

Biodegradação de benzo(a)pireno por Fungos Filamentosos da Região Amazônica

Hilton Marcelo de Lima Souza¹, Tássio Brito de Oliveira², André Rodrigues², Lara Durães Sette², Hiléia dos Santos Barroso¹ Sandra Patrícia Zanotto³

¹Universidade do Estado do Amazonas (UEA) – Escola Superior de Ciências da Saúde – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte).

Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha – CEP 69065-170 Manaus – Amazonas - E-mail: hilton_marcelo@hotmail.com

²Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada - Av. 24-A, 1515 - 13506-900 - Rio Claro, São Paulo.

³Universidade Federal do Amazonas – Centro de Apoio Multidisciplinar, Divisão Biotecnologia Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I – CEP 69077-000 Manaus – Amazonas.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de biodegradação de benzo(a)pireno (BaP) e produção de enzimas ligninolíticas por dois fungos filamentosos isolados de sedimentos contaminados do Rio Negro, Amazonas. Para tanto, três discos (7 mm) da cultura fúngica, após 7 dias de cultivo, foram adicionados em meio líquido e incubados a 30 °C sob agitação durante 72 h. Após este período, BaP foi adicionado e os frascos foram novamente incubados durante 7 dias nas mesmas condições de cultivo. Após extração e concentração em acetato de etila, as amostras dos ensaios foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) para quantificação da biodegradação. Para análise da produção de enzimas, os ensaios foram filtrados, centrifugados e a atividade enzimática de lacase e manganês peroxidase foram avaliadas em espectrofotômetro. O fungo Perenniporia sp. S47 foi promissor, degradou 41% de BaP e apresentou maior atividade de MnP (6,15 U/L).

Palavras-chave: Fungos filamentosos, benzo(a)pireno, biodegradação, manganês peroxidase.

INTRODUÇÃO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são poluentes ambientais ubíquos, formados principalmente pela decomposição térmica de moléculas orgânicas e sua recombinação subsequente, são altamente hidrofóbicos e acumulam-se em solos e sedimentos (HARITASH; KAUSHIK, 2009). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) classificou um grupo de 16 HPAs como poluentes prioritários em estudos ambientais, dentre eles, destaca-se o benzo(a)pireno (BaP), devido a sua elevada toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (USEPA, 1983).

A contaminação e deposição de HPAs de alto peso molecular, tais como BaP, em sedimentos do rio Negro no estado do Amazonas, já vem sendo registrada na literatura (SOUZA et al., 2015). Desta forma, faz-se necessário medidas de mitigação do impacto ambiental causado por estes poluentes. A biorremediação é reconhecida como uma alternativa viável para tratamento de ambientes contaminados (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005). Dentre os micro-organismos envolvidos neste processo, os fungos destacam-se por apresentar baixa

especificidade de suas enzimas catabólicas e independência para usar poluentes como substrato, sendo seu uso viável e ainda pouco explorado em programas de biorremediação (HARMES et al., 2011). As enzimas ligninolíticas, conhecidas por degradar a lignina existente na madeira, composto similar a alguns poluentes orgânicos, têm demonstrado forte relação com a degradação de HPAs de alto peso molecular e podem ser um agente neutralizador da contaminação ambiental (SETTE et al., 2008).

Estudos sobre biodegradação de BaP são recentes no Brasil e diante da periculosidade deste xenobiótico e de seu alto poder de deposição e acúmulo no ambiente, faz-se necessário pesquisas que selecionem espécies de fungos promissoras em programas de biorremediação.

Diante desta realidade, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial de biodegradação de BaP e produção de enzimas ligninolíticas (Lacase e MnP) por dois fungos filamentosos isolados de ambientes contaminados do Rio Negro no estado do Amazonas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois fungos filamentosos mantidos na Coleção Micológica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA): *Perenniporia* sp. (S47) e um fungo não esporulante (S69), os quais foram isolados a partir de amostras de sedimentos contaminadas por HPAs e que foram pré-selecionados pela capacidade de produzir enzimas ligninolíticas (lacase e/ou MnP) na presença de BaP. A atividade de Lignina peroxidase não foi detectada nestes fungos.

Os fungos foram inoculados em meio Ágar Extrato de Malte 2% (MEA2) e incubados durante 7 dias a 28°C. Após esse período, três discos (7 mm) da cultura foram retirados da borda das colônias e transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de caldo Extrato de Malte 2% (MEB2). Os frascos foram incubados durante 72 h a 30°C e 150 rpm. Em seguida, 2 mg de benzo(a)pireno (BaP) (Sigma-Aldrich 98%) diluído em 0,5 mL de dimetilsulfóxido, foram adicionados aos ensaios, e incubados novamente durante 7 dias nas condições descritas acima.

Para os ensaios de biodegradação, o conteúdo micelial dos frascos foi triturado e homogeneizado por meio do uso do Ultra-Turrax durante 2 min com velocidade de 14.500 rpm, juntamente com 50 mL de solvente. A fase orgânica foi recolhida e a fase aquosa foi extraída novamente. As amostras foram concentradas em evaporador rotativo a vácuo até o volume de 1 mL. O experimento foi conduzido em duplicata e um grupo controle (meio líquido + BaP) também foi avaliado. O volume de 1 µL de cada amostra foi injetado em cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (CG-EM). Antes da extração, foi inserido o padrão surrogate (criseno m/z 228, 226) e na amostra concentrada foi inserido uma solução do padrão interno (PI) (pireno m/z 202, 200). Estes procedimentos são necessários para quantificação de degradação do BaP (m/z 252, 250), realizado pelo método da padronização interna.

Para avaliação das atividades de enzimas ligninolíticas na presença de BaP, os extratos fúngicos foram filtrados a vácuo, centrifugados a 7.830 rpm durante 45 min e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0 µmol de produto formado por minuto. A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbenzotiazolina (ABTS) durante 10 minutos a 420 nm, como descrito por Buswell, Cai, Chang (1995). A atividade de MnP foi determinada por oxidação de Mn²⁺ para Mn³⁺ e formação do complexo malonato Mn³⁺, que foi acompanhada

pelo aumento na absorvância a 270 nm durante 5 minutos, conforme Giardina et al. (2000). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Perenniporia* sp. (S47) degradou cerca de 41% de BaP em apenas 7 dias e apresentou atividade para as duas enzimas ligninolíticas avaliadas, destacando maior produção para MnP ($6,15 \pm 1,22$ U L⁻¹). Já o isolado S69 não demonstrou eficiência na degradação de BaP, baixa produção de MnP ($3,39 \pm 0,73$ U L⁻¹) e inexistente atividade de lacase (Tabela 1).

Tabela 1. Biodegradação de BaP e produção de enzimas ligninolíticas.

	Biodegradação (%)	Lacase	MnP (U L ⁻¹)
<i>Perenniporia</i> sp. (S47)	$41,01 \pm 1,85$	$3,70 \pm 1,27$	$6,15 \pm 1,22$
FNE* S69	$2,08 \pm 0,09$	-	$3,39 \pm 0,73$

*FNE: Fungo não esporulante.

O fungo *Perenniporia* sp. (S47) é um basidiomiceto de podridão branca da família Polyporaceae. Segundo Lee et al., (2014), os fungos da podridão branca estão diretamente envolvidos na decomposição da madeira e biodegradação de vários xenobióticos. O isolado S47 demonstrou resultado promissor na degradação de BaP na presença de extrato de malte como substrato. De acordo com Hadibarata; Kristanti (2012b), nos ensaios contendo glicose como substrato, houve degradação de 76% de BaP em um período de 30 dias pelo fungo da podridão branca *Armillaria* sp. F022. O fungo *Polyporus* sp. S133, representante da família Polyporaceae, foi capaz de degradar 73% de BaP em 30 dias (Hadibarata; Kristanti, 2012a).

A produção das enzimas ligninolíticas tem demonstrado ativa participação na degradação de HPAs. No presente trabalho as atividades de MnP e lacase foram maiores para o isolado *Perenniporia* sp. (S47) e podem estar associadas à degradação do BaP. Acevedo et al. (2011) observaram alta capacidade de degradação do BaP (75%) associada com a produção de MnP pelo fungo da podridão branca *Anthrachyllum discolor*. Steffen; Hatakka; Hofrichter, (2003) reportaram que a enzima MnP demonstrou ótima funcionalidade na degradação de BaP e outros HPAs por basidiomicetos decompositores de matéria orgânica vegetal. Hadibarata e Kristanti, (2012b) observaram que a lacase do fungo *Armillaria* sp. F022, possui papel chave na degradação de BaP. As atividades de lacase e MnP apresentadas pelo fungo *Perenniporia* sp. (S47) foram menores do que as encontradas nas literaturas acima citadas. Entretanto, a avaliação de diferentes fatores e otimização da produção destas enzimas poderão resultar em uma maior capacidade de degradação do poluente estudado. Além da lacase e MnP, outras enzimas não avaliadas neste trabalho, podem estar envolvidas na degradação do BaP, tais como algumas dioxigenases, como observado em por Hadibarata; Kristanti, (2012a), utilizando o fungo *Polyporus* sp. S133.

Considerando a habilidade dos fungos de podridão branca em degradar poluentes ambientais e os resultados obtidos no presente trabalho, é possível sugerir que o fungo da região

Amazônica, *Perenniporia* sp. (S47), seja um recurso genético promissor para aplicação biotecnológica em processos de biodegradação de HPAs.

CONCLUSÕES

Entre os dois fungos avaliados neste estudo, *Perenniporia* sp. (S47) apresentou potencial na biodegradação de BaP. Quanto a atividade das enzimas ligninolíticas, novos estudos devem ser realizados visando sua otimização e a correlação com o aumento da degradação do poluente estudado. A avaliação de outras enzimas deve ser realizada para averiguar a relação das mesmas com a eficiência na degradação de BaP.

Agências de Fomento: Capes, CNPq.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, F.; PIZZUL, L.; CASTELLO, M. P.; CUEVAS, R.; DIEZ, M. C. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracozyllum discolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, p. 212-219, 2011.
- BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula* (Lentinus) edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-88, 1995.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicas de biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.
- GIARDINA P.; PALMIERI G.; FONTANELLA B.; RIVIECCIO V.; SANNIA G. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 376, p. 171-179, 2000.
- HADIBARATA, T.; KRISTANTI, P. A. Identification of metabolites from benzo(a)pyrene oxidation by ligninolytic enzymes of *Polyporus* sp. S133. **Journal of Environmental Management**, v. 111, p. 115-119, 2012a.
- HADIBARATA, T.; KRISTANTI, P. A. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022. **Bioresource Technology**, v.107, p. 314-318, 2012b.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 1-15, 2009.
- HARMES, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature reviews: microbiology**, v.9, n. 1, p.177-191, 2011.
- LEE, H.; JANG, Y.; CHOI, Y-S.; KIM, M-J.; LEE, J.; LEE, H.; HONG, J-H.; LEE, Y. M.; KIM, G-H.; KIM, J-J. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 97, p. 56-62, 2014.
- SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; RODRIGUES, M. F. A. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. **Microbiology Australia** v. 29, p. 18-20, 2008.
- SOUZA, H. M. L.; TANICHI, S.; BÍCEGO, M. C.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, T. C. S.; BARROSO, H. S.; ZANOTTO, S. P. (no prelo). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial Sediments of the Negro River in the Amazon Region of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2015.
- STEFFEN, K. T.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. (2003). Degradation of Benzo[a]pyrene by the Litter-Decomposing Basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of Manganese Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3957-3964, 2003.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA); **Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**, Office of Research and Development: Washington D. C., 1983.