 1998.
- SIMARD, R.E. Yeasts as an indicator of pollution. *Marine Pollution Bulletin*, v.2, p.123-5, 1971.
- SOUZA, K.M.C.; NUNES, S.R.; MARKMAN, C.; ALBERTINI, L.S.; PAPASIDERO, A.A.S.; DANTAS, M.A.; ALMEIDA, B.C.; UENO, P.M.; MENUCCI, D.L.; FERREIRA, C.P.; SCHNEIDER, M.H.; RIVERA, I.N.G. Identificação de *Vibrio cholerae* O1 Toxigênico em Água de Lastro. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis, SC, 2003.
- STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R.G.E.; TRUPER, H.G. Proteobacteria classes nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.38, p.321-325, 1998.

- SUSINI-RIBEIRO, S.M.M. Biomass distribution of pico-nano and microplankton on the continental shelf of Abrolhos, East Brazil. **Archives of Fishing Marine Research.** v.47, p.213, 1999.
- TAKAHASHI, M.; TSUKIYAMA, T.; SUZUKI, T. Purification and some properties of chitinase produced by *Vibrio* sp. **Journal Fermentation Bioengineering.** v.75, p.457-459, 1993.
- THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Taxonomy of Vibrios. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Ed.). **The Biology of Vibrios.** ASM Press, Washington, D.C. p.29-43, 2006.
- THOMPSON, F.L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C.B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of Vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology.** v.71, p.5107-5115, 2005.
- TIEDJE, J.M. Microbial diversity: of value to whom? **ASM News.** v.60, p.524-525, 1994.
- UMBI-PD-9401.** Publication - Microbiology/Biotechnology, Center of Marine Biotechnology, University of Maryland Biotechnology Institute, UMBI, MD. 1994.
- URAKAWA, H.; RIVERA I.N.G. Aquatic environment. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Ed.). **The Biology of Vibrios.** ASM Press, Washington, D.C. p.175-189, 2006.
- VITAL BRAZIL, J.M.; ALVES, R.M.; RIVERA, I.N.G.; RODRIGUES, D.P.; KARAOLIS, D.R.; CAMPOS, L.C. Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolated in Brazil between 1991 and 1999. **FEMS Microbiology Letters.** v.215, p.15-21, 2002.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature.** v.345, p. 63-65, 1990.
- WEINER, R. The plasticity of marine bacteria: adaptations to high- and low-nutrient habitats. In: ROSENBERG, E. (Ed.). **Microbial ecology and infectious disease.** ASM Press, Washington, D.C. p.17-29, 1999.
- WOMMACK, K.E.; COLWELL, R.R. Viriplankton: viruses in aquatic ecosystems. **Microbiol. Molecular Biology Review.** v.64, n.1, p.69-114, 2000.
- XU, H.S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F.L.; ATTWELL, R.W.; GRIMES, D.J.; COLWELL, R.R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology.** v.8, p.313-323, 1982.
- YU, C.; LEE, A.M.; BASSLER, B.L.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. **Journal of Biological Chemistry.** v.266, p.24260-24267, 1991.
- ZOBELL, C.E.; FELTHAM, C.B. Preliminary studies on the distribution and characteristics of marine bacteria. **Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif. Tech. Ser.**, v.3, p.279-296, 1934.
- ZOBELL, C.E. **Marine microbiology.** Waltham: Chronica Botanica, 1946.

Transferência Horizontal de Genes de Plantas Geneticamente Modificadas: Avaliação dos Riscos para as Comunidades Microbianas

**Wellington Luiz Araújo^{1,2}, Priscilla de Barros Rossetto¹ e
Júlia Kuklinsky-Sobral¹**



Foto: I.S. Melo

I. Introdução

A transferência gênica pode ser definida como a transferência de material genético de um organismo para outro, podendo ocorrer de duas maneiras: vertical e horizontal. A transferência vertical é a transferência de DNA por descendência, isto é, dos parentais para seus descendentes por herança, sendo um processo que normalmente envolve reprodução sexual. A transferência gênica horizontal (TGH), também chamada de lateral, é a troca de material genético entre células ou genomas de espécies não relacionadas, sendo que esse DNA deve ser incorporado de maneira estável na célula receptora (BROWN, 2003).

A TGH pode ocorrer mediante 3 mecanismos: a transdução, a conjugação e a transformação. A transdução refere-se à transferência de DNA de uma célula para outra mediada por um vírus. Neste aspecto, é sabido que durante o ciclo de infecção de um bacteriófago, este pode adquirir um segmento de DNA da célula infectada e quando esse fago infectar uma segunda célula, este DNA heterólogo poderá ser introduzido no genoma da célula receptora.

Já a conjugação é a transferência direta entre células e ocorre principalmente entre bactérias, visto que estes procariontes apresentam o aparato necessário para a conjugação, na qual uma célula doadora, com genes F, passa parte ou todo o seu plasmídio, ou ainda parte do DNA cromossômico para a célula receptora. O terceiro meio pelo qual a TGH pode ocorrer é a transformação, a qual envolve a aquisição de um DNA livre no ambiente por uma célula e a expressão desse gene na célula receptora. O DNA livre ou elemento genético móvel, deve ser adquirido pela célula e integrado ao genoma de maneira estável para que a célula seja efetivamente transformada. Tanto células procarióticas como eucarióticas podem ser induzidas à transformação em laboratório. Neste capítulo será destacada a transferência gênica horizontal por transformação, visto que, se ocorrer transferência de plantas geneticamente modificadas (PGMs) para microrganismos do solo, este processo deverá ser o mais importante.

Após esses processos de transferência, ou até mesmo para que eles sejam efetivos, é necessário que o DNA adquirido seja integrado ao genoma da bactéria. Neste caso, dois mecanismos que propiciam essa integração são conhecidos: a recombinação sítio-específica e a recombinação homóloga. A recombinação sítio-específica não precisa de seqüências homólogas para ocorrer, pois pode haver um local específico que é reconhecido por enzimas que clivam o local e insere o DNA no genoma da célula receptora. Porém, o mecanismo mais comum é a recombinação homóloga, a qual necessita de seqüências homólogas flanqueando o DNA adquirido e o DNA do cromossomo da célula receptora. Há ainda a possibilidade de estabilização sem integração do gene heterólogo; para isso, o DNA deverá ser recircularizado e possuir uma

seqüência de origem de replicação (ORI) para que possa se duplicar no interior da célula receptora (BUSHMAN, 2003).

A grande adaptabilidade de procariotos aos diferentes nichos tem sido associada a sua capacidade de trocar genes por esses mecanismos específicos. Neste aspecto, a transferência de genes entre espécies filogeneticamente distantes é limitada por uma combinação de barreiras físicas, químicas e biológicas resultantes de uma incompatibilidade genética. Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis para a detecção de transferência de genes, tem sido observado que em alguns casos, genes presentes no genoma de bactérias do solo vieram provavelmente de plantas (DOOLITTLE, 1998), mostrando que esta transferência pode estar relacionada a processos evolutivos, sendo uma fonte geradora de variabilidade genética em espécies microbianas.

Diversos genomas de procariotos e eucariotos já foram completamente seqüenciados, mostrando que parte dos genes presentes nestes microrganismos foram adquiridos via TGH. Assim sendo, embora em *Rickettsia prowazekii*, a estimativa para genes provindos de eventos de transferência horizontal seja de 0%, em *Synechocystis PCC6803* esta estimativa é de 16,6%, sugerindo que parte do genoma deste microrganismo seja constituído por genes heterólogos. Em *Escherichia coli*, esse valor também é expressivo, visto que aproximadamente 12,8% do genoma desta bactéria seja proveniente de espécies não associadas filogeneticamente. Há de se considerar que esse método pode subestimar a taxa de eventos de TGH, pois seqüências adquiridas de organismos muito próximos, com composição de bases e códons semelhantes, além de eventos muito antigos de transferências gênicas podem não ter sido detectados (OCHMAN *et al.*, 2000). Estes resultados mostram que eventos de transferência horizontal não são raros entre genomas bacterianos fazendo parte do processo evolutivo de várias espécies, mas que a sua detecção pode ser difícil, sendo, portanto, a sua ocorrência subestimada em estudos.

O mesmo tipo de análise também pode ser realizado com genoma de eucariotos. Existem evidências de que eventos de TGH podem ocorrer entre domínios diferentes. Por exemplo, em *Caenorhabditis elegans*, dos 19.000 prováveis genes, 185 são putativos para aquisição via eventos de transferência horizontal com genomas bacterianos. No ser humano, dos 37.000 genes, 223 teriam vindo de procariotos por transferência horizontal (SALZBERG *et al.*, 2001). A TGH é um processo que ocorre naturalmente, sendo dessa forma um importante mecanismo gerador de variabilidade genética, a qual pode resultar, por meio da ação da seleção natural, em mudanças evolutivas.

2. Eventos que permitem a TGH no ambiente

A transformação genética é o processo pelo qual torna-se possível a transferência de genes entre espécies de reinos diferentes. A transferência de material genético entre plantas e bactérias por transformação, se ocorrer, deve ser

nos pontos de maior interação entre as plantas e os microrganismos associados a elas, onde a planta proporciona ao microrganismo uma maior taxa metabólica, e, portanto, mais propensos a apresentarem o estado de competência, isto é, aptas a adquirirem DNA exógeno. Dessa forma, estes locais devem ser os principais sítios para a ocorrência de transferência horizontal entre plantas geneticamente modificadas e a comunidade microbiana associada. Essas regiões de maior interação entre a planta e a comunidade microbiana são: *i*) a filosfera e rizoplano, onde pode haver a formação de biofilmes, e, portanto, uma rica interação; *ii*) o interior da planta, onde os microrganismos endofíticos habitam; *iii*) a rizosfera, na qual os microrganismos utilizam os exsudados da planta e células vegetais mortas; *iv*) o solo, onde ocorre a decomposição do material vegetal, e *v*) o sistema digestivo dos animais do solo, onde microrganismos celulolíticos auxiliam no processo de degradação.

Entretanto, para que ocorra a transferência horizontal via transformação natural, certas condições devem ser preenchidas, visto que para isso **a**) deve ocorrer liberação do DNA da célula doadora no ambiente, e este deve se manter disponível para a transformação natural. Essa liberação de DNA pode ocorrer no momento de lise celular por ataque de um patógeno, ou por degradação de material vegetal no solo. Neste caso a molécula de DNA pode ser degradada por nucleases ou ser adsorvida às partículas de argila, onde estará protegida do ataque de nucleases (DEMANÈCHE *et al.*, 2001), já tendo sido observado que o DNA de PGMs pode se manter de maneira estável por até dois anos após sua liberação no solo em condições de microcosmo (NIELSEN *et al.*, 1998); **b**) deve existir bactéria no local em estado de competência para receber DNA do meio externo. Esta é uma característica de cada espécie bacteriana, mas pode ser atingida em fase de falta ou de excesso de nutrientes, conforme a espécie. Esta competência bacteriana no ambiente tem sido observada em uma freqüência muito reduzida quando em solos não esterilizados, sendo nestes casos muito difícil a detecção de bactérias transformadas (SMALLA *et al.*, 2000). Para a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*, tem sido observado que a competência pode ser alcançada durante o processo de infecção da planta (BERTOLLA *et al.*, 1999); **c**) deve ocorrer entrada do DNA no interior da célula bacteriana. A entrada de quantidades altas de DNA, fita simples de DNA ou se a bactéria apresentar um sistema ineficiente de restrição, pode levar a uma maior freqüência de transformação; **d**) deve ocorrer integração do transgene no genoma da célula receptora. Neste caso, quanto maior a similaridade entre os dois DNAs, maior a possibilidade de ocorrer esta integração. Desse modo, é importante salientar que a maior parte dos transgenes utilizados na obtenção de PGMs, é proveniente de bactérias, podendo aumentar a probabilidade de ocorrer a recombinação entre o DNA proveniente da planta e o DNA da bactéria receptora. A expressão desse gene poderá resultar em efeitos para essa célula, e por consequência à população e à comunidade. Entretanto, o efeito do gene inserido pode ser benéfico ou maléfico para a bactéria, e nesse sentido este clone transformado somente será mantido no ambiente se a presença do gene lhe conferir uma vantagem adaptativa.

3. Transferência horizontal entre PGMs e microrganismos

O uso de PGMs ou transgênicas na agricultura tem estimulado debates sobre o impacto ecológico de genes como poluentes. Este debate baseia-se na hipótese de que genes podem ser transferidos para microrganismos recipientes e serem disseminados no ambiente. Os genes de resistência a antibióticos são os principais alvos desta discussão, visto que são utilizados no processo de seleção de células bacterianas e vegetais transformadas. Entretanto, em algumas plantas transgênicas, os genes de resistência a antibióticos sob o controle de promotores bacterianos, após serem utilizados no processo de seleção de transformantes, permanecem no cassete construído para a transformação. A aquisição hipotética de genes de resistência a antibióticos por comunidades bacterianas associadas às PGMs é discutida, pois não é um efeito desejável na aplicação destas plantas em larga escala devido aos problemas que podem ser gerados por bactérias resistentes a antibióticos (SMALLA *et al.*, 1997). De qualquer modo, os genes de resistência a antibióticos não codificam características desejáveis em plantas comerciais (SMALLA *et al.*, 2000) e devem ser removidos após a obtenção das plantas de interesse.

Embora as barreiras sejam grandes, há recentes estudos que mostram que a transferência de DNA de PGM para microrganismos é potencialmente possível. Os trabalhos que avaliam a ocorrência de TGH de plantas para bactérias são realizados principalmente com tabaco e batata. Os transgenes mais comuns são os genes de resistência a herbicidas, o gene da toxina do *Bacillus thuringiensis* (Bt) que confere resistência a insetos e o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina. Para estes estudos são utilizadas espécies modelo, principalmente *Acinetobacter* sp., *Ralstonia solanacearum* e *Agrobacterium* sp.

Os estudos mais recentes estão utilizando os perfis moleculares da comunidade para avaliar os efeitos de PGMs sobre diferentes populações microbianas. Neste aspecto, *Agrobacterium* é um importante organismo modelo, visto que é o exemplo clássico de transferência bactéria-planta, pois possui um sistema especializado que introduz genes bacterianos no genoma da planta hospedeira, fazendo com que a planta passe a sintetizar moléculas que serão consumidas pela bactéria. No entanto, no caminho inverso (planta-bactéria) não foi observado transferência de material genético, visto que em trabalhos com *Agrobacterium* como receptora de DNA de tabaco transgênico, não foram detectadas células transformadas, sendo atribuído esse fato à dificuldade de desenvolver o estado de competência e a dificuldade de adquirir o DNA extracelular (BROER *et al.*, 1996). Outros trabalhos com bactéria fitopatogênica foram realizados em experimentos com plantas de batata transgênica com o gene de resistência a ampicilina com promotor bacteriano. Quando *Erwinia chrysanthemi* é inoculada na planta excreta uma enzima pectinolítica e causa a lise das células da planta, deixando o DNA livre. Este DNA poderia entrar na célula bacteriana e por meio de transformação genética de células próximas ser expresso de forma estável na bactéria fitopatogênica ou outras espécies associadas. Entretanto, apesar de terem testado diversas condições, a detecção de células transformadas falhou, mostrando que nestas condições, não ocorre transformação genética de *E. chrysanthemi* ou se ocorre, este evento está abaixo do potencial de detecção da técnica utilizada (SCHLUTER *et al.*, 1995).

Há trabalhos que testam a transferência para bactérias do solo, como a bactéria do solo *Acinetobacter* spp. que faz parte de um grupo de bactérias conhecidas por desenvolver naturalmente o estado de competência, apresentando altas taxas de transformação *in vitro*, por isso mesmo, a ocorrência de TGH tem sido estudada em bactérias deste gênero, especialmente *A. calcoaceticus*. Entretanto, em experimentos com batata e beterraba contendo o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina, não foram detectados transformantes, visto que se ocorre, a freqüência estimada é de 10^{-11} *in vitro* e 10^{-16} no solo, abaixo do limite da detecção. Neste caso, as causas para uma baixa freqüência de transformação poderia ser a falta de homologia entre o transgene e o genoma da bactéria, dificultando a possibilidade de recombinação homóloga, bem como a ausência de seqüências de origem de duplicação, a qual permitiria a estabilidade de um DNA recircularizado para posterior duplicação autônoma (NIELSEN *et al.*, 1997).

Em outros estudos com clones de *Acinetobacter calcoaceticus* com este gene *nptII* inativado, o qual aumenta a possibilidade de recombinação homóloga, foram observados resultados diferentes. Nessas condições, a entrada do gene *nptII* da PGM e posterior recombinação homóloga com o gene *nptII* inativado, torna o clone desta bactéria resistente ao antibiótico. Em experimentos *in vitro*, foi observada uma freqüência de transformante de 10^{-8} com DNA purificado e de 10^{-10} com suspensão de folhas, mostrando que é possível células bacterianas serem transformadas com DNA de plantas transgênicas (NIELSEN *et al.*, 2000), entretanto, para que ocorra esta transformação em níveis possíveis de serem detectados, deve existir condição para que ocorra a recombinação homóloga entre o genoma da bactéria e o DNA da PGM.

Em outro experimento, células lisadas de *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Acinetobacter* foram utilizadas para transformar células de *Acinetobacter*. Houve transformação nessas condições mostrando que as células lisadas não interferiram no processo de transformação, podendo até mesmo auxiliar na conservação do DNA. Além disso, foi confirmado que *Acinetobacter* possui aparato para receber DNA de outras bactérias do solo, evidenciado como um gene introduzido em uma espécie que poderia se espalhar para outras espécies bacterianas (NIELSEN *et al.*, 2000).

Como no solo a análise é bastante difícil devido à falta de controle e principalmente ao fato de, provavelmente, essa transferência ocorrer a níveis abaixo da capacidade de detecção, outros modelos devem ser explorados. Neste contexto, *Ralstonia solacearum* tem duas características interessantes: é conhecida por desenvolver naturalmente o estado de competência e é patogênica. Ela desenvolve a competência enquanto está infectando a planta e é o momento no qual o DNA pode estar sendo liberado pela ação de enzimas hidrolíticas da bactéria. Este modelo tem sido utilizado com plantas transplastômicas, isso é, plantas com transgenes no genoma do cloroplasto, e que apresentam uma grande quantidade deste gene por célula vegetal. Neste contexto, *Acinetobacter* sp. foi transformada com o transgene contendo resistência ao antibiótico estreptomicina de plantas transplastômicas de tabaco coinfetadas com *Ralstonia solanacearum*. Usando linhagens com construções genéticas que facilitam a transformação devido à similaridade entre a seqüência de DNA da PGM e da bactéria receptora, foram observadas células bacterianas transformantes, evidenciando que realmente a similaridade dos genes envolvidos na

transferência é um fator determinante para a ocorrência de TGH. Neste estudo, células bacterianas transformantes foram detectadas somente em experimentos com plantas transplastômicas, sugerindo que a freqüência de transformação de PGMs cloroplastídial para as bactérias associadas seja maior devido ao maior número de cópias do transgene (KAY & SIMONET, 2002) bem como à presença de seqüências de DNA com similaridade entre as PGMs e a bactéria receptora.

A capacidade de DNA de plantas geneticamente modificada transformar células de modelos bacterianos em laboratório, associado ao fato de o DNA se conservar por longos períodos no solo e a similaridade entre os transgenes e genes bacterianos, não permite que seja descartada a real possibilidade da transferência de plantas para bactérias em condições naturais, mesmo que em freqüências muito baixas. Entretanto, tendo em vista que a maior parte dos transgenes são obtidos de espécies bacterianas do solo, estima-se que caso ocorra, o seu impacto sobre a comunidade bacteriana deverá ser baixa, visto que no solo e associado às plantas já existem bactérias com estes genes.

4. Efeito de PGMs sobre comunidades microbianas

As plantas estão em equilíbrio com os microrganismos associados a elas, fornecendo alimento e proteção para os microrganismos, enquanto que estes podem atuar aumentando a resistência da planta a fitopatógenos e outros estresses biótico e abiótico, bem como promovendo o crescimento vegetal, entre outras complexas interações. Em meio a essa rica e complexa rede de interações, os eventos de transferência horizontal poderiam ocorrer de maneira natural, mesmo que em freqüências muito baixas (van ELSAS *et al.*, 2003).

Diante desse cenário, a introdução de plantas geneticamente modificadas no ambiente levantou a hipótese de que estas plantas poderiam liberar o produto destes transgenes no ambiente alterando o equilíbrio microbiano ou mesmo a liberação destes transgenes após degradação dos tecidos vegetais poder-se-ia permitir que as bactérias associadas a essas plantas adquirissem este DNA e os expressassem de forma estável. Como a construção dos vetores de transformação utiliza de genes e promotores bacterianos, genes de resistência e genes virais, a freqüência de eventos de transferência de genes poderia ser aumentada, promovendo a inserção de novos genes nessas comunidades e nesse ecossistema (GEBHARD & SMALLA, 1998). Assim sendo, esta introdução de novos genes e/ou alelos em uma população poderia alterar a freqüência gênica, resultando em uma mudança na comunidade microbiana. Estas hipóteses levam à necessidade de se avaliar com cuidado o cultivo destas plantas no ambiente, tomando o cuidado de avaliar se ocorre impacto sobre populações microbianas, permitindo prever os riscos e o desenvolvimento de medidas mitigatórias, caso ocorra impactos significativos sobre estas comunidades.

Neste aspecto, o efeito de plantas de batata geneticamente modificada pela introdução do gene da lisozima foram avaliados sobre a comunidade microbiana. O produto deste gene, a lisozima, age diretamente sobre a parede celular de bactérias, sendo, portanto, a mudança da freqüência de bactérias, em especial *Pectobacterium carotovora*, um resultado esperado. Nesse estudo foi observado aumento das bactérias

Erwinia spp. e diminuição de *Agrobacterium* e bactérias Gram-positivas (HEUER & SMALLA, 1999). Da mesma forma, Siciliano & Germida (1999) estudaram canola transgênica com o gene de resistência ao herbicida glifosato e após estudos comparativos entre a comunidade da rizosfera e endofítica de plantas transgênicas e não transgênicas, foram observadas diferenças significativas entre estas plantas, mostrando que a mudança no genótipo da planta resultou em uma alteração na comunidade microbiana. Por outro lado, Heuer *et al.* (2002) avaliaram, por meio de métodos dependentes (FAME, BIOLOG) e independentes (DGGE) de cultivo, a comunidade bacteriana da rizosfera em diferentes períodos de desenvolvimento de plantas de batata com o gene da lisozima, e observaram que fatores ambientais como ano, solo e estação, mas não a expressão do gene da lisozima nas PGM, afetam a comunidade microbiana da rizosfera. Lottmann & Berg (2001), avaliaram também o efeito destas plantas de batata sobre a freqüência de rizobactérias antagonistas a *Erwinia* (*Pectobacterium*) *carotovora* e *Verticillium dahliae*. Foi observado que a freqüência destas rizobactérias não foi alterada pelo genótipo da planta (transgênica ou convencional), mostrando que a expressão do gene da T4 lisozima não altera a função microbiana no rizoplano de batata.

Badosa *et al.* (2004) utilizaram diferentes métodos para a verificação da transferência do gene de resistência a ampicilina, contido no milho transgênico Bt176, para bactérias isoladas de campos de cultivo e verificaram uma alta proporção de bactérias resistentes a ampicilina e uma baixa freqüência de transferência gênica horizontal, considerando o efeito do milho transgênico negligenciável. Estes resultados mostram que as barreiras naturais para que a transferência gênica horizontal entre plantas transgênicas e bactérias do ambiente podem ser ultrapassadas, apesar de detectadas em baixa freqüência. Contudo, mais estudos sobre os fatores que influenciam o estado de competência bacteriana no ambiente, a “porcentagem” de bactérias transformáveis e outros fatores necessitam ser explorados para um melhor entendimento deste mecanismo em condições ambientais. Resultado semelhante, ou seja, pouco efeito da transgenia sobre comunidades microbianas, foi observado em beterraba açucareira expressando o gene de resistência ao herbicida glufosinato (SCHMALENBERGER & TEBBE, 2003).

Estes estudos mostram que os efeitos de PGMs sobre comunidades microbianas podem ocorrer, devido não somente a expressão de um gene heterólogo, mas também à interação entre diferentes fatores como a mudança do genótipo da planta e dos tratos culturais utilizados para a PGM. Neste aspecto, estas fontes de variação poderiam interagir com alterações ambientais e fisiológicos da planta resultando em uma mudança da comunidade microbiana associada.

Outro fator importante é que a interação da PGMs com populações microbianas pode variar de acordo com o transgene introduzido na planta, visto que a expressão deste e de outros genes associados é que deve afetar a comunidade microbiana. Entretanto, não pode se esquecer que a agricultura é uma prática altamente impactante sobre o meio ambiente, afetando diretamente os microrganismos do solo, e portanto, o desenvolvimento de práticas agronômicas que visam reduzir este impacto deve ser considerado, independente da utilização ou não da tecnologia do DNA recombinante.

5. Considerações finais

A agricultura, embora necessária, é um processo que pode resultar em mudanças significativas nos nichos disponíveis, resultando em alterações nas comunidades de microrganismos, animais e plantas. Entretanto, este processo tem sido utilizado por milhares de anos para a produção de alimentos, resultando em um ambiente com características distintas daquelas observadas em áreas de mata, mas que preserva a sua funcionalidade para o desenvolvimento vegetal. Durante o cultivo agrícola, restos da planta são deixados no solo, liberando suas proteínas, bem como o seu DNA que pode ser utilizado como fonte de nutrientes por inúmeras espécies microbianas, e isso atua selecionando microrganismos que crescem sobre este substrato, sem que tenha um impacto considerável sobre a diversidade microbiana.

Da mesma forma, genes responsáveis por várias características de interesse agronômico, como resistência contra insetos, doenças fúngicas e bacterianas e outras condições de estresse têm sido selecionados por processos de melhoramento clássico e posteriormente liberados no ambiente. Novos alelos também são criados por meio de mutações e novos genes podem ser introduzidos em uma espécie por meio de cruzamentos não específicos (obtenção de híbridos interespecíficos) e, posteriormente, plantas com estes alelos/genes são liberadas sem avaliação dos riscos de transferência horizontal ou impacto sobre comunidades microbianas. Dessa forma, o momento atual indica que o receio dos impactos de plantas geneticamente modificadas no ambiente permitirá o desenvolvimento de uma atitude mais prudente em relação à liberação de novos genótipos de plantas no ambiente (geneticamente modificados ou não), permitindo o plantio somente após intenso estudo a respeito do seu impacto no ambiente.

Embora, relativamente, poucos estudos tenham sido desenvolvidos para a avaliação da ocorrência de transferência horizontal de plantas geneticamente modificadas para comunidades microbianas, deve ser destacado que *i*) embora PGMs estejam sendo cultivados em países com os Estados Unidos há mais de 15 anos, nenhuma alteração microbiana tem sido relatada devido a este cultivo ou à ocorrência de THG; *ii*) nenhum efeito mutagênico, teratogênico ou tóxico aos microrganismos, plantas e animais associados têm sido relatados; *iii*) em caso de transferência horizontal, os genes introduzidos na população microbiana devem apresentar um baixo impacto nesta comunidade, visto que, na maioria dos casos, são genes provenientes de bactérias que habitam o solo (*Bacillus thuringiensis*) ou associadas às plantas (*Agrobacterium* sp.), bem como os promotores, os quais são provenientes de cepas de vírus de plantas.

Dessa forma, acredita-se que a ampla discussão sobre os riscos do cultivo de plantas geneticamente modificadas ao ambiente seja uma forma de melhorar a avaliação dos riscos da introdução de genótipos exóticos em um ambiente, e não somente uma discussão a respeito da utilização da técnica de DNA recombinante para a obtenção de genótipos mais produtivos, os quais poderiam resultar no aumento de produtividade agrícola, com uma possível diminuição da necessidade de se aumentar a área plantada.

Referências

- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, cap.4, p.117-137, 1998.
- BADOSA, E.; MORENO, C.; MONTESINOS, E. Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, 169-178, 2004.
- BERTOLLA, F.; FROSTEGARD, A.; BRITO, B.; NESME, X.; SIMONET, P. During Infection of its Host, the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Naturally Develops a State of Competence and Exchanges Genetic Material. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.12, p.467-472, 1999.
- BERTOLLA, F.; SIMONET, P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and soil micro-organisms. **Research in Microbiology**, v.150, p.1-10, 1999.
- BERTOLLA, F.; VAN GIJSEGEM, F.; NESME, X.; SIMONET, P. Conditions for Natural Transformation of *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.12, p.467-472, 1999.
- BROER, I.; DROGE-LASER, W.; GERKE, M. Examination of the Putative Horizontal Gene Transfer from Transgenic Plants to *Agrobacteria*. In: SCHMIDT, E.R.; HANKELN, T. (Ed.). **Transgenic Organisms and Biosafety: Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA, and Expression of Transgenes**, 1996, p.67-70. Springer-Verlag: Berlin.
- BROWN, J. Ancient Horizontal Gene Transfer. **Nature Reviews-Genetics**, v.4, p.121-132, 2003.
- BUSHMAN, F. **Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences**. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003. 448p.
- CECCHERINI, M.T.; POTÉ, J.; KAY, E.; VAN, V.T.; MARÉCHAL, J.; PIETRAMELLARA, G.; NANNIPIERI, P.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.673-678, 2003.
- DE VRIES, J.; WACKERNAGEL, W. Detection of *nptII* (kanamycin resistance) gene in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. **Molecular and General Genetics**, v.257, p.606-613, 1998.
- DEMANÈCHE, S.; BERTOLLA, F.; BURET, F.; NALIN, R.; SAILLAND, A.; AURIOL, P.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3440-3444, 2001.
- DOOLITTLE, R.F. The Case of Gene Transfer between very Distantly Related Organisms. In: M. SYVANEN; C.I. KADO. (Ed.). **Horizontal Gene Transfer**. Chapman and Hall, London, United Kingdom 1998. 311p.
- GEBHARD, F.; SMALLA, K. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic sugar beet DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.1550-1554, 1998.
- HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial Phyllosphere Communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing Transgenic Variants. **FEMS Microbiology Ecology**, v.28, p.357-371, 1999.
- KAY, E.; VOGEL, T. M.; BERTOLLA, F.; NALIN, R.; SIMONET, P. In situ Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Transgenic (transplastomic) Tobacco Plants to Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3345-3351, 2002.
- KOWACHUK, G.A.; BRUINSMA, M.; VAN VEEN, J. A. Assessing Responses of Soil Microorganisms to GM Plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, n.8, p.403-410, 2003.
- LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiology Reviews**, v.58, p.1930-1939, 1994.
- LOTTMANN, J.; BERG, G. Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v.156, p.75-82, 2001.
- LOTTMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.365-377, 1999.
- NIELSEN, K.M.; BONES, A.M.; SMALLA, K.; VAN ELSAS, J.D. Horizontal Gene Transfer from Transgenic Plants to Terrestrial Bacteria – a Rare Event? **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, p.79-103, 1998.
- NIELSEN, K.M.; GEBHARD, F.; SMALLA, K.; BONES, A.M.; VAN ELSAS, J.D. Evaluation of Possible Horizontal Gene Transfer from Transgenic Plants to the Soil Bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.815-821, 1997.
- NIELSEN, K.M.; SMALLA, K.; VAN ELSAS, J.D. Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.206-212, 2000.

- NIELSEN, K.M.; VAN ELSAS, J.D.; SMALLA, K. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413(pFG4?nptII) with Transgenic Plant DNA in Soil Microcosms and Effects of Kanamycin on Selection of Transformants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1237-1242, 2000.
- OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E. A. Lateral Gene Transfer and the Nature of Bacterial Innovation. **Nature**, v.405, p.299-304, 2000.
- SALZBERG, S.L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; EISEN, J.A. Microbial Genes in the Human Genome: Lateral Transfer or Gene Loss? **Science**, v.292, p.1903-1906, 2001.
- SCHLUTER, K.; FUETTERER, J.; POTRYKUS, I. "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs if at all at an extremely low frequency. **Bio/Technology**, v.13, p.1094-1098, 1995.
- SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. Taxonomic Diversity of Bacteria Associated with the Roots of Field-Grown Transgenic *Brassica napus* cv. Quest, Compared to the Non-Transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.263-272, 1999.
- SMALLA, K.; BORIN, S.; HEUER, H.; GEBHARD, F., VAN ELSAS, J.D.; NIELSEN, K.M. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria – Are there new data to fuel the debate? In: C. FAIRBAN, G. SCOLES, A. MCHUGHEN (Ed.). Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, p.146-154, 2000.
- SMALLA, K.; BORIN, S.; HEUER, H.; GEBHARD, F., VAN ELSAS, J.D.; NIELSEN, K. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Transgenic Plants to Bacteria – Are there New Data to Fuel the Debate? In: FAIRBAN, C.; SCOLES, G.; McHUGHEN, A. (Ed.). Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms: 146-154, 2000.
- SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H.; VAN ELSAS, J.D. Natural background of bacterial antibiotic resistance genes in the environmental. In: Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants, pp. 43-57. Norwegian Biotechnology Advisory Board, Oslo, 1997.
- SOLOMON, J.M.; GROSSMAN, A.D. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. **Trends in Genetics**, v.12, p.150-155, 1996.
- SYVANEN, M.; KADO, C.I. **Horizontal Gene Transfer**. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- THOMAS, C.M.; SMALLA, K. Trawling the horizontal gene pool. **Microbiology Today**, v.27, p.24-27, 2000.
- VAN ELSAS, J.D.; TURNER, S.; BAILEY, M. J. Horizontal Gene Transfer in the Phytosphere. **New Phytologist**, v.157, p.525-537, 2003.

Índice Remissivo

Símbolos

2,4-D 203, 207, 210

A

Acidithiobacillus 55-56, 60, 69-70

Ácido

abiético 274-276

cumárico 274

ferúlico 274

graxo 159-163, 172, 177

húmico 264, 267

nítrico 502-503, 507

orgânico 574-575, 577

protocatecóico 269, 273

síringico 274

sulfúrico 491, 494, 502, 507

úrico 450-451, 453, 455

Acinetobacter 152, 157-158, 160, 172

Acridina 322

Adaptação 2, 5

Agrobacterium 633, 636-637

Agrostis tenuis 580

Agrotóxicos 378-383, 386, 389, 392, 399, 400, 403, 406

Alcanos 157-158, 161, 163-164

Álcool veratrílico 274, 307, 313-314

Algumas 502-507, 513

Alternaria 508

Alteromonas 615

Ambiente construído 478-479

Ambrosia artemisiifolia 579

Amida 381, 402

Amônia 113

Anilina 206, 210

Anilinas 265, 268, 270

Antagonista 8, 10

Antibiótico 592, 595, 597

Anticorpos monoclonais 113

Antraceno 159

Antraquinonas 322, 326, 329, 334

Aquecimento global 2, 5

Aquífero 493

Arabidopsis thaliana 577, 580

Arenito 51

Argamassa 483, 486, 489

ARISA 94

Arquéias 218, 220, 222, 227, 230, 236-237, 248, 252

Arthrobacter 268

Aspergillus 508

fumigatus 361

Atenuação natural monitorada 567

Aterros sanitários 353, 359

Atividade antimicrobiana 165, 173-174
enzimática 204, 209

Atrazina 603

Aureobasidium 508

Auxina 596

Azocorantes 322

Azospirillum 590, 596

B

β -glicosidase 314

Bacillus thuringiensis 633, 637

Bactéria

púrpura 54

quimiolitoautotrófica 507-508

quimiorganotrófica 502, 507, 512-513
verde 54

Bactérias quimioautótrofas 221

Bactérias quitinolíticas 621

Bacteriófago 630

Baleia 611

Basidiomiceto 282-283, 285, 287-290, 292-297

Basidiomicotina 305

Benomil 202, 212, 379, 387-392

Benzimidazóis 378, 386, 390, 392, 404, 407

BHC 472

Bibliotecas metagenómicas 99, 100-101

Biocatálise ambiental 194

Biocidas 509, 511, 516

Biocorrosão 502

Biodegradação 353-357, 359-360, 363-371,
550-557, 559-561, 564-567

acelerada 602

Biodeterioração 340-342, 350, 356-357, 359,
478-483, 487-488, 490-496, 503-504,
506-512, 516

Biodigestores 222-223, 234-237, 247

Biodisponibilidade 555-557, 573-574, 584

Bioestimulação 88

Biofilme 126-127, 129-137, 139-147

Biohidrometalurgia 58-60, 67, 69, 76

Biolixiviação 512

Biomassa 354-355, 380, 400

Bioprocessos 186, 189-190

Bioprospecção 84-87, 94

Biorremediação 287, 289, 292-295, 297, 549, 555-561, 564-567
 Biosfera 614
 Biosorção 74-75
 Biosurfactante 152-154, 156-161, 163-178
 Biotransformação 355, 357, 370-371
Botryosphaeria 274-275
Botrytis 508
Bradyrhizobium 590
 Branqueadores óticos 323, 325
Brassica 579-581
junccea 579-581
napus 579-580
Brevibacterium 360, 367
Burkholderia 601

C

Cádmio 73, 75
 Café 452-454, 458-460
 Cafeína 450-460
 Calcário 51
 Calcopirita 52, 59, 62-64, 66
Candida 110
 Captura de elétrons 541
 Carbendazim 202, 212, 379, 387-393
 Catecol 210
 Catecol 1,2 dioxigenase 428, 432-433, 442-443
 Celulose 304-305, 309, 314
 Chá 460
Chlorella 165
Chlorobium 54
Chromatium 54
 Chumbo 75
 Chuva ácida 54
 Cianobactérias 502-503, 506-507, 512-513
 Ciclo do enxofre 51-52
Citrus sinensis 115, 117
Cladosporium 508
 Clordane 472
 Clorotalonil 397-401
 Co-metabolismo 382, 390, 399-401
 Cobertura vegetal 380
 Cólera 618-620
 Cometabolismo 200, 206, 213-214
 Competição 89
 Compostos lipofílicos 421, 428
 Comunidades microbianas 109-110, 112, 117
 Concreto 479, 486, 489, 491-496
 Condutividade térmica 541
 Conjugação 630
 Contaminação 548, 559, 561, 565, 567
 Controle biológico 85, 89-91, 176
 Corais 611
 Corante 322-323, 325-334
 polimérico 208, 274
 Cosméticos 152, 176, 178
 Cosmídeos 96
 Cresóis 268
 Cristais de gelo 502

Crystal Violet 333

D

d-limoneno 420- 421, 423-444
 Dealogenação 471-472
 Degradação
 fotoquímica 468, 471
 química 465-466, 468
 Dehalogenação 381, 400, 402
 Derivados de petróleo 550
 Desidrocloração 360
 Desnitrificação 218, 221, 225, 238
Desulfovibrio 53
 Detector de massa 543
 Deuteromicotina 306
 DGGE 346-348, 350, 636
 Dicloroanilina 474
 Digestão anaeróbia 237
 Dióxido de carbono 2
 Dioxina 311, 524, 537
 Dismutação 465
 Ditiocarbamatos 378, 381, 393
 Diuron 537
 Diversidade 380
 DNA 630, 632-637
 Dolomito 51

E

Ecossistema marinho 611, 613, 615-616, 618-622
 Edifícios 479-480, 483, 488, 490-491
 Efeito
 biofísico 355
 bioquímico 355
 enzimático direto 355
 estufa 2-4
 Efluente 312-314
 Emulsificante 152, 155, 157, 160, 163-164, 166, 168-169, 171, 176
 Endofítico 8, 10, 11
 Enriquecimento do solo 358
 Enxofre 112
 Enzimas
 extracelulares 428, 432, 442-443
 intracelulares 428, 432-442
 ligninolíticas 295, 296
Epoxiconazol 379, 385
Ergosterol 485-486
 Esgoto 486, 491-492, 496
 Esponja 611, 616, 621
 Estrobilurinas 406-408
 Etilbenzeno 264, 266
 Etileno 596, 603
 Etilenouréia 394
 Exopolímeros 126-127, 131, 133-134, 137-139
 Exopolissacarídeos 134
 Explosivos 526, 537
 Exsudados 591-594, 596-597, 599-600

F

Fachadas pintadas 488
 Fago 630
 Fenantreno 159
 Fenol 270
 Fenol-oxidase 209
 Fentoplâncton 611
Ferroglobus placidus 270
 Filmes 359-364, 369
 Filosfera 632
 Filtração por membranas 142, 145
 FISH 94
 Fitoestabilização 578-579, 580
 Fitometalóforos 573
 Fitopatógeno 6, 10
 Fitoplâncton 611
 Fitoquelatinas 578
 Fitorremediação 565-566, 572-573, 575, 578-584, 598, 601
 Fitosideróforos 573
 Fitovolatilização 578, 580
 Flexibilidade conformacional 356
 Fluoranteno 159
 Flutriafol 383-385
 Fosfogesso 487-488
 Fosfolipídios 154, 159-160, 173, 177
 Fósforo 112
 Fosmídeos 96
 Fotoionização 541, 545
 Fotólise 468-469, 471
 Ftalocianina 323
 FTIR 358, 361, 363, 366, 369
 Fungicidas 378-380, 382-383, 385, 387, 389, 392-393, 395, 404-409

G

Gás sulfídrico 221-223
 Geomicrobiologia 50-51
 Germânio 58
 Gesso natural 487
Giberelina 596
 Glicolipídios 152, 159, 171, 177
 Glicoproteínas 305
 Glifosato 537
 Gnasse 51

H

Helianthus annus 579-580
 Hexaclorobenzeno 127
 Hexadecano 157, 160, 164, 170
 Hibridização *in situ* 109, 113, 118
 Hidrocarboneto 156-159, 161, 163, 168-170, 174, 176-177
 Hidrocarbonetos 549-557, 560-561, 563, 565-566
 Hidrofilicidade 356
 Hidrofobicidade 156-157, 169, 352, 356, 358

Hidrolases 262, 270
 Hidrólise biológica 355
 Hidroxilação 381, 385, 402

I

Imazaquin 274-275
 Impacto 2, 3, 5, 10
 Imunoensaios 536-539
 Incineração 353, 359
 Índice de emulsificação 168
 Intemperização 502, 505, 511-512
Iprodiona 404-406
Iprodione 202
 Isolamento 200, 202-208, 212-214
 Isopor 489
 Iturina 160, 173

L

Lacase 209, 304, 307-310, 314-315
 Lignina 304-306, 308-311, 313-315
 Lignina peroxidase 306-307, 313
 Lipofilicidade 380
 Lipolissacarídeos 157
 Lipossomas 158
 Liquens 502, 504-507
Liriodendron tulipifera 580
Listeria monocytogenes 110
 Lixiviação 56, 58-60, 63, 67-70, 76, 380, 383, 385-386, 390
 Lixo plástico 352
 Lulas 611
 Luz UV 473

M

Macromoléculas 352
 Mancozebe 393, 395-396
 Manebe 393, 395
 Mármore 51
 Massa molar média 352, 367-368
 Matéria orgânica 112
 Meio ambiente 188-189, 195
 Mercúrio 52, 72-75
 Meta clivagem 268
 Metais 572-584
 Metalaxil 402-404
Metalotetraedra 75
 Metano 2, 218, 220-223, 227, 237-238, 245-247, 249, 252
 Metanogênese 219, 222-224, 226-227, 229-230, 233, 238, 246, 248, 252
Methanobacillus omelianskii 227
Methanobacterium sp. 228, 237, 248
Methanobrevibacter sp. 228
Methanosaeta sp. 228, 234, 249
Methanosarcina sp. 228, 230, 248-249
Methanospirillum sp. 228
 Metilação 381, 382
 Metileno Blue 333

Metiram 379
 MEV 358, 360, 365-366, 369
 Micorriza 6, 10, 12, 574
 Microplâncton 611
 Microrganismos
 não cultiváveis 94
 simbiontes 12
 Microscopia confocal 91, 93
 Mineração 176
 Mineralização 200, 203, 206, 213, 355-367, 370
 Mirex 472
 Molibdênio 72
 Moluscos 611, 613
 Monitoramento 523, 525-526, 533, 540, 542
 químico 523
 Monoplâncton 611
 Monoterpenos 421-422, 424-428, 435-436, 440-442, 444
 Monumentos históricos 503-505, 509, 514, 516
 Mucilagem 593-594
 Mucor 508
 Mudança
 biosférica 2
 climática global 3, 8, 10
 global 2, 8
Mycobacterium tuberculosis 110

N

Nitrato 113-114, 221-222, 225, 241
Nitrobacter 507
 Nitrogênio 112-114
 Nylon 322-323

O

Óleo
 diesel 492-494
 essencial 420
 Organoclorados 285-286, 288-290, 293-295, 297
 Orto-clivagem 271
 Ouro 59-60, 68, 75-76
 Oxazina 322-334
 Oxidação 465, 471-474
 Oxidação biológica 355
 Óxido nitroso 2
 Ozônio 2, 4, 7, 471, 473

P

Papel kraft 310
 Paration 602
 Paraxantina 454-456, 458
 Patógeno
 biotrófico 10
 necrotrófico 10
 PCP 202
 PCR 109, 111, 112, 114, 116, 118, 345-347, 350

competitivo 113
 em tempo real 110-114, 116-118
 escorpião 110
 PE 352, 354, 359, 363-364
Pectobacterium carotovora 635
 Pedra-sabão 502, 514-515
 Peixes 611, 613, 616
Penicillium 508
 digitatum 425, 436-437
 Pentaclorofenol 263, 602
 Perfume 421-422, 425, 444
 Peroxidase 202, 209, 330, 332
 Peróxido de hidrogênio 307-309, 311, 314
 Petróleo 548-553, 557, 560-563, 565-566
Phanerochaete 202
 chrysosporium 360, 361, 365, 368
 PHB 354
 Picoplâncton 611
 Pigmentos 322-323
 Pireno 159
 Piretróides 537
 Pirita 54, 59, 62-64, 66-67
 Pirocatecase 209, 210
 Placa de Wilhelmy 166
 Plaqueamento em ágar 357
 Plasmídeos 96, 211
 Plásticos biológicos 354
 Plásticos petroquímicos 354
 Plásticos sintéticos 352, 354, 371
Pleurotus sajor-caju 427
 Podridão branca 271, 274
 Poliestireno 489
 Polímeros 352, 354-356, 358-359, 363, 366, 368, 370-371
 Polímeros biodegradáveis 353, 370
 Polímeros sintéticos 354, 358-359, 366, 368, 370
 PP 352, 354, 364-365
 Prata 60, 75
 Predação 89
 Procedimentos operacionais padrão (POP) 532
 Processo de peroxidação 355
 Procimidona 379, 404-406
 Prochloraz 379
 Propanil 602
 Propiconazol 379, 385
 Proteína vermelho-fluorescente 91
 Proteobactérias 615
 PS 352, 354, 365-366
Pseudomonas 359, 367, 590-592, 595, 597-599, 601
 aeruginosa 133, 137
 oleovorans 157
Pteris vittata 581
 Purinas 450, 451
 PVA 354, 367-368
 PVC 352-354, 357-362, 370

Q

Quartzito 514

R**Radiação**

infravermelha 3
ultravioleta-B (UV-B) 4
Ramnolipídio 152, 159, 167-168, 172, 176
RAPD 116

Reação

de adição 359
de condensação 359
hidrolítica 465-466
nucleofílica 471
Reactive Red 328
Reciclagem 353, 359, 371
Recombinação 630, 632, 634
Recursos genéticos vegetais 450
Relação C:N 6
Remazol Black 327
Resíduos de ligação 556-557
Resinas 420, 422, 427
Respiração anaeróbia 221-222, 230
Rhizobium 590, 597
Rhodopseudomonas palustris 270
RISA 94
Rizobactérias 590, 595-598, 601, 603-604
Rizofiltração 578, 580
Rizoplano 632, 636
Rizosfera 6, 12, 590-603
Rocha 50-52, 60
Rochas 502-506, 508-509, 511

S

Salmonella 618, 620
Saponina 152
Saprófita 8
Sarcina 615
Sensores 535-536, 539-540, 542
de fibras óticas 535-536, 539
Sesquiterpeno 420-421
Sideróforos 595
Silicatos 52
Síntese orgânica 193
Solo 548-549, 551, 553-558, 560-567
Spirillum 615
Streptomyces 202
Sudam I 333
Sulfeto 52-59, 61, 63-64, 66-67, 69, 73
metálico 62, 70, 73
Surfactina 152, 160-163, 165, 171, 173-174
Sustentabilidade 189-190

T

T-RFLP 94
Tecnologia enzimática 186
Tensão superficial 152-156, 158, 160-161,
166-167, 169, 174-175, 177

Teobromina 453-456, 458

Teofilina 454
Termofixo 352
Termoplástico 352
Terpenos 420-422, 425, 427-428
Teste

de zona clara 358
"in vitro" 358
TGGE 94
Thiobacillus 51, 55, 70, 486, 492, 494-495
Tintas 340-341, 343, 346, 350
Tiofanato metílico 387
Tiosulfato 55, 64
Tório 58, 68, 75
Torula 508
Trametes versicolor 330-331
Transdução 630
Transferência horizontal 631-633, 635, 637
Transferência vertical 630
Transformação 630-635
Tratamento de esgoto 76
Triazóis 378, 383-384, 407
Trichoderma 487
Tricloroetileno 601
Tridemorfe 379
Trogia buccinalis 360

U

Uraninita 67
Urânio 52, 56, 59, 67-68, 74-76
Uréia 450

V

Verticillium dahliae 636
Vibrio 615, 617-618, 622
 cholerae 616, 618
Vinclozolim 202
Vinclozolina 379, 404, 406
Vulnerabilidade 13

X

Xantina 450-451, 453-456
 desidrogenase 451, 454
Xenobióticos 590, 598-599, 603
Xenóforos 464
Xíleno 208, 264, 266
Xisto 51
Xylella fastidiosa 115

Z

Zinebe 393
Zooplâncton 611, 618, 621

Índice Autores

- Adriana de Campos, 351
Alexandre Soares Rosado, 83
Andrea C. A. Barros, 571
Aneli de Melo Barbosa, 261
Brancilene S. de Araujo, 571
Célia Maria Maganhotto de Souza Silva, 17, 377, 463
Christine Claire Gaylarde, 151
Claudete Rodrigues Paula, 609
Claudiana Paula de Souza, 609
Dácio Roberto Matheus, 281
Denise Bevilaqua, 49
Denise de Souza Saad, 339
Dirce Mithico Yamaoka-Yano, 449
Doralice de Souza Luro Balan, 321
Elba P. S. Bon, 185
Elisa Esposito, 303
Elisabeth Francisconi Fay, 377, 463
Ellen Cristine Giese, 261
Fátima Menezes Bento, 151
Flávio A. de Oliveira Camargo, 151
Irma Nelly G. Riveral, 609
Itamar Soares de Melo, 199, 463, 589
João Lúcio de Azevedo, 107, 199
José Carlos Marconato, 351
Júlia Kuklinsky-Sobral, 629
Juliana Calábria Araújo, 217
Kátia Maria Gomes Machado, 281
Lucia Regina Durrant, 419
Luiz Gustavo Covizzi, 261
Márcia A. Shirakawa, 477
Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic, 217
Marcia Pletsch, 571
Maria Alba Cincotto, 477
Maria Antonieta Ferrara, 185
Maria Aparecida de Resende, 501
Nelson Durán, 303
Oswaldo Garcia Jr., 49
Paulo Mazzafera, 449
Paulo Negrais Seabra, 547
Paulo Teixeira Lacava, 107
Priscila Maria Dellamatrice, 321
Priscilla de Barros Rossetto, 629
Raquel Ghini, 1
Raquel Silva Peixoto, 83
Regina Teresa Rosim Monteiro, 321
René P. Schneider, 125, 521
Rodrigo Gouvêa Taketani, 83
Rosana Faria Vieira, 17
Rosana Filomena Vazoller, 217
Rosângela Blotta Abakerli, 377
Sandra Mara Martins Franchetti, 351
Vanderley M. John, 477
Vera Lúcia Ramos Bononi, 281
Vera Maria Vitali, 281
Viridiana Santana Ferreira-Leitão, 185
Welington Luiz Araújo, 629

Mudanças Climáticas Globais • Impactos de Xenobióticos

- Microrganismos e Metais • Bioprospecção • PCR em Tempo Real •
 - Biofilmes • Biossurfactantes • Biocatálise •
 - Isolamento de Microrganismos • Transferência Horizontal de Genes •
- Microbiologia Aquática Marinha • Rizorremediação • Fitorremediação •
 - Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo •
 - Monitoramento Químico de Áreas Contaminadas •
 - Biodeterioração de Monumentos Históricos •
 - Biodegradação no Ambiente Construído •
- Biodegradação Anaeróbica de Compostos Aromáticos, de Organoclorados, de Corantes têxteis, de Superfícies Pintadas, de Polímeros Sintéticos, de Fungicidas, de Monoterpenos, de Cafeína, de Lignina e Degradação Abiótica de Xenobióticos