

TOLERÂNCIA AO HERBICIDA DIQUAT POR *Trametes* sp.

Paloma Ribeiro Lopes de Sá (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nislaine Mafé, Giselle Maria Maciel, Rafael Castoldi, Cristina Giatti Marques de Souza (Orientador), e-mail: ra114923@uem.br

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

Ciências Biológicas – Bioquímica dos Micro-organismos

Palavras-chave: diquat, *Trametes* sp., biorremediação

Resumo:

O uso de agrotóxicos é capaz de causar efeitos danosos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana e animal. Sua produção em massa e o seu uso generalizado tem causado preocupação ao redor do mundo. É fato que os efeitos ecológicos de seus resíduos e seu destino no meio ambiente precisam ser resolvidos com urgência. Os fungos de podridão branca secretam várias enzimas capazes de degradar a lignina como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. O complexo enzimático ligninolítico também é capaz de atuar em substâncias que possuem uma estrutura química semelhante à lignina, como corantes e pesticidas. Por isso, pode-se dizer que esses macrofungos podem ser componentes importantes de biotecnologias projetadas para remediar solo, água e ar poluídos. Este trabalho teve como objetivo estudar a tolerância do *Trametes* sp. M5 ao contato com o herbicida diquat, bem como avaliar a produção de enzimas oxidativas na presença do mesmo, a fim de contribuir com novas tecnologias nos processos de biorremediação.

Introdução

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA, afirma que o uso de agrotóxicos pode gerar efeitos danosos ao meio ambiente e também a saúde humana e de animais, portanto eles necessitam ser controlados e/ou prevenidos. Segundo este mesmo instituto, a classe de defensivos mais utilizada no Brasil é a dos herbicidas, classe destinada ao controle de ervas daninhas. O diquat é um herbicida que ganhou destaque após a proibição de um herbicida chamado paraquat, o qual foi bastante utilizado até o ano de 2019 (IBAMA). Segundo o Comitê de Ação a Resistência de Herbicidas (HRAC), o diquat é um inibidor do fotossistema I, ou seja, ele promove a formação de radicais livres e também é classificado como um herbicida de contato não seletivo. Os "fungos da podridão branca" secretam várias enzimas capazes de degradar a lignina, como a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP) e a lacase. Eles utilizam um sistema enzimático não específico que permite aos fungos degradarem, além dos polímeros aromáticos complexos naturais de lignina, polímeros aromáticos complexos que compartilham estrutura com lignina, como pesticidas e corantes.

Portanto, esses organismos podem ser componentes importantes de biotecnologias projetadas para remediar solo, água e ar poluídos (HARMS, 2011). Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância do fungo de podridão branca em contato com o herbicida diquat, a fim de fornecer informações sobre a possível forma de degradação deste herbicida com o intuito de contribuir com novas tecnologias nos processos de biorremediação de águas superficiais e solo.

Materiais e Métodos

Macromiceto: *Trametes* sp. M5 do banco de isolados do LBM/DBQ/UEM.

Manutenção: o fungo foi mantido através de repiques sucessivos, em placas de Petri contendo o meio de MEA 2%. As placas foram armazenadas em refrigerador, permanecendo por no máximo 30 dias.

Avaliação da produção de oxidases em meio sólido: após o crescimento inicial do fungo em placa de Petri, soluções de fenólicos cromogênicos foram vertidas sobre o micélio e a formação de halos coloridos indicou a presença de enzima (STALPERS, 1978). A solução para a avaliação de lacase foi preparada com 0,1 M de 1-naftol em etanol 96%. No caso da peroxidase, três soluções distintas foram preparadas em água: uma contendo 2% de H_2O_2 (controle da peroxidase), 0,5% de pirogalol (controle da lacase) e a última, 4% de peróxido de hidrogênio mais 1% de pirogalol (teste da peroxidase).

Tolerância ao pesticida no solo: um disco de micélio de 1cm de diâmetro foi inoculado em um tubo de ensaio com cerca de 10 ml de MEA 2%, sem inclinação, e incubado a 28 °C, até colonização de toda a superfície do meio. Uma coluna de solo autoclavado (70% de terra e 30% de areia) foi então colocada sobre o fungo nos tubos. O solo foi contaminado com herbicida diquat nas seguintes concentrações: 10, 30, 60 e 100 mg/L. Solo sem herbicida serviu de controle. A colonização do fungo foi observada por um período de 28 dias.

Condições de cultivo para avaliação da tolerância em solução aquosa (meio líquido): o fungo foi cultivado em meio mineral, suplementado com glicose a 2% por três dias, quando o herbicida foi acrescido nos cultivos teste a uma concentração de 10 mg/L. Três discos de micélio de aproximadamente 1 cm ($\varnothing$) foram inoculados nos frascos contendo 25 mL de meio. Os cultivos ficaram em condição estática, a 28 °C por 21 dias, e após o período de crescimento foram interrompidos por filtração a cada três dias. Os cultivos foram realizados em duplicata, assim como o controle abiótico (com e sem pesticida). A biomassa foi seca em estufa e pesada. O filtrado foi analisado por espectroscopia UV/VIS.

Análises espectrofotométricas: A atividade de lacase (EC 1.10.3.2) foi medida com ABTS em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5) e a 40 °C. A atividade de manganês peroxidase foi determinada com DMP 1mM em tampão malonato 50 mM (pH 4,5) na presença de peróxido de hidrogênio 0,5 mM e $MnSO_4$ 10mM. A quantidade de açúcar redutor foi medida pelo método do DNS.

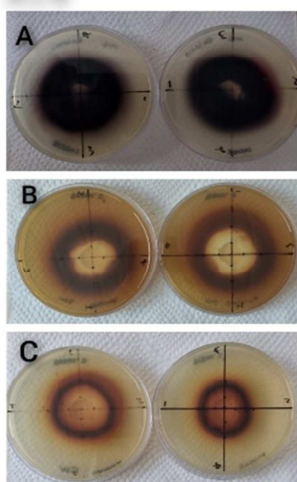
Resultados e Discussão

Atividade das oxidases em placa: *Trametes* sp. M5 apresentou halo de oxidação tanto para lacase (cor violeta) como para a peroxidase (cor marrom). Na presença de 1-naftol o halo chegou a 8,36 mm, após 72h, indicando boa produção de lacase. No mesmo tempo foram verificados a formação de um halo de 10,13 mm na presença de pirogallol sem H_2O_2 e 2,69 mm na presença de pirogallol + peróxido de hidrogênio, este último indicando a ação da peroxidase (figura 1.1).

Tolerância ao pesticida no solo: Como é possível observar na figura 1.2, o fungo foi tolerante em todas as concentrações de herbicida usadas, não havendo diferença de percepção visual no crescimento entre as concentrações avaliadas. Pode-se notar um crescimento muito parecido com o controle (solo não contaminado) com o solo de maior concentração (100 mg/L), o que mostra que o fungo foi extremamente resistente ao pesticida no solo nas condições estabelecidas.

Tolerância em solução aquosa e produção de enzimas: Em solução aquosa fica evidente a inibição do crescimento do fungo (figura 2), mesmo em uma concentração relativamente baixa, quando comparada às concentrações usadas para contaminar o solo. A elevada solubilidade do diquat em água, é uma característica que contribui para aumentar o contato do herbicida em solução aquosa com o micélio do fungo que se mostrou menos tolerante em meio aquoso. É possível notar também que após o contato do fungo com o herbicida, ocorreu no sexto dia um estímulo na produção de lacase (247,25 U/L) mesmo na presença da fonte de carbono, seguido de pequeno declínio nos dias subsequentes. O 21º dia apresentou um pico de produção com 409,31 U/L. Menores atividades de lacase foram verificadas nos cultivos sem herbicida (figura 2). A produção de manganês peroxidase foi muito baixa em ambos os cultivos. Trabalhos na literatura mostram que os herbicidas picloram e diuron induziram as lacases de *Trametes* sp. e *Ganoderma lucidum*, respectivamente (MACIEL et al., 2013; COELHO-MOREIRA et al., 2018). Outros estudos devem ser realizados para determinar se a lacase pode biodegradar o diquat.

1.1



1.2

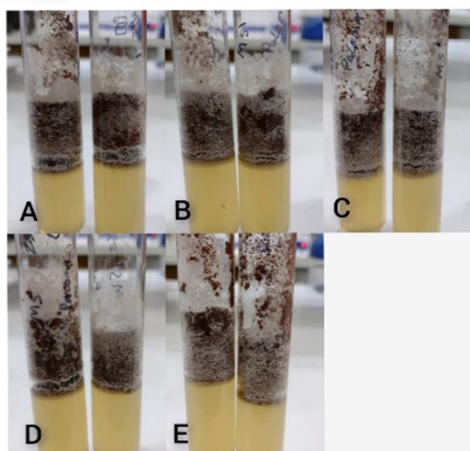


Figura 1 – 1.1: *Trametes* sp. M5 na presença de 1-naftol (A), pirogalol (B) e pirogalol + H₂O₂ (C) após 72 horas. 1.2: Crescimento após 28 dias da adição do solo não contaminado (A) e dos solos contaminados com 10 ug/L (B), 30 ug/L (C), 60 ug/L (D) e 100 ug/L (E)

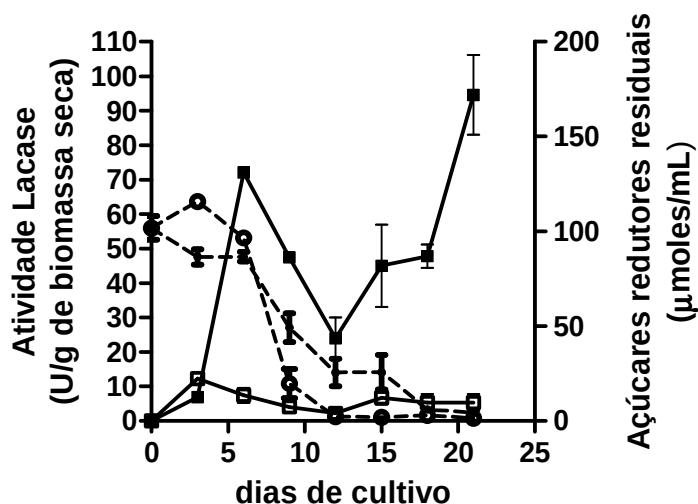


Figura 2 - Curva de crescimento de *Trametes* sp. M5 na presença do diquat (símbolos fechados) e na sua ausência (símbolos abertos). Lacase (■; □) e consumo de glicose (●; ○).

Conclusões

Os dados mostram que o isolado de *Trametes* sp. M5 foi tolerante ao herbicida diquat no solo. Já em meio líquido o pesticida foi capaz de interferir em seu crescimento e estimular a produção de lacase.

Agradecimentos

Ao CNPq, a PPG – UEM e ao Departamento de Bioquímica, nossos agradecimentos.

Referências

HARMS, Hauke; SCHLOSSER, Dietmar; WICK, Lukas Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 177-192, 2011.

MACIEL, Giselle Maria et al. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.105, p. 87- 92, 2013.

MOREIRA-COELHO, Jaqueline et al. Evaluation of diuron tolerance and biotransformation by the white-rot fungus *Ganoderma lucidum*. **Fungal Biology**, v.122, n. 6, p. 471-478, 2018.

STALPERS, Joost Augustinus et al. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. **Studies in mycology**, n. 16, 248pp, 1978.