

Análise enzimática de isolados de basidiomicetos e potencial de biorremediação do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxyacético)

João Vitor da Silva ^{1*}, Jaqueline da Silva Coelho Moreira ²

¹Graduando em Engenharia Agrônoma, Instituto Federal do Paraná, Brasil. (*Autor correspondente: joaoviitor639@gmail.com)

²Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular), Instituto Federal do Paraná, Brasil.

Histórico do Artigo: Submetido em: 23/10/2023 – Revisado em: 24/04/2024 – Aceito em: 04/06/2024

RESUMO

Os basidiomicetos são fungos filamentosos responsáveis pela degradação de matéria orgânica na natureza, processo que ocorre por meio da síntese e liberação de determinadas enzimas. Essas enzimas, além de degradarem moléculas orgânicas naturais, possuem potencial para a biorremediação de diversas moléculas químicas sintéticas, entre estas, as presentes em efluentes liberados pela indústria têxtil, farmacêutica ou em resíduos de agrotóxicos, como o herbicida 2,4-D, amplamente utilizado na agricultura. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo primário avaliar o potencial de produção de fenoloxidasas, lipases e celulases por cinco basidiomicetos (FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5) coletados no município de Ivaiporã - PR, assim detectando possíveis usos biotecnológicos dessas cepas na biodegradação de poluentes ambientais e em outros processos biotecnológicos. Após as análises de produção enzimática, as cepas isoladas foram submetidas a um teste de tolerância ao 2,4-D nas proporções de 3 e 5 g L⁻¹ do equivalente ácido do herbicida. Com exceção do isolado FB4, que não apresentou atividade de fenoloxidasas, as demais cepas foram capazes de liberar fenoloxidasas, lipases e celulases nas condições de cultivo impostas. Os isolados FB4 e FB5 destacaram-se na produção de celulases, enquanto a cepa FB3 foi responsável pela maior ação lipolítica. Nenhum dos fungos demonstrou tolerância ao 2,4-D na proporção de 5 g L⁻¹, enquanto que a cepa FB1 foi tolerante à proporção de 3 g L⁻¹ do herbicida. Os resultados obtidos representam um ponto inicial importante para estudos da aplicação desses fungos em processos de biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-Chave: Fungos, Basidiomicetos, Enzimas, Biotecnologia, Biorremediação.

Enzymatic analysis of basidiomycete isolates and bioremediation potential of the herbicide 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

ABSTRACT

Basidiomycetes are filamentous fungi responsible for the degradation of organic matter in nature, a process that occurs through the synthesis and release of certain enzymes. These enzymes, in addition to degrading natural organic molecules, have the potential for the bioremediation of several synthetic chemical molecules, including those present in effluents released by the textile and pharmaceutical industries or in pesticide residues, such as the herbicide 2,4-D, widely used in agriculture. In this context, the present study had as its primary objective to evaluate the production potential of phenol-oxidases, lipases and cellulases by five basidiomycetes (FB1, FB2, FB3, FB4 and FB5) collected in the municipality of Ivaiporã - PR, thus detecting possible biotechnological uses of these strains in the biodegradation of environmental pollutants and other biotechnological processes. After enzyme production analyses, the isolated strains were submitted to a 2,4-D tolerance test in the proportions of 3 and 5 g L⁻¹ of the acid equivalent of the herbicide. Except for isolate FB4, which did not show phenol-oxidative activity, the other strains were able to release phenol-oxidases, lipases and cellulases under the imposed culture conditions. The FB4 and FB5 isolates stood out in cellulase production, while the FB3 strain was responsible for the greater lipolytic action. None of the fungi showed tolerance to 2,4-D in the proportion of 5 g L⁻¹, while only the FB1 strain was tolerant to the proportion of 3 g L⁻¹ of the herbicide.

Keywords: Fungi, Basidiomycete, Enzymes, Biotechnology, Bioremediation.

Silva, J.V., Moreira, J.S.C. (2024). Análise enzimática de isolados de basidiomicetos e potencial de biorremediação do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxyacético). *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v.12, n.2, p.88-101.



1. Introdução

A aplicação de pesticidas é uma das principais práticas responsáveis pela poluição do ambiente, fato que vem aumentando graças ao aumento populacional e consequente maior demanda por alimentos. Entre esses, o destaque fica com os herbicidas, que muitas vezes são aplicados em excesso ou de forma indevida, podendo ser retidos no solo e/ou lixiviados, contaminando mananciais de água e afetando organismos não-alvo (Chowdhury *et al.*, 2008).

O ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, sintetizado em 1941, foi o primeiro composto orgânico utilizado como herbicida seletivo para o controle de dicotiledôneas, já que espécies gramíneas, de forma geral, toleram aplicações desse composto (Oliveira-Júnior, 2011). Enquadrado como ingrediente ativo extremamente tóxico (Classe I) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o 2,4-D foi classificado como possível cancerígeno pela Organização Mundial da Saúde em 2015 (INCA, 2023). Ainda assim, os resultados de estudos sobre os efeitos cancerígenos desse herbicida sobre seres humanos são inconclusivos (Loomis *et al.*, 2015). Segundo a Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, o teor aceitável de 2,4-D na água para consumo no Brasil é de $30 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto na União Europeia esse limite é de apenas $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada pesticida e de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o total de pesticidas na água para consumo, como especificado pela Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020 sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano (Brasil, 2021; UE, 2021).

A partir dos dados coletados por meio da avaliação de amostras de água de mananciais superficiais e subterrâneos e também de água tratada em diferentes municípios do Paraná entre os anos de 2017 e 2019, foi possível notar que o 2,4-D foi um dos ingredientes ativos mais preocupantes para a qualidade da água tratada no período de avaliação, por apresentar maior quantidade de resíduos e em maiores concentrações (variando de 0,17 a 0,64% do valor máximo tolerado) que, apesar de baixas, devem ser consideradas, uma vez que os efeitos crônicos a longo prazo causados pela molécula ainda não são conhecidos (Secretaria da Saúde do Paraná, 2019). Entre 2015 e 2016, em regiões do estado de São Paulo, doses desse herbicida que excedem os valores permitidos pela legislação para a proteção da vida aquática foram detectadas em amostras de água subterrânea e superficial (CETESB, 2019). Segundo Silva *et al.* (2022), a exposição ao 2,4-D é capaz de causar efeitos letais em animais, principalmente em vertebrados aquáticos nas fases larval e adulta. A concentração de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ desse herbicida foi capaz de causar mudanças comportamentais, além de provocar lesões no epitélio branquial de peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (Oliveira, 2020). Além de animais aquáticos, a mesma concentração afetou o desenvolvimento de embriões de frangos (*Gallus gallus domesticus*) por meio de alterações morfológicas (Pinto, 2020).

Biodegradação é o processo natural de decomposição de determinadas moléculas que alguns microrganismos são capazes de realizar por meio de certos mecanismos fisiológicos. A biorremediação é um conjunto de técnicas que tira proveito de tais mecanismos para a remoção ou diminuição da quantidade de compostos tóxicos presentes no ambiente. Uma dessas técnicas é a utilização de extratos enzimáticos brutos ou parcialmente purificados, que se baseia na atividade catalítica de enzimas extracelulares, dessa forma não havendo a necessidade do desenvolvimento dos microrganismos no ambiente, vantagem importante em condições em que há ausência de nutrientes. Essa técnica é segura e econômica, sendo uma alternativa a métodos físico-químicos mais caros (Lima & Sales, 2022).

Os basidiomicetos são fungos filamentosos entre os quais se encontra o grupo dos fungos da podridão branca, responsáveis pela degradação de matéria orgânica (biopolímeros) na natureza; processo que ocorre por meio da síntese e liberação de determinadas enzimas (Boddy *et al.*, 2008). Essas enzimas, além de quebrarem moléculas orgânicas naturais, possuem potencial para a degradação de diversas moléculas químicas sintéticas (Lundell, 2010). Uma vasta gama de estudos apresenta resultados positivos quanto aplicação de fungos da podridão branca na degradação de agrotóxicos, entre os quais estão o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), o TCDD (2, 3, 7, 8-Tetraclorodibenzo-P-Dioxina), o benzo(a)pireno, as PCBs (bifenilas policloradas), o Lindano (1,2,3,4,5,6- Hexaclorociclohexano) e diversos outros xenobióticos (Aust, 1990). Os fungos da podridão

branca crescem muito facilmente em substratos economicamente viáveis, como resíduos agrícolas, por exemplo. Por conta da ampla especificidade e alto potencial oxidante das enzimas extracelulares, essas podem ser empregadas na biorremediação de vários compostos distintos, liberando compostos pouco ou nada tóxicos, sendo passíveis à degradação por outros microrganismos. O sistema enzimático extracelular, além de não necessitar de uma fase aclimação, é capaz de atuar em substratos insolúveis ou complexados ao solo, características que os tornam pouco acessíveis a ação de degradação por bactérias (Aust, 1990; Eerd, 2003).

Entre os grupos enzimáticos ligados a processos biotecnológicos estão as fenoloxidasas, lipases (EC 3.1.1.3) e celulasas (EC 3.2.1.4), utilizados na produção de detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, papéis, biosensores, cosméticos, biocombustíveis e no tratamento de efluentes (Kango *et al.*, 2019; Kunamneni *et al.*, 2008; Messias *et al.*, 2011). As fenoloxidasas são as enzimas mais ativas na degradação de organoclorados, sendo que lacases (EC 1.10.3.2) e peroxidases (EC 1.11.1.7) liberadas por basidiomicetos foram capazes de atuar na degradação do 2,4-diclorofenol, o metabólito primário proveniente da transformação do 2,4-D (Rodriguez *et al.*, 2004; Tsujiyama *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar o potencial de produção de fenoloxidasas, lipases e celulasas por basidiomicetos, bem como analisar o potencial de biorremediação fúngico em relação ao herbicida 2,4-D, dessa forma, detectando possíveis aplicações biotecnológicas desses organismos.

2. Material e Métodos

As etapas experimentais foram conduzidas no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do Instituto Federal do Paraná (IFPR) - Campus Ivaiporã. Para as análises laboratoriais, foi empregado o delineamento inteiramente casualizado (DIC).

2.1. Isolamento dos basidiomicetos

Para a formação de inóculo, foram coletadas cinco amostras de fungos basidiomicetos classificados como fungos da podridão branca, em diferentes localidades do município de Ivaiporã - Pr. A partir das amostras coletadas, recolheu-se três seguimentos do basidiocarpo de cada um dos cinco fungos. Estes passaram por uma etapa de desinfecção superficial, sendo mergulhados em álcool 70% por 30 segundos, em solução de hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos e, posteriormente, lavados com água destilada autoclavada. Em seguida, os segmentos de basidiocarpo foram depositados em placas de Petri contendo meio Ágar Dicloran Rosa Bengala (DRBC), previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos. As cepas foram catalogadas segundo os seguintes códigos: FB1, FB2, FB3, FB4 e FB5. As placas foram mantidas em local sem iluminação à temperatura ambiente até que fosse observado o desenvolvimento dos micélios.

2.2. Purificação e armazenamento das culturas

Após o período de incubação, o micélio visível de cada fungo foi repicado, de forma em que as contaminações fossem evitadas. Posteriormente, as amostras repicadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) autoclavado a 121 °C por 15 minutos, permanecendo em estufa bacteriológica à temperatura de 28 °C até o desenvolvimento do micélio. As repicagens seguiram sendo repetidas até que obtiveram-se culturas puras, que passaram a ser armazenadas à temperatura de aproximadamente 4 °C.

2.3. Seleção das cepas produtoras de enzimas

Todos os meios de cultura utilizados para a avaliação da atividade enzimática dos isolados foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121 °C por 15 minutos. Um disco micelial de aproximadamente 5

mm de diâmetro, obtido das colônias purificadas em meio BDA, foi utilizado como inóculo em cada uma das placas contendo os respectivos meios de cultura. Os testes foram realizados em triplicata para cada uma das cinco cepas isoladas anteriormente. As placas foram acomodadas em estufa bacteriológica a 28 °C, onde permaneceram por cinco dias. Após esse período, foram efetuadas medições dos diâmetros da colônia e do halo enzimático.

2.3.1. Seleção das cepas produtoras de fenoloxidasas

Para avaliar a produção de fenoloxidasas, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo composto por: 15 g L⁻¹ de ágar-ágar, 15 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de glicose (C₆H₁₂O₆). No momento do plaqueamento adicionou-se ácido gálico (C₇H₆O₅) autoclavado, à proporção de 0,5% m/V (Davidson *et al.*, 1938).

2.3.2. Seleção das cepas produtoras de lipases

Para avaliar a atividade lipolítica, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo composto por: 20 g L⁻¹ de ágar-ágar, 5 g L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl), 10 g L⁻¹ de peptona e 0,5 g L⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO₃). No momento do plaqueamento diluiu-se Tween[®] 80 (polissorbato) autoclavado, à proporção de 0,5 % m/V (Sierra, 1957).

2.3.3. Seleção das cepas produtoras de celulases

Para avaliar a produção de celulases, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultivo composto por: 20 g L⁻¹ de ágar-ágar, 10 g L⁻¹ de carboximetilcelulose (CMC), 3 g L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃), 1 g L⁻¹ de fosfato dipotássico (K₂HPO₄), 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 0,5 g L⁻¹ de cloreto de potássio (KCl). Após o período de incubação, foram vertidos 10 mL de solução corante de vermelho congo 0,1% sobre as culturas, que permaneceram por 15 minutos em repouso. Em seguida, acrescentou-se solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 M até que fossem totalmente cobertas, mantendo-as assim por 15 minutos, para que o excesso de corante fosse retirado. Em sequência à lavagem dos meios, as medições da colônia e halo enzimático foram efetuadas (Teather & Wood, 1982).

2.4. Cálculo do índice enzimático

Seguindo a metodologia proposta por Hankin e Anagnostakis (1975), a partir dos valores obtidos pelos diâmetros médios dos halos de degradação dos substratos enzimáticos, bem como das colônias, calculou-se o Índice enzimático (IE) para cada uma das cepas nos diferentes tratamentos da seguinte forma (Equação 1):

$$\text{Índice Enzimático (IE)} = \frac{\text{Diâmetro do halo enzimático}}{\text{Diâmetro do micélio da colônia}} \quad (1)$$

2.5. Análise de tolerância das cepas isoladas ao 2,4-D

Com objetivo de selecionar as cepas tolerantes ao 2,4-D, utilizou-se um meio de cultura a base de extrato de bagaço de malte a 3% contendo os seguintes componentes: 3 g L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃), 1 g L⁻¹ de fosfato dipotássico (K₂HPO₄), 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄), 0,5 g L⁻¹ de cloreto de potássio (KCl), 10 g L⁻¹ de glicose (C₆H₁₂O₆) e 15 g L⁻¹ de ágar-ágar.

Após a autoclavagem do meio a 121 °C por 15 minutos, foram adicionadas as alíquotas de 5 g L⁻¹ e de 3 g L⁻¹ do ingrediente ativo presente na solução estoque de 2,4-D, que foi previamente filtrada por membrana de filtração com poros de 0,45 µm. Além disso, para o tratamento testemunha, o mesmo meio foi preparado sem a adição de 2,4-D.

Em seguida, os meios foram plaqueados e, então, foi adicionado um disco de micélio de uma das cinco cepas aferidas ao centro de cada placa. Os três tratamentos foram realizados em triplicata, mantendo-se as placas em estufa bacteriológica a temperatura de 28 °C e realizando medições do diâmetro médio do micélio das colônias diariamente até 40 dias após a inoculação.

A taxa diária de crescimento fúngico (TDC) foi calculada para cada colônia usando a equação proposta por Venâncio *et al.* (2017) (Equação 2):

$$TDC_{ab} = \frac{D_b - D_a}{(t_b - t_a)} \quad (2)$$

Onde:

D_b= média dos três diâmetros medidos no final do ensaio;

D_a= diâmetro do disco no início do ensaio (5 mm);

t_b-t_a= intervalo de tempo de exposição (em dias).

2.6. Obtenção do extrato enzimático bruto

O extrato bruto enzimático foi obtido a partir do cultivo de amostras da cepa FB1 em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 30 g de bagaço de malte e 120 mL da solução nutritiva (3 g L⁻¹ de NaNO₃, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄ e 0,5 g L⁻¹ de KCl), para que assim fosse obtida uma umidade de 80%. Após a autoclavagem do meio a 121 °C por 15 minutos, foram inoculados quatro discos miceliais de aproximadamente 13 mm sobre o meio sólido. O frasco permaneceu em estufa bacteriológica a 28 °C, até que o micélio tomasse toda a superfície do meio. Nesse momento, interrompeu-se o cultivo por meio da adição de 100 mL de água destilada gelada. A solução foi mantida à temperatura de 4 °C por uma hora e, em seguida, foi filtrada.

2.7. Avaliação da toxicidade do 2,4-D após adição do extrato enzimático bruto

Seguindo a metodologia adaptada de Sobrero & Ronco (2004), em Erlenmeyers cobertos por papel alumínio, foram adicionados 60 mL do extrato bruto enzimático e a mesma proporção de 2,4-D utilizada nos testes de tolerância (3 g L⁻¹ do equivalente ácido). Os Erlenmeyers foram mantidos em banho-maria a 30 °C por 24 horas. Após isso, o filtrado foi subdividido e diluído em água destilada nas proporções de 10%, 20%, 50%, 80% e 100%.

Em sequência, 20 sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram posicionadas em placas de Petri contendo uma camada dupla de papel filtro saturado por 4 mL das diferentes diluições da amostra (10, 20, 50, 80 e 100%) ou água (controle). Após cinco dias em BOD à temperatura de 22 ± 2 °C e sem iluminação, as sementes germinadas (radícula > 1 mm) foram contadas e os comprimentos de radícula e hipocótilo foram medidos com auxílio de régua milimetrada. Os dados foram representados como porcentagem absoluta de germinação e crescimento relativo em comparação com o controle da seguinte forma (Equações 3 e 4):

$$\text{Germinação absoluta}(\%) = \frac{GS}{TS} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

GS = número de sementes germinadas;

TS = número de sementes totais.

$$\text{Crescimento relativo da radícula/hipocótilo(\%)} = \frac{LS}{LC} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

LS = comprimento médio da amostra;

LC = comprimento médio do controle.

2.8. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA One-Way) e as médias alcançadas foram comparadas por meio do teste Tukey a nível de significância de 5 % ($P < 0,05$). Essas análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism®.

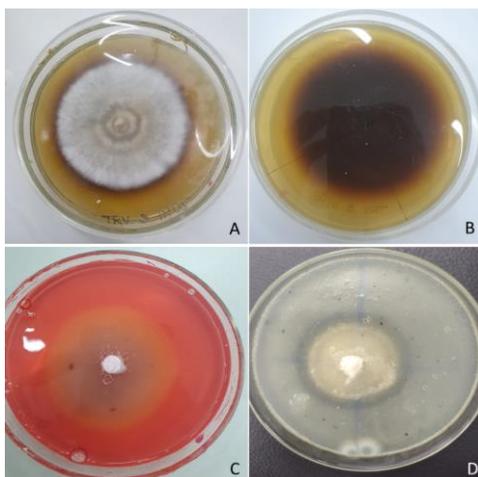
3. Resultados e Discussão

3.1. Seleção das cepas produtoras de fenol-oxidases, celulases e lipases

Pôde-se observar a produção das enzimas extracelulares em questão por meio da formação de halos enzimáticos ao redor do micélio das colônias aferidas (Figura 2).

Figura 2 – Visualização do micélio e halos enzimáticos após período de incubação. A (superfície da placa) e B (inferior da placa): cepa FB5 na presença de ácido gálico; C: cepa FB5 na presença de carboximetilcelulose; e D: cepa FB2 na presença de Tween® 80.

Figure 2 - Visualization of mycelia and enzymatic halo after the incubation period. A (plate surface) and B (plate bottom): FB5 strain in gallic acid presence; C: FB5 strain in carboxymethylcellulose presence; and D: FB2 strain in Tween® 80 presence.



Fonte: Os autores.
Source: The authors.

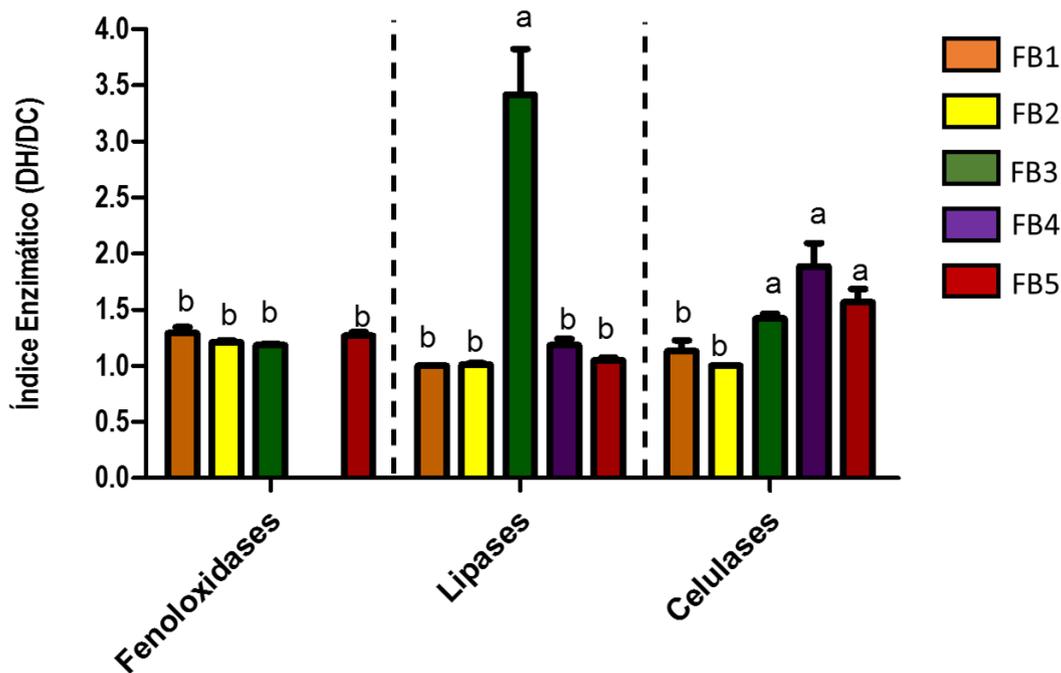
A liberação de fenoloxidases foi sinalizada por um halo marrom-escuro formado por melaninas fúngicas provenientes da oxidação do ácido gálico, fenômeno que é conhecido como “Reação de Bavendamm” (Davidson *et al.*, 1938). Quando o Tween® 80 é hidrolisado, ocorre a precipitação de um halo opaco formado por cristais de cálcio, o que possibilita a detecção da ação lipolítica dos fungos testados (Sierra, 1957).

O vermelho congo possui alta capacidade de interação com a carboximetilcelulose. Desse modo, quando a CMC é hidrolisada por celulases e o meio é submetido à lavagem com solução salina, a área onde a reação

de hidrólise ocorreu perde a coloração avermelhada característica do corante, assim destacando-se do restante do meio (Teather & Wood, 1982).

Os dados dos índices enzimáticos se encontram no gráfico a seguir (Figura 3).

Figura 3 – Produção de enzimas pelos isolados fúngicos.
Figure 3 - Enzymes production by the fungal isolates.



Fonte: Os autores.
Source: The authors.

Das 5 cepas isoladas, 4 apresentaram formação de fenoloxidasas extracelulares com coloração de halo intensa, sendo que apenas a cepa FB4 não apresentou atividade de fenoloxidasas nas condições testadas, o que tornou esse resultado bastante positivo se comparado aos de Conceição et al. (2005), que observou a formação de halo oxidativo em apenas 43% dos 257 fungos estudados, sendo que somente 9% destes apresentam coloração intensa. Os IE para essas enzimas ficaram abaixo de 1,5, o que demonstra um baixo potencial de produção de enzimas fenoloxidasas, devido a não apresentarem $IE \geq 2$ (Abe *et al.*, 2015).

Todos os isolados apresentaram atividade lipolítica com $IE < 1,5$, exceto o isolado FB3, que se destacou na produção dessas enzimas, atingindo IE significativamente maior ($IE = 3,4$). Esse valor de IE para lipases é consideravelmente maior do que os encontrados na literatura. Para fungos isolados da madeira o IE máximo foi de 2,5 (Peraza-Jiménez *et al.*, 2021) e para micro-organismos isolados de diferentes pontos de um parque estadual, o IE máximo foi de 2,96 (Luz, 2014).

As lipases são amplamente utilizadas industrialmente, como na produção de biodiesel, de alimentos e bebidas, de detergentes e nas indústrias têxtil e farmacêutica (Messias, 2011). Atualmente, as principais fontes comerciais de lipases são bactérias, leveduras e fungos ascomicetos, sendo escassos os estudos sobre a alta produção dessas enzimas por basidiomicetos (Nath & Kango, 2022). Dessa forma, a cepa FB3 apresenta um alto potencial biotecnológico ligado à sua ação lipolítica acima dos dados encontrados na literatura.

Para celulasas, todas as cepas apresentaram atividade com $IE < 2$. Os isolados FB4 e FB5 apresentaram produção de celulasas significativamente maior do que os outros isolados, sendo $IE = 1,89$ e $IE = 1,56$, respectivamente. Esses valores são similares aos encontrados por Behera *et al.* (2014) em bactérias e em fungos degradadores de madeira por Sánchez-Corzo *et al.* (2021).

3.2. Análise de tolerância das cepas isoladas ao 2,4-D

Comparativamente ao desenvolvimento das colônias em meio BDA, todos os isolados tiveram um rápido crescimento micelial em meio de cultura a base de bagaço de malte a 3% sem a adição do herbicida (testemunha), o que demonstra a eficácia dessa composição de meio (Tabela 1). A composição do meio de cultura é crucial para o crescimento e produção de biomoléculas por micro-organismos. Os resíduos agroindustriais são considerados excelentes fontes para esse propósito, uma vez que fornecem as moléculas necessárias ao desenvolvimento fúngico, como celulose, hemicelulose e lignina. Neste trabalho, a escolha do bagaço de malte foi feita com base na disponibilidade regional e no desenvolvimento efetivo do micélio das cepas estudadas. Além disso, a reutilização desse resíduo da indústria cervejeira para cultivar fungos reflete em uma redução do seu acúmulo no ambiente, contribuindo de forma efetiva para a sustentabilidade do processo.

Tabela 1 – Crescimento das cepas em meio sem adição de 2,4-D (testemunha).

Tabela 1 - Growth of strains in medium without addition of 2,4-D (control).

Cepa	Diâmetro das Colônias analisadas (cm) após período de incubação			TDC (mm dia ⁻¹)
	2 dias	3 dias	4 dias	
FB1	2,25 ± 0,03	4,77 ± 0,03	6,93 ± 0,13	1,61
FB2	2,88 ± 0,20	5,08 ± 0,14	7,00 ± 0,00	1,62
FB3	2,03 ± 0,28	4,28 ± 0,33	6,50 ± 0,26	1,5
FB4	2,63 ± 0,33	4,17 ± 0,15	5,63 ± 0,25	1,28
FB5	2,45 ± 0,05	4,93 ± 0,15	7,18 ± 0,16	1,67

Fonte: Os autores.
Source: The authors.

Quando 2,4-D foi adicionado ao meio de cultura na proporção de 5 g L⁻¹ do equivalente ácido do ingrediente ativo, nenhuma das cepas apresentou crescimento, o que aponta que essa dose excede o limite tolerado pelos fungos estudados. A ausência de desenvolvimento difere-se do que foi observado em um experimento em que o basidiomiceto *Lentinus crinitus* foi submetido a uma dose de 2,4-D semelhante (5,025 g L⁻¹ do equivalente ácido), já que o micélio da colônia demonstrou crescimento similarmente ao tratamento testemunha, divergindo-se do presente trabalho pelo modo de aplicação do herbicida, que foi adicionado à superfície do meio já solidificado (Serbent *et al.*, 2020).

Após a exposição à proporção de 3 g L⁻¹ do equivalente ácido de 2,4-D, somente a cepa FB1 apresentou crescimento, mostrando-se assim tolerante à molécula do herbicida nas condições estudadas (Tabela 2).

A molécula de 2,4-D apresenta alta solubilidade em água, portanto, tem sido detectada em amostras de água em todo o mundo, sendo considerado um risco para todos os organismos (Silva *et al.*, 2022). No estado do Paraná, o 2,4-D e a atrazina foram considerados os agrotóxicos mais preocupantes, uma vez que apresentaram a maior ocorrência de resíduos nas amostras de água e a maior concentração, sendo detectados em águas tratadas, superficiais e subterrâneas em concentrações que variaram de 0,193 µg/L à 0,387 µg/L (Secretaria da Saúde do Paraná, 2019).

Tabela 2 – Análise de tolerância das cepas isoladas ao 2,4-D na proporção de 3 g L⁻¹ do equivalente ácido.
 Table 2 – Tolerance analysis of isolated strains to 2,4-D in the proportion of 3 g L⁻¹ of the acid equivalent.

Cepa	Diâmetro das Colônias analisadas (cm) após período de incubação				TDC (mm dia ⁻¹)
	15 dias	25 dias	32 dias	40 dias	
FB1	1,48 ± 0,10	2,33 ± 0,14	2,93 ± 0,20	3,77 ± 0,21	0,08
FB2	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-
FB3	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-
FB4	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-
FB5	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	-

Fonte: Os autores.
 Source: The authors.

Atualmente, os fungos basidiomicetos têm sido reconhecidos como efetivos agentes degradadores de moléculas poluentes, como os herbicidas. Vários estudos têm sido direcionados aos componentes bioquímicos desses fungos que podem agir nas moléculas poluentes, reduzindo sua toxicidade ou promovendo a sua mineralização. Neste estudo, foi possível selecionar uma cepa de basidiomiceto tolerante ao 2,4-D por sua capacidade de crescimento em meio solidificado contendo 3 g L⁻¹ do herbicida. A taxa diária de crescimento fúngico para a cepa FB1 se encontrou muito próxima dos valores encontrados para os fungos *Pleurotus pulmonarius* e *Tyromyces pulcherrimus* em condições de cultivo similares (Serbent *et al.*, 2020). Embora as proporções avaliadas sejam muito superiores àquelas já passíveis de causar efeitos prejudiciais agudos em algumas espécies de animais (Silva *et al.*, 2022), a tolerância de fungos à altas concentrações de pesticidas reflete o grande potencial desses micro-organismos em metabolizar a molécula poluente, demonstrando que possuem potencial para aplicações biotecnológicas, como a biorremediação de ambientes contaminados por pesticidas.

A contaminação ambiental por herbicidas e outros produtos usados na agricultura é uma das grandes preocupações em todo o mundo. Há vários anos, existe a busca por métodos de descontaminação efetivos que não agridam o meio ambiente, como a aplicação de micro-organismos e/ou suas enzimas para degradar esses compostos tóxicos. Nesse sentido, a capacidade de degradação de 2,4-D foi confirmada em espécies de basidiomicetos, como *Rigidoporus* sp., o qual degradou 100% do herbicida após 6 dias de cultivo (Nguyen *et al.*, 2022) e *Phanerochaete chrysosporium*, que mineralizou 50% do 2,4-D após 24 horas de cultivo (Valli e Gold, 1991).

3.3. Avaliação da toxicidade do 2,4-D após adição do extrato enzimático bruto

A testemunha apresentou uma média de crescimento radicular de 0,5 ± 0,27 cm, enquanto a média de crescimento do hipocótilo foi de 1,15 ± 0,09 cm, com uma taxa de germinação de 81,67 ± 10,41%. Nenhum outro tratamento apresentou germinação considerável pela metodologia (radícula > 1 mm), portanto, o crescimento relativo para estas foi nulo, o que demonstra que a degradação do 2,4-D por enzimas extracelulares possivelmente presente no extrato bruto não foi suficientemente efetiva para reduzir a toxicidade do herbicida.

Recentemente, a degradação do 2,4-D em diferentes tampões (pH 4 e pH 7) foi analisada, observando-se que parte do herbicida foi degradada por um extrato fúngico rico em lacases após 5 horas de incubação. Os autores relataram que o pH influencia a degradação do agrotóxico, bem como a estabilidade das lacases. Além da ação das lacases na via de degradação do 2,4-D, alguns estudos observaram uma redução na degradação do 2,4-D quando a colônia fúngica foi cultivada na presença de inibidores do citocromo P-450, um sistema

enzimático intracelular envolvido na degradação de poluentes (Nguyen *et al.*, 2022; Nykiel-Szymańska *et al.*, 2018).

No presente estudo, não foi possível observar efeito semelhante com extrato enzimático extracelular da cepa FB1 cultivada em meio líquido a base de bagaço de malte. Além dos fatores destacados acima, outros podem ter influenciado esse resultado, como o envolvimento de sistemas enzimáticos intracelulares na degradação de 2,4-D, a baixa concentração de enzimas no meio de reação, a ausência de mediadores enzimáticos ou a alta concentração de pesticida utilizada.

4. Conclusão

Todas as cepas de basidiomicetos isoladas apresentam capacidade de secreção de enzimas fenoxidases, lipases e celulasas, com exceção da FB4, a qual não foi identificada como produtora de fenoxidases. Portanto, é necessário explorar biotecnologicamente o poder enzimático desses isolados de basidiomicetos, visto que suas enzimas apresentam capacidade para reduzir a contaminação ambiental causada por pesticidas.

O isolado FB1 é capaz de se desenvolver em altas concentrações de 2,4-D, em comparação com os outros isolados estudados, contudo, o seu extrato enzimático bruto não é capaz de reduzir a toxicidade do herbicida sobre as sementes de alface, indicando que enzimas intracelulares podem ser essenciais no processo de degradação de 2,4-D por essa cepa. Assim, os resultados obtidos representam um ponto inicial para avaliar de forma mais consistente a aplicação de fungos na descontaminação de ambientes poluídos com o herbicida 2,4-D.

5. Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Araucária, pela bolsa cedida por meio do Programa de Bolsas de Iniciação Científica e Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBIC & PIBIT). Agradecemos também ao Instituto Federal do Paraná – Campus Ivaiporã, pelo apoio financeiro por meio do Programa de Assistência Complementar ao Estudante (PACE), por todo o material, pelo espaço e pelo auxílio oferecido por seus técnicos de laboratório, o que possibilitou a realização desse trabalho.

6. Referências

Abe, C. A. L., Faria, C. B., Castro, F. F., Souza, S. R., Santos, F. C., Silva, C. N., Tessmann, D. J., Barbosa-Tessmann, I. P. (2015). Fungi Isolated from Maize (*Zea mays* L.) Grains and Production of Associated Enzyme Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(12), 15328–15346.

Aust, S. D. (1990). Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbial Ecology**, 20(1), 197-209.

Behera, B. C., Parida, S., Dutta, S. K., Thatoi, H. N. (2014). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability. **American Journal Of Microbiological Research**, 2 (1), 41-46.

Boddy, L., Frankland, J. C., West, P. V. (2008). **Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes** (1^a ed.). Aberdeen: The British Mycological Society. 387.

Brasil. **Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle**

e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 07 de mai. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562> >. Acessado em: julho/2022. 2021.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (2019). Diagnóstico da contaminação de águas superficiais, subterrâneas e sedimentos por agrotóxicos. (**Relatório final**). Disponível em: < https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/Relatorio-Agrot%C3%B3xicos_28_11_2019_Conclu%C3%ADdo_PDF-1.pdf >. p. 161.

Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian journal of microbiology**, 48(1), 114–127.

Conceição, D. M., Angelis, D. A., Bidoia, E. D., Angelis, D. F. (2005). Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, 72(1), 99-106.

Davidson, R.W., Campbell, W. A., Blaisdell, D. J. (1938). Differentiation of wooddecaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, 57(9), 683-685.

Eerd, L. L. V., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, 51, 472–495.

Emolecules. **Estrutura química do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)**. Disponível em: < <https://orderbb.emolecules.com/getimage?id=88E8CC6CF122003CFA728431&width=600&height=400&cs=cow> >. Acesso em: 06/09/2022.

Emolecules. **Estrutura química do 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)**. Disponível em: < <https://orderbb.emolecules.com/getimage?id=7971DB065BEED3A39B49C95A&width=600&height=400&cs=cow> >. Acesso em: 06/09/2022.

Hankin, L., Anagnostakis, S. L. (1975). The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, 67(3), 597-607.

IARC - International Agency for Research on Cancer (2018). DDT, lindane and 2,4-D. IARC Working Group. (Monografia), **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. (113), p. 513.

Instituto Nacional de Câncer – INCA (2022). **Agrotóxico**. Maio. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico> >. Acesso em: 01/08/2022.

Kango, N., Jana, U. K., Choukade, R. (2019). Fungal Enzymes: sources and biotechnological applications. **Advancing Frontiers In Mycology & Mycotechnology**, 515-538.

Khotimah, S., Suharjono, S., Ardyati, T., Nuraini, Y. (2021). The potential of cellulose-degrading fungi at various peat maturities in Teluk Bakung Peat Area, Kubu Raya District, Indonesia. **Biodiversitas Journal Of Biological Diversity**, 22(4), 1981-1990.

Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008). Laccases and Their Applications: a patent review. **Recent Patents On Biotechnology**, 2(1), 10-24.

Lima, H. R. S., Sales, V. O. (2022). Aspectos gerais da ecotoxicologia, monitoramento ambiental, biodegradação e biorremediação. In: Peralta, R. M. **Biodegradação e Biorremediação: Ênfase em bactérias e fungos**. Mérida Publishers, 1, 9-21.

Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., El-Ghissasi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K. (2015). Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **The Lancet Oncology**, 16(8), 891-892.

Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., Hildén, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. **Journal Of Basic Microbiology**, 50(1), 5-20.

Luz, B. D. S. (2014). **Produção de lipases visando-se aplicações industriais empregando-se microorganismos selecionados na bioprospecção realizada no Parque Estadual Serra Do Ouro Branco/MG**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São João Del-Rei Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, MG, Brasil.

Messias, J. M., Costa, B. Z., Lima, V. M. G., Giese, C., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M. (2011). Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 32(2), 213-234.

Moreira, J. S. C., Magalhães, E. M., Thiem, B., Silva, J. V., Inácio, F. D. (2022). Isolamento e seleção de basidiomicetos comerciais e selvagens produtores de amilases e fenoloxidasas. In: **Open Science Research III**. Editora Científica Digital, 3, 576-585.

Nath, S., Kango, N. (2021). Recent Developments in Industrial Mycozymes: A Current Appraisal. **Mycology**, 13(2), 81–105.

Nguyen, T. L. A., Dao, A. T. N., Dang, H. T. C., Koekkoek, J., Brouwer, A., Boer, T. E., Van-Spanning, R. J. M. (2022). Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) by fungi originating from Vietnam. **Biodegradation**, 33(3), 301–316.

Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P., Bernat, P. (2018). Elimination and detoxification of 2,4-D by *Umbelopsis isabellina* with the involvement of cytochrome P450. **Environmental science and pollution research international**, 25(3), 2738–2743.

Oliveira, B. R. F. (2020). **Efeitos do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre a morfologia das brânquias e parâmetros comportamentais em peixes-zebra *Danio rerio* adultos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Oliveira-Junior, R. S., Constantin, J., Inoue, M. H. (2011). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas** (22^a ed.). Curitiba: Ominipax. 362.

Peraza-Jiménez, K., Larosa-García, S., Huijara-Vasconcelos, J. J., Reyes-Estebanez, M., Gómez-Cornelio, S. (2021). Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a Tropical Rainforest in Mexico. **Journal Of Fungi**, 8(1), 22.

Pinto, B. G. S. (2020). **Análise da toxicidade do herbicida 2,4-d (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus Gallus domesticus* L. 1758)**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, Brasil.

Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T., Martínez, M. J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology and Biochemistry**, 36(6), 909-916.

Roman, E. S., Vargas, L., Rizzardi, M. A., Hall, L., Beckie, H., Wolf, T. M. (2005). **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação** (21ª ed.). Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 152.

Santos, R. A. T., Franscisquini, M., Biasotto, G., Rossi, L. C. L. (2021). Degradação do herbicida 2,4-D em função de técnicas de biorremediação. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, 2 (3), 61.

Sánchez-Corzo, L. D., Álvarez-Gutiérrez, P. E., Meza-Gordillo, R., Villalobos-Maldonado, J. J., Enciso-Pinto, S., & Enciso-Sáenz, S. (2021). Lignocellulolytic Enzyme Production from Wood Rot Fungi Collected in Chiapas, Mexico, and Their Growth on Lignocellulosic Material. **Journal of fungi**, 7(6), 450.

Secretaria da Saúde do Paraná. Plano De Vigilância e Atenção à Saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná - PEVASPEA 2020-2023 (2019). **Vigilância Ambiental de resíduos de agrotóxicos em água para consumo humano no Paraná 2017-2019**. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-04/02.03.2022_arquivo-final-_vigilancia_ambiental_de_residuos_de_agrotoxicos_em_agua_para_ocnsumo_humano_no_parana_2017_-_2019.pdf>. p. 38.

Serbent, M. P., Guimarães, D. K. S., Drechsler-Santos, E. R., Helm, C. V., Giongo, A., Tavares, L. B. B. (2020). Growth, enzymatic production and morphology of the white-rot fungi *Lentinus crinitus* (L.) Fr. upon 2,4-D herbicide exposition. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 17(5), 2995–3012.

Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, 23(1), 15-22.

Silva, A. P., Morais, E. R., Oliveira, E. C., Ghisi, N. C. (2022). Does exposure to environmental 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations increase mortality rate in animals? A meta-analytic review. **Environmental pollution**, 303, 119179.

Sobrero, M. S., Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: Castillo, G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas** (1ª ed.). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 4, 71-79.

Teather, R. M.; Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied And Environmental Microbiology**, 43(4), 777-780.

Tsujiyama, S., Muraoka, T., Takada, N. (2013). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using vanillin as an activator. **Biotechnology letters**, 35(7), 1079–1083.

União Europeia. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption. **Official Journal of the European Union**, 16 de dez. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj> >. Acesso em: julho/2022. 2021.

Valli K, Gold M.H. (1991) Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, 173(1), 345-52.

Venâncio, C., Pereira, R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A. P., Costa, J. P., Duarte, A. C., Lopes, I. (2017). Salinity induced effects on the growth rates and mycelia composition of basidiomycete and zygomycete fungi. **Environmental pollution**, 231(2), 1633–1641.