

REMOÇÃO DE TRIMETROPRIMA DE SOLUÇÕES AQUOSAS POR *Trametes* sp.

Daniele Maria Zanzarin (PIBIC/CNPq/UEM), Elidiane Andressa Rodrigues, Alex Graça Contato, Tatiane Bugnari, Rosane Marina Peralta (coorientadora) Cristina Giatti Marques de Souza (Orientador), e-mail: cgmsouza@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

Ciências Biológicas – Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: biorremediação, antibióticos, lacase.

Resumo:

O estudo avaliou o potencial de aplicação de *Trametes* sp. C3 na redução do antibiótico trimetoprima (TMP) de soluções aquosas. O fungo foi cultivado em meio Vogel contendo glicose (1%), com e sem o TMP (5mg/L) durante 8 dias. A maior atividade da lacase observada (89,8 U/L) foi produzida no oitavo dia nos cultivos com o fármaco. A redução do antibiótico após o cultivo foi avaliada por espectroscopia UV-vis com base nos espectros de absorção. No oitavo dia, a redução do TMP foi de 55,08%. O teste de inibição do crescimento bacteriano mostrou que a amostra tratada com o fungo permitiu parcialmente o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* entérica em relação ao controle contendo TMP.

Introdução

Fármacos são detectados frequentemente em efluentes das estações de tratamento de esgoto, efluentes industriais e hospitalares, águas superficiais e subterrâneas. Várias dessas substâncias, mesmo em baixas concentrações, podem causar efeitos adversos à saúde humana, animal e ao ecossistema.

Os fungos da podridão branca têm sido estudados em processos de biorremediação devido à capacidade de degradar uma variedade de compostos xenobióticos e recalcitrantes (Spadaro et al., 1992). Isso é possível devido ao seu sistema enzimático inespecífico formado pelas enzimas extracelulares ligninolíticas. Lacases não têm especificidade em relação ao substrato, podendo catalisar a oxidação de estruturas aromáticas que se assemelhem à lignina, encontradas em pesticidas, corantes e fármacos (Souza e Rosado, 2009).

O trimetoprima (TMP) é um componente do antibiótico Bactrim, comumente utilizado em infecções urinárias. Ambos são frequentemente encontrados em águas residuais sendo que o TMP é mais recalcitrante que o sulfametoxazol, mas ambos são bastante resistentes aos tratamentos

convencionais. Neste trabalho foi avaliado o potencial de um isolado de *Trametes* sp em remover o TMP do meio de cultura.

Materiais e métodos

Cultivos: Os cultivos foram realizados em frascos de 125 mL contendo 1% de glicose, 5mg/L de TMP e meio mineral (Voguel,1956). Os cultivos foram inoculados com 3 discos de micélio ($\varnothing$ 2 cm) e permaneceram em estufa a 28 °C por 8 dias. O antibiótico foi acrescentado aos cultivos no 2º dia. Cultivos sem o fármaco foram utilizados como controle. Para a interrupção, os frascos foram retirados a cada dois dias. O material foi filtrado a vácuo e a biomassa seca até peso constante. O filtrado foi mantido congelado até o uso.

Análises espectrofotométricas: A atividade da lacase foi determinada utilizando-se ABTS em pH 4,5 (Hou et al., 2004). Os açúcares redutores foram estimados pelo método do DNS (Miller, 1959). As absorbâncias foram lidas utilizando espectrofotômetro UV-visível – Shimadzu. A redução do TMP do meio foi avaliada através dos espectros de absorção na faixa de 400-200 nm. A porcentagem de remoção foi calculada tomando como base a absorbância do controle abiótico, comparada à absorbância das amostras tratadas com o fungo em 202 nm.

Teste de inibição do crescimento microbiano: O efeito inibitório das amostras foi verificado nas seguintes cepas de bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella enterica* (ATCC 13076) com base na metodologia de microdiluição em poços.

Resultados e Discussão

O fungo se desenvolveu bem nas condições testadas e os cultivos contendo o fármaco apresentaram melhor produção enzimática do que o cultivo controle. A maior produção da lacase ocorreu no 8º dia (89,8 U/L), sendo 2 vezes maior do que no controle (Figura 1). Os resultados mostram que houve indução da produção da lacase pelo TMP (Figura 1). Processo de adsorção à biomassa fúngica pode levar à redução de xenobióticos em meio aquoso, o que não era o objetivo deste estudo, mas a participação da lacase não pode ser descartada uma vez que foi produzida em maiores quantidades na presença do fármaco. Análises no espectro de absorção demonstraram uma pequena redução do TMP a partir do 4º dia de cultivo, sendo que a maior redução foi encontrada no 8º dia (Figura 2). A quantidade de TMP reduzida no oitavo dia de cultivo atingiu 55% (Tabela 1).

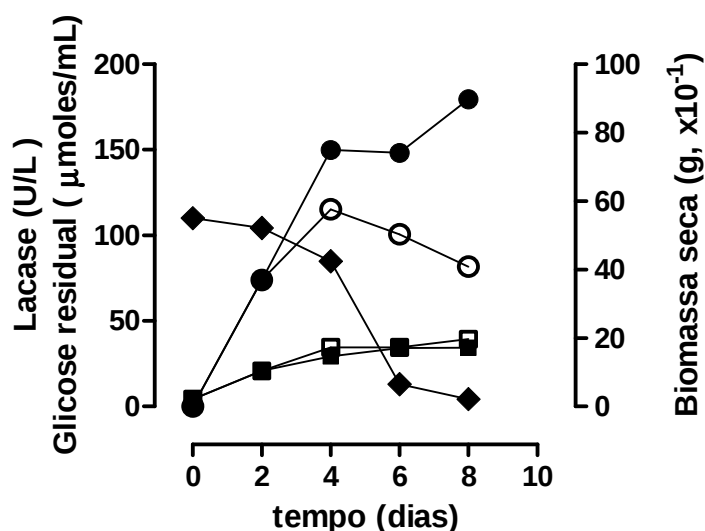


Figura 1: Atividade enzimática da lacase (○,●); açúcares redutores residuais(◆) e biomassa(■,□) nos cultivos com TMP (símbolos fechados) e cultivos sem TMP (símbolos abertos).

Quando o teste de inibição de crescimento foi realizado usando bactérias Gram-negativas, as amostras do quarto dia, não apresentaram resultados, ou seja, diminuíram o crescimento bacteriano da mesma forma que o controle contendo o TMP na sua concentração inicial do cultivo. Ao contrário deste resultado, as amostras do oitavo dia permitiram que duas das bactérias testadas (*K. pneumoniae*, *S. entérica*) crescessem, semelhante ao controle sem TMP.

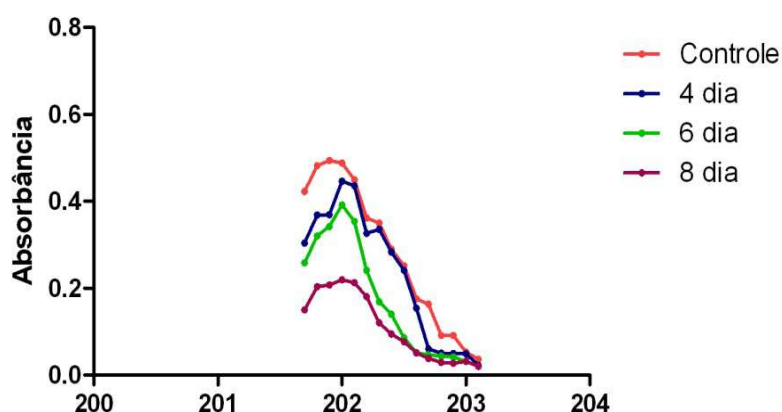


Figura 2: Espectro de absorção do TMP do controle abiótico e dos cultivos de *Trametes* sp. C3.

Tabela 1: Redução do TMP pela lacase nos cultivos de *Trametes* sp. C3

Dias	Redução de TMP (%)	TMP (mg/L)
2	0,00	5,00
4	8,51	4,57
6	19,7	4,02
8	55,08	2,25

Conclusões

Os resultados demonstraram a capacidade do isolado de *Trametes* sp. em remover o fármaco trimetoprima em meio aquoso. O fungo foi capaz de produzir a enzima lacase em maiores quantidades no meio contendo o antibiótico, o que representa uma indução da enzima. Somente a amostra do último dia permitiu o crescimento bacteriano.

Agradecimentos

PPG/UEM, CNPq.

Referências

HOU, H., ZHOU, J., WANG, J., DU, C., & YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, San Diego, v. 30, n. 11, p.1415-1419, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos Basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 2, n. 1, p. 121- 139, 2009.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V., Degradation of azo dyes by the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.8, p. 2397-2401, 1992.

VOGEL, J. H. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, Ohio, v. 13, p.42-43, 1956.