

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

PRODUÇÃO DE LACASE E DESCORAMENTO DO VERMELHO CONGO E
VERDE MALAQUITA PELO *Pycnoporus sanguineus* E
Trametes versicolor

Pascual Isoldi Pinkoski
Engenheiro Químico, MsC. (UNICAMP)

Tese apresentada como um dos
Requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS), Brasil
Dezembro, 1997

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

P655p

Pinkoski, Pascual Isoldi

Produção de lacase e descoramento do vermelho congo e verde malaquita pelo *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* / Pascual Isoldi Pinkoski. -- Porto Alegre : P. I. Pinkoski, 1997.

xii, 175 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, 1997.

1. Microbiologia do solo : Fungo basidiomicetes : Residuo industrial : Lacase : Substrato : Método de pesquisa. Título.

CDD: 631.46

CDU: 631.461

Catálogo na publicação:

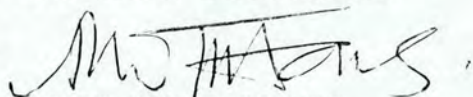
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

PASCUAL ISOLDI PINKOSKI
Engenheiro Químico - UFRGS
Mestre em Engenharia de Alimentos - UNICAMP/SP

TESE

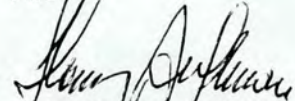
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de
DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 17.12.1997
Pela Banca Examinadora

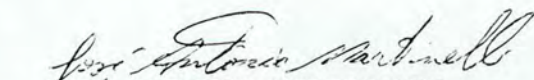


ROBERT WAYNE THOMAS
Orientador-CPG-Ciência do Solo

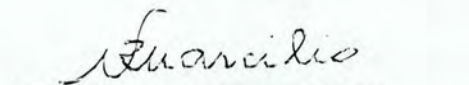
Homologado em: 09.03.1998
Por



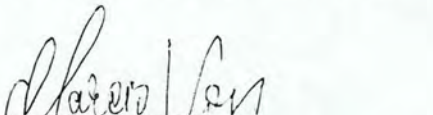
IBANOR ANGHINONI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia




JOSÉ ANTONIO MARTINELLI
CPG-Fitotecnia



NILSON ROMEU MARCÍLIO
Escola de Engenharia/UFRGS



MARCIO VOSS
EMBRAPA - Passo Fundo/RS



SERGIO NICOLALEWSKY
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Robert Thomas, pela orientação, ensinamentos e sua amizade e confiança.

À Direção da CIENTEC e do ICTA-UFRGS, pela valiosa possibilidade de alcançar esta formação.

Ao professor João Rui Jardim Freire pela acolhida, ao Francisco Schneider Neto pelo apoio na impressão da Tese, e a Danilo Castilhos, pelo inestimável auxílio na análise estatística dos resultados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia e aos colegas e amigos dos Laboratórios de Microbiologia, Micotoxinas e Microscopia da CIENTEC pela acolhida e fraternal convivência.

A meu falecido pai Arnaldo, minha mãe Nahir e meu irmão Domingos por me possibilitarem a oportunidade de estudar.

À Bibiana, Juliana, Maria Teresa e Tomás, que pelo seu amor tornaram possível vencer este desafio.

PRODUÇÃO DE LACASE E DESCORAMENTO DO VERMELHO
CONGO E VERDE MALAQUITA PELO *Pycnoporus sanguineus*
E *Trametes versicolor*^{1/}

Autor: Pascual Isoldi Pinkoski

Orientador: Prof. Robert W.S.P. Thomas

RESUMO

Fungos Basidiomycetes são citados como degradadores de fenóis e corantes que podem estar em efluentes. Neste estudo *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* foram pesquisados na produção de lacase e descoloramento de vermelho congo e verde malaquita. O crescimento radial em ágar BD foi 8,2 a 9,5 mm dia⁻¹ no *P. sanguineus* e 5,4 a 7,1 mm dia⁻¹ no *T. versicolor*. A biomassa dos fungos foi 1,6 a 1,7 g L⁻¹ em extrato de malte (EM) e 0,32 a 0,34 g L⁻¹ em caldo Bushnell-Haas (BH), detectando lacase após 5 dias. Em 20 dias de cultura estática em caldo EM, *T. versicolor* produziu 800 unidades de siringaldazina e *P. sanguineus* 400. Aeração favoreceu a produção de lacase no *P. sanguineus*. As taxas de descoloramento do vermelho congo pelos fungos em BH foram de 5,5 a 8 mg L⁻¹ dia⁻¹ após 48 horas. O descoloramento após 10 dias foi 60% (BH) e 92% (BH+0,001% de glicose, BHG), no *P. sanguineus* (32 Unidades de lacase produzidas), e 80% (BH) e 99% (BHG) no *T. versicolor* (438 U. lacase). As taxas de descoloramento do verde malaquita no *P. sanguineus* e *T. versicolor* após 48 horas foram 5,0 a 9 mg L⁻¹ dia⁻¹ em BH. Descoloramento após 10 dias foi 28% (BH) e 40% (BHG) pelo *P. sanguineus* (83 U. lacase) e 84% (BH) e 68% (BHG) pelo *T. versicolor* (311 U. lacase). Os resultados sugerem que os fungos Basidiomycetes podem ser utilizados para tratamento de efluentes industriais contendo estes e corantes similares.

^{1/}

Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (176 p.)-Dezembro, 1997.

LACCASE PRODUCTION AND THE DECOLORIZATION OF CONGO RED
AND MALACHITE GREEN BY *Pycnoporus sanguineus*
AND *Trametes versicolor*^{1/}

Author: Pascual Isoldi Pinkoski

Adviser: Prof. Robert W.S.P. Thomas

SUMMARY

Basidiomycete fungi are cited as being able to degrade phenolics and dyes which can be present in effluents. In this study *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes versicolor* were investigated for laccase production and Congo red and Malachite green discolorization. Radial growth on potato dextrose agar was 8.2-9.5 mm d⁻¹ for *P. sanguineus* and 5.4-7.1 mm d⁻¹ for *T. versicolor*. Biomass production for both fungi was 1.6-1.7 g L⁻¹ in malt extract broth (MEB) and 0.32-0.34 g L⁻¹ in Bushnell-Haas broth (BHB), with laccase detected after 5 days. After 20 days static culture in MEB, *T. versicolor* produced 800 syringaldazine units and *P. sanguineus* 400. Aeration favored laccase production by *P. sanguineus*. Congo red discoloration rate by both fungi in BHB was 5.5-8 mg L⁻¹ d⁻¹ after 48 h. Discoloration after 10 d was 60% (BHB) and 92% (BHB+0.001% glucose, BHBG) for *P. sanguineus* (32 laccase units produced) and 80% (BHB) and 99% (BHBG) for *T. versicolor* (438 laccase units). Malachite green discoloration rate after 48 h by *P. sanguineus* and *T. versicolor* was 5.0-9.0 mg L⁻¹ d⁻¹ in BHB. Discoloration after 10 d was 28% (BHB) and 40% (BHBG) for *P. sanguineus* (83 laccase units) and 84% (BHB) and 68% (BHBG) for *T. versicolor* (311 laccase units). These results suggest that these basidiomycete fungi could be used for the treatment of industrial effluents containing these, and related, dyestuffs.

^{1/}

Doctoral Thesis in Soil Science. Faculdade de Agronomia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
(176 p.)-December, 1997.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	3
2.1 Enzimas dos Basidiomycetes.	3
2.2 Fungos secretadores e propriedades da lacase.	9
2.3 Considerações sobre resíduos tóxicos no ambiente.	13
2.4 Aplicações dos Basidiomycetes na transformação dos resíduos tóxicos.	15
2.4.1 Efluentes do branqueamento de polpas kraft.	16
2.4.2 Efluentes contendo corantes.	20
2.4.3 Outras aplicações de Basidiomycetes.	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.	33
3.1 Equipamentos.	33
3.2 Reagentes e meios de cultura.	34
3.3 Culturas-padrão, manutenção e inoculação.	37
3.4 Condições gerais da experiência.	38
3.5 Crescimento radial e reação com ácido tânico.	40
3.6 Padronização da quantificação da lacase.	42
3.6.1 Primeira experiência.	43
3.6.2 Segunda experiência.	43
3.6.3 Terceira experiência.	44
3.6.4 Quarta experiência.	44

	Página
3.7 Crescimento em meios líquidos e produção de biomassa.	45
3.8 Crescimento em meios semi-sólidos.	46
3.9 Corantes em meios líquidos e solidificados.	48
3.10 Análise estatística.	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Introdução.	53
4.2 Crescimento radial sob diferentes pH e temperaturas.	55
4.2.1 Influência do pH e temperatura.	56
4.2.2 Efeito sobre o ácido tânico em meio solidificado.	60
4.3 Atividade sobre corantes em meio solidificado.	62
4.3.1 Atividade sobre anilinas.	63
4.3.2 Atividade sobre o vermelho congo e verde malaquita.	66
4.3.3 Atividade sobre violeta cristal e azul de metileno.	69
4.4 Quantificação da lacase.	69
4.4.1 Efeito da proporção entre enzima e substrato.	72
4.4.2 Efeito do solvente da siringaldazina.	76
4.4.3 Influência dos diluentes sobre a atividade da lacase.	79
4.4.4 Efeito da concentração das soluções de siringaldazina.	80
4.5 Capacidade produtora de lacase.	83
4.5.1 Efeito da agitação dos caldos.	83
4.5.2 Efeito da adição de glicose.	85
4.5.3 Produção de lacase em caldos de extrato de malte.	89
4.5.4 Produção de lacase em caldos de Bushnell -Haas.	92
4.6 crescimento fúngico em meios semi-sólidos e líquidos.	97
4.6.1 Produção de lacase em meios semi-sólidos.	97
4.6.2 Crescimento em meios semi-sólidos.	99

4.6.3	Quantificação de biomassa em meios líquidos.	101
4.6.3.1	Produção de biomassa pelo <i>P. sanguineus</i> e pelo <i>T. versicolor</i> em caldo de extrato de malte.	101
4.6.3.2	Produção de biomassa pelo <i>T. versicolor</i> em função da idade do inóculo.	102
4.6.3.3	Produção de biomassa pelo <i>P. sanguineus</i>	103
4.6.3.4	Produção de biomassa pelo <i>P. sanguineus</i> e <i>T. versicolor</i> em caldo de Bushnell-Haas.	104
4.6.3.5	Produção de biomassa pelo <i>P. sanguineus</i> e <i>T. versicolor</i> em caldo de Bushnell-Haas com corantes.	105
4.7	Atividades do <i>P. sanguineus</i> e <i>T. versicolor</i> sobre corantes em meios líquidos.	108
4.8	Características dos corantes vermelho congo e verde malaquita.	113
4.9	Atividade dos fungos sobre vermelho congo.	116
4.9.1	Variação da concentração do corante.	116
4.9.2	Variação do pH das soluções.	121
4.9.3	Sorção do vermelho congo pela biomassa e discos de ágar.	124
4.10	Atividade dos fungos sobre o verde malaquita.	127
4.10.1	Variação da concentração do corante.	127
4.10.2	Variação do pH das soluções.	132
4.10.3	Sorção do verde malaquita pela biomassa e discos de ágar.	135
4.11	Avaliação da transformação ou degradação dos corantes pelos fungos.	137
5.	CONCLUSÕES.	144
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	145
7.	APÊNDICES.	145
8.	VITA.	162

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> a 35°C em 10 dias de incubação em caldo EM, pH inicial 6,0, em diferentes quantidades de enzima e 10 ⁻³ mM de siringaldazina. Medindo a variação da absorbância em 525nm a 25°C, n = 5	72
2. Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> (Ps) e do <i>T. versicolor</i> (Tv) a 30°C, após 10 dias de incubação em caldo EM, pH inicial 6,0, e quantidades crescentes de substrato em relação caldo EM e solução tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0 ± 0,1. Medindo a variação da absorbância em 525nm a 25°C, n = 5.	74
3. Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> em caldos de Bushnell-Haas (caldo BH) pH 5,0 e 6,0. Variação da absorbância medida em 525nm a 25°C, n = 3.	93
4. Atividade enzimática do <i>T. versicolor</i> em caldos de Bushnell-Haas (caldo BH) pH 5,0 e 6,0. Variação da absorbância medida em 525nm a 25°C, n = 3.	94
5. Biomassa produzida pelo <i>T. versicolor</i> em caldo de extrato de malte (caldo EM) com pH 5,0, após 5, 10 e 20 dias de incubação a 30°C. n =3	102
6. Biomassa produzida (mg L ⁻¹) pelos fungos <i>P. sanguineus</i> (Ps) e <i>T. versicolor</i> (Tv) em 10 dias de incubação a 35 e 30°C, n =3.	106

7. Anilina vermelha removida de caldo BH com pH 6,0, após 5 dias de incubação com *P. sanguineus* (Ps) e *T. versicolor* (Tv). Medido pela variação da absorbância em 488nm e 25°C. 109

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Crescimento radial do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (a) e <i>Trametes versicolor</i> (b) , sobre ágar BD pH 5,0, 6,0, 7,0 a 20, 30 e 35°C. Barras indicam desvio padrão, n = 5.	57
2. Culturas de 5 dias do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (A) e <i>Trametes versicolor</i> (B) , sobre ágar batata dextrose com 0,5% de ácido tânico (ágar BDT), a 35 e 30°C, respectivamente.	61
3. Culturas de 10 dias do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (A) e <i>Trametes versicolor</i> (B) , sobre meios solidificados com ágar e 25 mg L ⁻¹ de anilina vermelha, a 35 e 30°C, respectivamente.	64
4. Culturas de 10 dias do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (A) e <i>Trametes versicolor</i> (B) , sobre meios solidificados com ágar e 15 mg L ⁻¹ de anilina verde, a 35 e 30°C, respectivamente.	65
5. Culturas de 10 dias do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv) , sobre ágar batata dextrose com 25 mg L ⁻¹ de vermelho congo (A) e verde malaquita (B) , a 35 e 30°C, respectivamente.	68
6. Culturas de 10 dias do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv) , sobre ágar batata dextrose com 25 mg L ⁻¹ de violeta cristal (A) e azul de metileno (B) , a 35 e 30°C, respectivamente.	70

	Página
7. Esquema da oxidação da siringaldazina, mostrando a forma reduzida incolor (a) e a forma oxidada da quinona (b) , que é colorida (Harkin e Obst, 1973).	71
8. Atividade da lacase do <i>Trametes versicolor</i> em 20 dias em caldos de extrato de malte (caldo EM), pH 6,0 e 7,0. Lacase quantificada em 525nm e 25°C, com diferentes percentuais de caldo EM na mistura de reação. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min ⁻¹ C. v. ≤ 20%, n = 3.	77
9. Atividade da lacase do <i>Trametes versicolor</i> em 20 dias em caldos de extrato de malte (caldo EM), pH 6,0 e 7,0. Lacase quantificada em 525nm e 25°C com quantidades crescentes de substrato na mistura de reação. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min ⁻¹ C. v. ≤ 6%, n = 2.	82
10. <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv), atividade da lacase em caldos de extrato de malte (caldo EM), pH 6,0, 180 rpm e 30°C por 3 dias. Lacase quantificada a 525nm e 25°C. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min ⁻¹ , c. v. ≤ 13,7%, n = 3.	84
11. Atividade da lacase do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv) em 10 dias a 35 e 30°C, em caldo de extrato de malte (caldo EM) e com 100 mg L ⁻¹ de glicose (caldo EMG). Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min ⁻¹ , n = 2. As barras indicam o desvio padrão.	86
12. Atividade da lacase do <i>P. sanguineus</i> (a) e <i>T. versicolor</i> (b) , em caldos de extrato de malte (caldos EM), em 10, 15 e 20 dias a 35 e 30°C, respectivamente. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min ⁻¹ a 25°C, n = 3. As barras indicam o desvio padrão.	90

	Página
13. Estrutura do vermelho congo (a) : um sal dissódico 3,3[1,1'Bifenil]-4,4'-diylbis-(azo) bis[4-amino-1-ácido naftalenossulfônico]. E estrutura do verde malaquita (b) : um cloreto de fenil-fenilmetileno N-[4-[-[[4-(dimetilamino)-fenil]fenilmetileno]-2,5-ciclohexadieno-1-ylidene]-N-cloreto-metil-metanamino; bis-[cloreto p-(dimetilamino)-fenil]fenilmetileno.	114
14. <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv), variação da concentração do vermelho congo em 10 dias a 35 e 30°C em (a) caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg L ⁻¹ (BHG) e (b) caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose. Coeficiente de variação ≤ 37,4%, n=5.	117
15. <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv), variação do pH das soluções do vermelho congo em (a) caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg L ⁻¹ (BHG) e (b) caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose, em 10 dias a 35 e 30°C. Coeficiente de variação ≤ 3%, n=5.	122
16. <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv), variação da concentração do verde malaquita em 10 dias a 35 e 30°C em (a) caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg L ⁻¹ (BHG) e (b) caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose. Coeficiente de variação ≤ 23,8%, n=5.	128
17. <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Ps) e <i>Trametes versicolor</i> (Tv), variação do pH das soluções do verde malaquita em (a) caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg L ⁻¹ (BHG) e (b) caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose, em 10 dias a 35 e 30°C. Coeficiente de variação ≤ 2%, n=5.	133

1. INTRODUÇÃO

Dentre os desafios atualmente enfrentados por diferentes ramos industriais inclui-se a preocupação com o tratamento e destino dos resíduos originados em determinadas operações e que são liberados no ambiente. Dentre estes resíduos sobressaem os que apresentam estruturas fenólicas ou aromáticas, que pela sua persistência ou recalcitrância à degradação biológica permanecem longos períodos no ambiente.

Como muitas destas substâncias apresentam baixo grau de degradabilidade, podem acumular-se na matéria orgânica dos solos, nas plantas e nos animais. Entretanto, uma parcela destes resíduos pode ser utilizada pela microbiota como fonte de energia, no processo de catabolismo, principalmente por aqueles microrganismos dotados de sistemas oxidativos de baixa especificidade.

A principal característica dos microrganismos que atuam sobre estes resíduos é a produção de enzimas polifenol-oxidases, cujos principais produtores são os

fungos Basidiomycetes degradadores de madeiras causadores da podridão-branca. Por esta característica, as experiências foram realizadas em culturas estáticas, de modo a avaliar tais microrganismos sob condições de baixos teores de oxigênio, normalmente encontrados em resíduos semi-sólidos.

As polifenol-oxidases do tipo lacase são capazes de catalisar a transformação dos resíduos aromáticos policíclicos, entre os quais podem ser citados os hidrocarbonetos aromáticos, os compostos fenólicos, as anilinas e os corantes sintéticos, que podem estar presentes nos efluentes do beneficiamento do carvão, do refino do petróleo, das indústrias petroquímicas e coureiro calçadista, entre outras sediadas no estado do Rio Grande do Sul.

No intuito de avaliar a eficiência da atividade fúngica na transformação ou degradação de resíduos fenólicos ou aromáticos, bem como desenvolver uma metodologia para a quantificação da lacase, foi realizada a presente pesquisa com dois fungos Basidiomycetes com habitat no Rio Grande do Sul, utilizando como substratos anilinas, corantes azóicos e derivados do trifenilmetano.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas dos Basidiomycetes

De acordo com Stevenson (1974), à classe dos Basidiomycetes pertencem os mais avançados grupos de fungos, que crescem nos solos e nos leitões de folhas e madeiras onde penetram formando o corpo de frutificação e excretam, entre outras, enzimas polifenol-oxidases extracelulares capazes de catalisar a degradação da lignina. Stevenson (1982), ao estudar a bioquímica da formação das substâncias húmicas do solo, identificou os fungos Basidiomycetes da podridão-branca como o grupo mais importante na ruptura da molécula da lignina, produzindo polifenóis que são convertidos por suas enzimas polifenol-oxidases a quinonas, que reagem entre si e formam polímeros que servem para a síntese do húmus.

De acordo com Borriss (1987) as enzimas extracelulares produzidas pelos fungos Basidiomycetes usualmente são glicoproteínas, que suportam temperaturas elevadas e condições extremas em ambientes como solos, águas superficiais e profundas, lodos e resíduos vegetais e animais. No solo as enzimas polifenol-oxidases catalisam a hidrólise de macromoléculas em compostos de

menor peso molecular, bem como a polimerização de compostos fenólicos gerados pela degradação da lignina e por síntese microbiana (Stevenson, 1982).

Hammel (1989) relatou que os fungos da podridão-branca possuem sistema enzimático oxidativo não específico que pode despolimerizar e mineralizar a lignina, um polímero complexo de excepcional recalcitrância. Mas não pôde esclarecer o papel das enzimas ligninolíticas na abertura de anéis aromáticos de hidrocarbonetos.

Szklarz et al., (1989) dividiram os fungos degradadores de madeira em três principais grupos com relação à produção de enzimas extracelulares:

1. fungos produtores de lacases;
2. fungos produtores de peroxidases;
3. fungos que não excretam quantidades mensuráveis de enzimas oxidativas.

No primeiro grupo ressalta a importância do *T. versicolor*, um dos Basidiomycetes mais estudados quanto à produção de lacase e a possibilidade de sua aplicação em diversos processos enzimáticos, sendo estudado por Lindeberg e Fähræus (1952); Fähræus e Ljunggren (1961); Fähræus et al., (1958); Fähræus e Reinhammar (1967); Mosbach (1963); Benfield et al., (1964); Evans et al., (1985); Szklarz e Leonowicz (1986) e Leonowicz e Bollag (1987).

O *T. versicolor* foi pesquisado também por Selin et al., (1975), quanto à polimerização de

lignosulfonatos; por Ishihara (1981) que relacionou sua atividade ligninolítica com produção de polifenol-oxidases; por Evans (1985) que pesquisou a lacase do *T. versicolor* *in vivo* e *in vitro*; por Maier et al. (1990) e Bourbonnais e Paice (1990) em cujos trabalhos registraram que as lacases do *T. versicolor* oxidavam também compostos não-fenólicos ligados à lignina.

Archibald et al. (1990) e Adleman e Archibald (1993) estudaram o descoramento de cromóforos de efluentes de polpa kraft pelo *T. versicolor*, ao passo que Bergbauer e Eggert (1994) apontaram o efeito que o tipo de sub-unidade e peso molecular do polímero apresentaram sobre a atividade deste fungo. ;

Segundo Call e Mücke (1995) tanto o *P. chrysosporium* como o *T. versicolor* são os mais importantes fungos da podridão-branca produtores das enzimas polifenol-oxidases: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, que têm papel ativo na biorremediação de solos e na degradação de resíduos fenólicos contidos em efluentes líquidos.

Além do *T. versicolor*, vários fungos têm sido estudados devido à sua produção de lacase, como o *Pholiota mutabilis* e *Pleurotus ostreatus* que foram estudados por Leonowicz e Trojanowski (1975) e por Leonowicz e Grzywnowicz (1981), o *Polyporus anceps* estudado por Petroski et al., (1980), o *Agaricus bisporus* por Wood (1980) e *Podospora anserina* por Durrens (1981),

ao passo que Kurtz e Champe (1982) trabalharam com *Aspergillus nidulans*.

No segundo grupo de fungos destaca-se o *P. chrysosporium* como um dos mais estudados, principalmente na sua aplicação e da enzima peroxidase por ele produzida sobre os efluentes provenientes das indústrias de polpa e papel kraft. Constam também nesse grupo um fungo da podridão-parda, *Piptoporus betulinus* e dois fungos da podridão-mole, *Chaetomium piluliferum* e *Chaetomium cellulolyticum*. O último grupo é representado pelo fungo da podridão-parda *Lenzites trabea*, que não produz extracelularmente oxidases nem peroxidases.

Tendo em vista o amplo espectro de substratos que as enzimas dos Basidiomycetes têm capacidade de catalisar a oxidação, alguns pesquisadores têm trabalhado na produção, indução e purificação de enzimas polifenol-oxidases e peroxidases, entre os quais podem ser citados Froehner e Eriksson (1974a, 1974b), que pesquisaram a indução, caracterização e purificação da lacase do *Neurospora crassa*.

Grotewold et al., (1988) estudaram a purificação da lacase extracelular da *N. crassa* em uma única etapa, conseguindo uma purificação de 94%, enquanto que Messerschmidt e Huber (1990) estudaram sua estrutura, concluindo que a lacase é o mais simples membro de um grupo de proteínas contendo quatro átomos de cobre na molécula, sugerindo que a enzima tem uma estrutura com três sítios ativos.

Blaich e Esser (1975) pesquisaram as lacases intra e extracelulares de quinze fungos Basidiomycetes da podridão-branca, pertencentes às famílias *Polyporaceae* e *Agaricaceae*, observando variabilidades qualitativas e quantitativas nas especificidades enzima-substrato, o que é compensado devido ao grande número de enzimas produzidas pelos fungos.

Pelas características bioquímicas dos Basidiomycetes Attili et al., (1993) apontam estes fungos como importantes fatores na manutenção da fertilidade dos solos, na melhoria do meio-ambiente através do processo de biorremediação de solos poluídos e nos tratamentos de resíduos sólidos e líquidos contendo substâncias recalcitrantes. São, além disso, espécies saprófitas na sua maioria, tendo importante papel na decomposição de resíduos diversos.

Estudando a biodegradação da lignina pelos Basidiomycetes *T. versicolor*, *P. chrysosporium* e *Phlebia radiata*, Higuchi (1993) constatou que tanto as enzimas lignina-peroxidase como a lacase estão envolvidas na retirada das cadeias laterais e na abertura dos anéis aromáticos das sub-unidades da lignina.

As lacases de *Rhizoctonia praticola*, um fungo Basidiomycete do solo, foram estudadas por Sjoblad e Bollag (1977), que observaram que as enzimas eram capazes de polimerizar no solo compostos fenólicos e naftólicos bem como os produtos derivados de pesticidas. Bollag et al., (1979, 1980) caracterizaram esta enzima como lacase,

e conjugaram compostos constituintes do húmus com 2,4-diclorofenol pela atividade desta lacase. Bollag e Liu (1985) obtiveram a copolimerização de fenóis halogenados com ácido siríngico, demonstrando a capacidade da lacase em intermediar a incorporação de resíduos na matéria orgânica do solo.

A purificação parcial e a caracterização das propriedades da lacase do *Botrytis cinerea*, um fungo que causa podridão em uvas e outros vegetais, foi realizada por Dubernet et al., (1977) que notaram sua grande estabilidade ao pH ácido e por Slomczynski et al., (1995) que a caracterizaram como uma glicoproteína monomérica com 49% de hexoses. A indução da produção de lacase do *B. cinerea* através da adição de ácido gálico ao meio foi obtida por Gigi et al., (1980), que realizaram sua caracterização e comparação com uma lacase produzida pelo *B. cinerea* em suco de uva, constatando similaridade entre as duas enzimas (Gigi et al., 1981), utilizando a lacase para testar a qualidade de vinhos.

Segundo dados de Kent Kirk e Farrel (1987) o mais estudado fungo da podridão-branca *P. chrysosporium* não produzia lacase em quantidade detectável, característica que foi estudada por Michel Jr. et al., (1991); Morgan et al., (1991); Boyle et al., (1992); Kerem et al., (1992). Mas Srinivasan et al., (1995) relataram que o *P. chrysosporium*, conhecido como produtor de lignina peroxidase e manganês peroxidase, produziu lacase em meios com 10 g L⁻¹ de celulose e 24 mM de tartarato de

amônio. A atividade da lacase foi demonstrada após adição de catalase ao meio para eliminar o peróxido de hidrogênio, indicando que a atividade enzimática não era de peroxidase, a principal enzima produzida por esse fungo.

2.2 Fungos secretadores e propriedades da lacase

Desde sua descoberta por Yoshida em 1883 no látex do *Rhus vernicifera* (apud Mayer e Harel, 1979) vários pesquisadores vêm trabalhando na intenção de caracterizar as propriedades e possíveis aplicações da enzima lacase produzida por microrganismos, pois são enzimas extracelulares e facilmente induzíveis por determinadas substâncias. Bertrand e Bourquelot (1895) (apud Fähræus et al., 1958) foram os primeiros a relatar que a lacase era encontrada nos fungos Basidiomycetes. Por sua vez, Fähræus et al., (1958) em seus estudos com nove estirpes de *P. versicolor* obtiveram resultados demonstrando que tais fungos eram os mais promissores produtores de altas taxas de lacase, e que a adição de 2,5-xilidina ao meio estimulava seu crescimento.

Os fungos utilizados por Lindeberg e Fähræus (1952) para a obtenção de lacase pertenciam ao gênero *Polyporus*, como *P. zonatus* e *P. versicolor*, que cultivados com substâncias fenólicas como ácido gálico ou tânico secretavam enzimas fenol-oxidases no meio formando zonas escuras mostrando ser enzimas lacase extracelulares; Fähræus e Ljunggren (1961), também

cultivando *P. versicolor* observaram que varios substratos eram oxidados pela lacase, como catecol, hidroquinona, guaiacol e resorcinol, entre outros. Constataram que a lacase é pouco especifica e muitas substâncias são oxidadas por esta enzima

Fähraeus e Reinhammar (1967), estudaram a produção de lacase do *P. versicolor*, sua purificação e propriedades. Os autores registraram que a produção de lacase pelos fungos apresenta duas vantagens sobre as lacases produzidas pelas plantas: sua formação é fortemente induzida por certas substâncias e é completamente secretada no meio de cultura.

Blaich e Esser (1975) testaram espécies da família *Polyporaceae*, gêneros *Pleurotus*, *Trametes* e *Polyporus* e da família *Agaricaceae*, como *Coprinus plicatilis* e *Hypholoma fasciculare* detectando lacases intra e extracelulares em todas as espécies. Kerrigan e Ross (1988) analisaram as isoenzimas de *Agaricus* spp., observando que as atividades das lacases produzidas por espécies diferentes eram diferenciadas, mas atividades idênticas nas lacases da mesma espécie.

Wood (1980) obteve lacase constutiva no *A. bisporus*, mas sem obter indução por cicloheximida, toluidina ou xilidina, que são compostos conhecidos como sendo indutores de enzimas polifenol-oxidases. Leonowicz e Trojanowski (1975) cultivando 13 espécies de Basidiomycetes registraram lacase em todas, mas apenas no

T. versicolor, *Pleurotus ostreatus* e *Pholiota mutabilis* houve indução por ácido ferúlico.

Posteriormente, Leonowicz et al., (1978) notaram que as lacases produzidas por indução nestes três fungos apresentavam eficiência catalítica superior às lacases constitutivas. Sugeriram que nos fungos a função da lacase seria destoxificar compostos fenólicos gerados no ambiente dos fungos pela degradação das madeiras e folhas sobre o solo, tornando-se necessário a forma mais eficiente da lacase, que é a induzida.

Um fungo do solo *Rhizoctonia praticola* produziu uma enzima que oxidava intermediários de pesticidas (Sjoblad e Bollag, 1977). Posteriormente, Bollag et al., (1979) caracterizaram esta enzima polimerizadora de compostos fenólicos, constatando ser lacase. Bollag et al., (1980) e Liu et al., (1981) observaram que esta lacase catalisava a conjugação do 2,4-diclorofenol com complexos húmicos do solo e com anilinas.

Leonowicz et al., (1984) estudando a atividade da lacase do *R. praticola* sobre os ácidos vanílico e siríngico determinaram que a um pH determinado tanto a lacase do *R. praticola* como a do *T. versicolor* geravam os mesmos produtos. Conforme Bollag e Liu (1985) a copolimerização de fenóis halogenados com ácido siríngico é catalisada pela lacase do *R. praticola*. Shuttleworth e Bollag (1986) utilizaram esta lacase solúvel e imobilizada em celite para transformar 15 substratos fenólicos. Bollag et al., (1988) e Dec e Bollag (1990)

estudaram a capacidade da lacase em destoxificação de poluentes fenólicos.

Kerem *et al.*, (1992) detectaram lacase numa fermentação semi-sólida do *Pleurotus ostreatus*, e Masaphy e Levanon (1992) encontraram lacase numa cultura submersa do *P. pulmonarius*. Dhaliwal *et al.* (1992) cultivaram dez espécies de *Pleurotus*, notando que sob agitação não houve produção de lacase. Nos meios suplementados com glicose houve aumento de produção, mostrando que esta enzima é semi-constitutiva, e que só lignina como fonte de carbono não permite crescimento nem produção de enzima.

Palmieri *et al.*, (1993) estudaram a estabilidade e atividade da lacase do *P. ostreatus* para aplicá-lo em biorreatores de tratamento de águas residuárias. Bezalel *et al.*, (1996) mineralizando hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com *P. ostreatus*, observaram a lacase associada com a degradação destes compostos. Ortega *et al.*, (1993) também com *P. ostreatus*, em fermentação semi-sólida, observaram o desenvolvimento de lacase, celulase e xilanase na degradação do bagaço de cana-de-açúcar.

Bollag e Leonowicz (1984) detectaram produção de lacase constitutiva e induzida por 2,5-xilidina no *T. versicolor*, com as formas induzidas mais ativas do que as formas constitutivas. Akhmedova *et al.* (1994) cultivando fungos degradadores de celulose e lignina, isolaram 4 culturas de Basidiomycetes, *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Fomes fomentarius* e *Inonolus hispidus* produtoras de lacase.

Gigi et al., (1980) estudaram a indução da lacase no *Botrytis cinerea* pela adição de ácido gálico ao meio, obtendo a máxima produção e excreção devido a esse indutor. Pal et al., (1995) cultivaram *Flammulina velutipes* e *T. versicolor* em bagaço de cana-de-açúcar por 40 dias. *T. versicolor* produziu lacase e Mn-peroxidase, degradando lignina e holocelulose.

2.3 Considerações sobre resíduos tóxicos no ambiente

Compostos fenólicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, cloroligninas, anilinas e corantes são alguns dos compostos que podem estar presentes em efluentes provenientes de indústrias de beneficiamento de carvão, de refino de petróleo, de produção de polpa e papel, de produtos têxteis e orgânicos em geral.

Como os resíduos destes produtos no ambiente são potencialmente perigosos, sua remoção dos efluentes ou sua destoxificação por processos enzimáticos é necessária e possível. Como Klibanov et al., (1980), que estudaram o uso de enzimas peroxidases sobre produtos fenólicos e aminas aromáticas, Atlow et al., (1984) com enzimas polifenol-oxidases sobre águas residuárias fenólicas e Sutherland (1992), com fungos da podridão-branca na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

O aspecto mais crítico relacionado a estes resíduos é a possibilidade de contaminação dos solos e das águas subterrâneas (Shannon e Bartha, 1988) e, embora

parte dos mesmos seja biodegradável, Bollag et al., (1988) revelaram que sua parcial degradação no solo pode torná-los mais tóxicos, mas que podem ser neutralizados através de sua conversão em polímeros húmicos, ocasionada pela catálise de enzimas microbianas (Stevenson, 1982).

De acordo com Seal e Morton (1987), a biodegradação pode ser definida como a transformação de resíduos pela atividade microbiana para formas mais valiosas ou aceitáveis ao meio ambiente. Neilson et al., (1991) mostraram que a periculosidade potencial dos resíduos nos solos e ambientes aquáticos cresce à medida em que aumentam a sua resistência à degradação, a toxicidade à biota e o seu potencial para concentração na biota. A estrutura química dos resíduos também influi na sua biodegradação, sendo importantes o número e a orientação dos substituintes clorados nos anéis aromáticos.

Langenbach (1994) salientou que é preciso distinguir os resíduos tóxicos, que são os que apresentam efeitos deletérios a algumas formas de vida, dos resíduos persistentes, cuja característica está relacionada com a sua baixa degradabilidade. Analisando a relação entre a estrutura e a biodegradabilidade de resíduos aromáticos, Pitter e Chudoba (1990) concluíram que a biodegradabilidade depende dos tipos, quantidade e posição dos substituintes existentes nas moléculas, com a predominância do tipo de substituintes sendo decisiva quanto a esse aspecto.

2.4 Aplicações dos Basidiomycetes na transformação dos resíduos tóxicos

Dentre a microbiota do solo Alexander (1977) destaca os fungos Basidiomycetes, organismos saprofiticos degradadores de resíduos vegetais produtores de enzimas polifenol-oxidases extracelulares, sendo os microrganismos responsáveis por parte dos ciclos do carbono e nitrogênio que ocorrem no solo.

Devido a estas atividades bioquímicas potenciais dos fungos Basidiomycetes, Pelczar *et al.*, (1980) apontaram estes fungos como importantes fatores em uma série de situações, como na manutenção da fertilidade dos solos e na produção de diversos metabólitos primários e secundários, mas podendo também ser responsáveis por deteriorações de alimentos, madeiras, tecidos e produtos agrícolas, entre outros.

Peyton (1984) em seu trabalho de revisão sobre a disposição de resíduos tóxicos, persistentes ou cumulativos no ambiente, relatou que processos enzimáticos podem catalisar a degradação de vários tipos de resíduos, tornando os métodos biológicos viáveis e, de acordo com Langenbach (1994) vantajosos sobre os processos químicos e físicos, pois os microrganismos estão presentes em praticamente todos os ambientes, muitas vezes já ambientados à presença de resíduos.

Estudando os processos em que os fungos Basidiomycetes da podridão-branca estão envolvidos, Reddy (1995) constatou que os mesmos são capazes de oxidar

vários poluentes ambientais através da atividade das enzimas polifenol-oxidases extracelulares por eles produzidas, como as lacases e as peroxidases, que podem ser aplicadas na destoxificação de resíduos liberados por efluentes industriais no solo (Gianfreda e Bollag, 1994) e na biorremediação de solos contaminados por clorofenóis e produtos similares (Wardle e Hungria, 1994; Lamar et al., 1994).

Vários pesquisadores trabalharam com Basidiomycetes avaliando sua capacidade em transformar ou degradar resíduos fenólicos e aromáticos gerados por diferentes processos industriais e que, eventualmente, podem estar contidos nos efluentes liberados ao ambiente.

2.4.1 Efluentes do branqueamento de polpas kraft

Uma das aplicações de Basidiomycetes mais extensamente estudada tem sido o descoramento dos efluentes escuros originados no processo de branqueamento das polpas kraft. Leach et al., (1978) citam que o tratamento biológico é ainda a melhor técnica para tratar este tipo de efluentes, pois associam uma série de mecanismos, como oxidação química, biodegradação, sorção pela biomassa e precipitação. Porém, nos processos de lagoas aeradas a eficiência é cerca de 20% e nas unidades de lodo ativado situa-se entre 60 e 70%, caracterizando que a biomassa bacteriana não é o fator biológico mais eficiente na transformação destes resíduos.

A aplicação dos fungos Basidiomycetes no tratamento dos efluentes do branqueamento das polpas kraft mostraram resultados satisfatórios porque, segundo Ishihara (1981) nestes fungos existe uma relação entre a atividade ligninolítica com a produção de enzimas polifenol-oxidases, permitindo que tais microrganismos degradem tanto a lignina como os carboidratos contidos nestes efluentes, como a glicose estudada por Kirkpatrick *et al.* (1990) e Bourbonnais e Paice (1992).

Com relação ao descoramento dos efluentes do branqueamento das polpas kraft, os estudos foram realizados principalmente com *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, tal como Eaton *et al.* (1980), que estudaram o descoramento do efluente do primeiro estágio do branqueamento com o *P. chrysosporium*, obtendo remoção de cerca de 60% da cor do efluente entre 2 e 4 dias de incubação, constatando ainda, a possibilidade de reutilizar a biomassa fúngica produzida utilizando como co-substrato a glicose que foi adicionada ao meio, por um período de até 60 dias.

Eaton *et al.*, (1982) trabalharam com o mesmo tipo de efluente do branqueamento kraft, mas compararam a eficiência relativa de descoramento alcançada pelos fungos *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, obtendo uma taxa de remoção de cor de 83% no efluente tratado com *P. chrysosporium* e de 76% para o efluente com *T. versicolor*. Os dados da pesquisa mostraram que o *P. chrysosporium* reduziu a cor do efluente em 60% e a Demanda Química e

Bioquímica de Oxigênio em cerca de 40%, em 5 dias de incubação.

Também trabalhando com o *P. chrysosporium* Sundman et al. (1981) obtiveram cerca de 80% de descoloramento de um efluente de branqueamento kraft, verificando a destruição dos cromóforos contidos no material cromofórico polimérico composto de fragmentos de lignina oxidada contendo cloro e com baixo teor de aromáticos.

Royer et al., (1983) utilizaram o *T. versicolor* imobilizado em pérolas de alginato para tratar o efluente do branqueamento de polpas kraft, conseguindo uma redução de 33% da cor em 10 horas e de 70% em 50 horas de residência no reator. Em outra experiência, o *T. versicolor* foi utilizado diretamente na forma de "pellets" miceliais com adição de glicose, sendo registrado sorção e oxidação dos cromóforos existentes no efluente pelos "pellets", alcançando uma taxa de redução de 30 unidades de cor por grama de micélio por hora (Royer et al., 1985).

Uma comparação da eficiência na remoção de cor do efluente do branqueamento pela enzima peroxidase e pelo *T. versicolor* foi realizada por Paice e Jurasek (1984), sendo utilizada uma solução com concentração de 20 mg L⁻¹ de peroxidase adicionada com vários teores de H₂O₂ e uma cultura de *T. versicolor*. Monitorando o processo foi registrada a maior remoção de cor pelo sistema peroxidase-H₂O₂ nas primeiras 4 horas de contato com redução de 35% da cor e de 28% na solução com o *T.*

versicolor. Após 48 horas a redução da cor foi de 83% na solução do *T. versicolor* e de 65% na solução com peroxidase e peróxido de hidrogênio, mostrando maior eficiência do fungo.

Um processo biológico contínuo foi utilizado por Joyce et al., (1984) para o tratamento de efluentes do branqueamento das polpas kraft utilizando o *P. chrysosporium* num biorreator rotativo, obtendo uma redução de 2.000 unidades de cor $L^{-1} \text{ dia}^{-1}$ devido ao descoramento das cloroligninas existentes no efluente e com custos compatíveis aos dos processos químicos e físicos de remoção de cor de efluentes líquidos.

Archibald et al., (1990) utilizaram "pellets" do *T. versicolor* em um biorreator para avaliar o descoramento de efluente kraft, obtendo em 20 horas uma redução de cor da ordem de 40% no efluente adicionado com glicose e insuflado com oxigênio e de 20% no efluente com glicose e insuflado com ar, não havendo modificação da cor do efluente na amostra sem glicose. Em 50 horas de incubação as taxas de remoção da cor dos efluentes adicionados de glicose foram de 70% nos insuflados com oxigênio e de 60% nos insuflados com ar.

Um estudo sobre o mecanismo de atuação do *P. chrysosporium* nos efluentes kraft foi realizado por Michel Jr. et al., (1991), chegando a resultados que mostraram altas taxas de degradação da cor do efluente em 3 a 4 dias de incubação, detectando-se pouca atividade da lignina-peroxidase, evidenciando que foi a enzima

manganês-peroxidase, entre outras, que teve papel relevante no descoramento. Da mesma forma, Higuchi (1993) estudou o mecanismo da biodegradação da lignina pelos Basidiomycetes da podridão-branca, chegando à conclusão de que a retirada da cadeia lateral e a abertura do anel indicam que tanto a lignina-peroxidase como a lacase estão envolvidas na degradação inicial da lignina, catalisando a reação de oxidação com a transferência de um elétron de compostos fenólicos e não-fenólicos.

2.4.2 Efluentes contendo corantes

Depuy e Rinehart Jr. (1967) citam que desde 1850 dezenas de milhares de corantes têm sido sintetizados e atualmente milhares estão disponíveis no mercado mundial. O grupo de maior importância comercial são os corantes azóicos, derivados do azobenzeno e que têm como característica a presença do grupo azóico (-N=N-) ligado a um sistema de anéis aromáticos, cuja dissociação forma duas aminas aromáticas. Algumas dessas aminas são classificadas como cancerígenas.

Shaul et al., (1991) registraram que os corantes azóicos constituem porção significativa das recomendações do Ato de Controle de Substâncias Tóxicas (Toxic Substances Control Act) pertencente à Agência de Proteção Ambiental (U.S. Environmental Protection Agency - EPA), pois os mesmos geralmente contém de uma a três ligações azo ligando radicais fenil e naftil, que são substituídos com uma combinação de grupos funcionais como o grupo

amino (-NH₂), cloro (-Cl), hidroxila (-OH), metil (-CH₃), nitro (-NO₂) e sal sódico do ácido sulfônico (-SO₃Na), podendo gerar produtos de degradação como aminas aromáticas.

Outro importante grupo de corantes trifenilmetil são os derivados do trifenilmetano. Bumpus e Brock (1988) relataram que em 1986 o Program Genetox da Agência de Proteção Ambiental (U.S. Environmental Protection Agency Genetox Program) considerou alguns corantes do trifenilmetano carcinogênicos, promovendo o crescimento de tumores em algumas espécies de peixes. O cristal violeta e o verde malaquita são compostos que fazem parte desta classe de corantes.

Além dos corantes azóicos e dos derivados do trifenilmetano, são utilizadas industrialmente também as anilinas, que são membros da família química das aminas aromáticas e as anilinas substituídas com cloro e grupos nitro, sulfo e alquil (Lawrence e Marshall, 1994). As anilinas podem ser encontradas no ambiente decorrente das transformações biológicas de herbicidas e fungicidas, bem como de efluentes líquidos de indústrias produtoras de corantes (Hoff *et al.*, 1985).

Pitter e Chudoba (1990) estudando a biodegradabilidade de substâncias orgânicas no ambiente aquático citaram que os corantes de modo geral, não são facilmente biodegradados com tratamentos biológicos. E nas plantas de lodo ativado a remoção dos mesmos ocorre de forma ineficiente, uma vez que estes corantes em

solução praticamente não exibem demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅).

Com respeito à utilização de corantes sintéticos, Weber e Adams (1995) apontaram a indústria têxtil como sendo a principal consumidora de corantes orgânicos sintéticos, chegando a alcançar dois terços do mercado de corantes, dos quais cerca de 50% são corantes azóicos. Citaram também que estimativas recentes indicavam que cerca de 12% dos corantes são perdidos nas operações de manufatura e processamento, e que 20% destas perdas são liberadas no ambiente, transportadas pelos efluentes das plantas de tratamento biológico convencional, que são ineficientes na sua retenção.

Glen e Gold (1983) realizaram um estudo sobre a atividade do *P. chrysosporium* sobre corantes poliméricos sulfonados, constatando que as taxas máximas de descoloramento foram alcançadas após 8 dias de cultivo, significando que a atividade enzimática que atuou nos corantes foi produzida no metabolismo secundário. A atividade foi inibida por altos teores de nitrogênio no meio de cultura, sendo também altamente dependente da presença de oxigênio, o que indica ser uma lacase ou enzima similar.

Klibanov *et al.*, (1980) estudaram a remoção de anilinas e outros compostos fenólicos de águas residuárias utilizando o sistema enzimático peroxidase-peróxido, conseguindo remoções de 72,9% de anilina e de 62,5% de 4-cloroanilina por precipitação dos produtos

formados a partir do efluente, após 3 horas de incubação com a enzima à temperatura ambiente. Também trabalhando com enzimas peroxidases, Alberti e Klibanov (1981) pesquisaram a remoção de anilinas de águas residuárias, obtendo remoções de 84,5% de 4-bromoanilina, 86,4% de 4-fluoroanilina e de 98,6% de 1,3-diaminofenol, em 3 horas de incubação na temperatura ambiente.

Hoff et al., (1985) cujos estudos da atividade do fungo *T. versicolor* sobre anilinas substituídas demonstraram que a lacase produzida pelo fungo catalisou a polimerização de vários tipos de anilinas, chegando a alcançar 100% de remoção da *p*-metoxianilina e da 2,6-dietil-anilina, mas só 35% da *p*-cloroanilina em 6 horas de incubação, demonstrando que o tipo de substituinte do corante pode inibir a atividade da enzima, ocasionando diferentes remoções dos compostos das soluções.

As experiências de Pagga e Brown (1986) sobre a degradação de corantes pelos tratamentos de lodos ativados mostrou que, efetivamente, os corantes não são suscetíveis à rápida biodegradação devido às suas estruturas, e que a remoção de cor dos efluentes, quando ocorre, pode ser como resultado da sorção das moléculas dos corantes pela biomassa fúngica produzida durante o período de incubação.

Com relação à biodegradação dos corantes pelos fungos da podridão-branca, Bumpus e Brock (1988) estudaram a degradação dos corantes derivados do trifenilmetano pelo *P. chrysosporium* e pelos filtrados da

cultura do fungo sobre os corantes cristal violeta, vermelho cresol, verde malaquita e outros, constatando total descoloramento das soluções dos corantes inoculados com *P. chrysosporium* após 48 horas de incubação.

Neste estudo foi constatado também que o filtrado da cultura do *P. chrysosporium* também reduz a concentração dos corantes, chegando a alcançar 14% de descoloramento do cristal violeta por minuto e 45% do verde brilhante por minuto. Além disso, no descoloramento do cristal violeta foram identificados três metabólitos em solução: pentametil-pararosalina, tetrametil-pararosalina, trimetil-pararosalina, produtos que foram formados por uma desmetilação sequencial do cristal violeta.

A biodegradação dos corantes azóicos vermelho congo, Tropaeolin O e Laranja II foi observada por Cripps *et al.*, (1990) nos meios inoculados com *P. chrysosporium*, tanto em culturas contendo altos e baixos teores de nitrogênio, obtendo valores superiores a 90% de redução dos corantes em 5 dias de incubação. Constataram, também, que parte dos corantes foram sorvidos pela biomassa fúngica formada, sendo que 6% do vermelho congo adicionado inicialmente ao meio foi sorvido pelo micélio, enquanto que foi também sorvido 18% do Tropaeolin O e 11% do Laranja II, parecendo que a rápida remoção inicial dos corantes das culturas deve-se principalmente à sorção dos mesmos pelo micélio.

As modificações que ocorrem nos corantes azóicos nos processos de tratamento por lodos ativados também foram abordadas por Shaul *et al.* (1991), que estudaram dezoito corantes azóicos, constatando que onze corantes não sofreram nenhuma modificação pelo tratamento e que quatro foram significativamente sorvidos pelo lodo ativado residual. Os corantes Acid Orange 7, Acid Orange 8 e o Acid Red 88 aparentemente foram biodegradados, pois na experiência utilizando soluções com 5 mg L^{-1} observou-se que menos de 1% dos corantes foi sorvido pelo lodo ativado residual.

Paszczynski *et al.*, (1991) estudaram um novo processo para potencializar a degradação de corantes azóicos pelos fungos Basidiomycetes através da introdução de uma molécula na estrutura dos corantes via ligação azo, fazendo com que as estruturas dos corantes, que são sistemas conjugados multi-insaturados, se tornem acessíveis ao ataque enzimático. Na experiência foi efetuada a ligação de uma molécula de guaiacol ao Amarelo ácido 9 resultando numa maior taxa de biodegradação pelo *P. chrysosporium*, passando de 79% para 94% em 7 dias de incubação.

Paszczynski *et al.*, (1992) compararam as atividades de um fungo da podridão-branca e de uma bactéria na mineralização de corantes azóicos sulfonados contendo grupos sulfo e grupos sulfo e azo juntos. O *P. chrysosporium* mineralizou todos os corantes azóicos sulfonados, sendo observado que o tipo de substituição

não influenciou na suscetibilidade dos corantes à degradação. Já a bactéria *Streptomyces chromofuscus* não foi capaz de mineralizar os corantes contendo os grupos sulfo e grupos sulfo e azo juntos na molécula. Apenas quando foi introduzida uma molécula de guaiacol nas moléculas dos corantes constatou-se que houve mineralização dos mesmos pela atividade da *S. chromofuscus*.

Paszczynski e Crawford (1991) estudaram o papel do álcool veratril na degradação de corantes azóicos pelo *P. chrysosporium*. O álcool veratril estimulou a oxidação do corante azóico pela lignina-peroxidase pura, atuando como um terceiro substrato junto com o peróxido de hidrogênio e o corante. Foram utilizados dez corantes azóicos representando os maiores grupos existentes no mercado mundial, os quais foram inoculados com *P. chrysosporium* e incubados por 10 dias.

Registrou-se degradação de 71,5% dos 200 mg L⁻¹ da concentração inicial de vermelho congo, enquanto que os corantes Biebrich Scarlet e Tetrazina apresentaram mais de 98% de descoramento. Os corantes menos suscetíveis à atividade do *P. chrysosporium* foram o Acid Red 114 com 48,5% de descoramento e o Direct Yellow 27, com 45,4%.

Spadaro et al., (1992) relataram que corantes azóicos foram degradados pelo *P. chrysosporium* em condições limitantes de nitrogênio e devido ao metabolismo secundário do fungo. Após 12 dias houve

mineralizações dos corantes variando de 23,1% a 48,1%, com as maiores taxas de degradação ocorrendo nos anéis aromáticos contendo grupos hidroxila, amino, acetamida e nitro. Pelos resultados obtidos, os autores sugeriram que o *P. chrysosporium* tem potencial para realizar o clareamento de efluentes de tecelagens e para a biorremediação de solos contaminados com corantes.

Spadaro et al., (1994) também estudaram a degradação química de corantes contendo os grupos fenil-azo utilizando o sistema $Fe^{3+}-H_2O_2$, como um método alternativo para remover corantes azóicos de efluentes industriais. Há degradação de parte destes corantes a CO_2 nesta reação mas também há geração de benzeno, um poluente mais poderoso que os próprios corantes.

O *P. chrysosporium* tem sido bastante utilizado na biodegradação de corantes azóicos, Capalash e Sharma (1992) pesquisaram dezoito corantes sintéticos para têxteis e observaram a biodegradação de oito em proporções que variaram entre 40 e 73%, e que a remoção ocorreu por uma conjugação de atividade enzimática e por sorção de uma parcela dos corantes na biomassa.

Pasti-Grigsby et al., (1992) utilizaram vinte e dois corantes azóicos para estudar a influência dos grupos substituintes nas taxas de biodegradabilidade, visando aumentar a biodegradabilidade dos corantes mas sem afetar sua estrutura química. Para tanto, utilizaram o *P. chrysosporium* e cinco estirpes de *Streptomyces*, constatando que 7 corantes foram degradados por todas as

estirpes de *Streptomyces* em níveis variando de 20 a 90%, já o *P. chrysosporium* degradou todos os corantes em níveis de 18 a 94%.

Chao e Lee (1994) pesquisaram dois corantes azóicos (Amarant e Laranja G) e um corante heterocíclico (Azure B), para avaliar se o pré-cultivo do *P. chrysosporium* com fontes de carbono selecionadas junto com ácido verátrico podia influir no descoramento destes tipos de corantes, tendo sido obtidos bons resultados utilizando a glicose como fonte de carbono.

Ollikka et al., (1993) pesquisaram o descoramento de corantes azóicos, do trifenilmetano, heterocíclicos e poliméricos por três isoenzimas do *P. chrysosporium*, cujos resultados mostraram que o descoramento decresceu quando não foi adicionado álcool veratril ao meio de cultura. Isto denota que o álcool veratril, um composto relacionado à estrutura da lignina, atua como mediador da reação de degradação dos corantes.

O estudo do descoramento de um efluente têxtil industrial foi realizado por Kirby et al., (1995), no qual foi obtido o descoramento de seis dos nove corantes têxteis sintéticos na presença de glicose e três foram descorados sem glicose num período de 7 dias de incubação. Apesar das conclusões de Cripps et al., (1990) sugerirem que parte do descoramento resultar da ligação do corante ao micélio, nesta experiência a remoção de cor pela sorção no micélio foi extremamente pequena, pouco contribuindo para o processo.

Para entender o mecanismo de descoloramento e degradação dos corantes azóicos, Goszczynski et al., (1994) trabalharam com corantes azóicos sulfonados, que são os mais numerosos dos corantes sintéticos fabricados. Estes corantes apresentam grandes diferenças estruturais e, por isso, não são igualmente suscetíveis ao ataque microbiano. Na experiência foram utilizadas enzimas produzidas pelo *P. chrysosporium* atuando sobre o ácido sulfônico 3,5-dimetil-4-hidroxi-azobenzeno e sulfonamida 3-metoxi-4,4-hidroxi-azobenzeno, sendo constatado um descoloramento quase total dos dois corantes após 2 horas de incubação. Foram observadas quebras simétricas e assimétricas das moléculas dos dois corantes, gerando diferentes quinonas e outros compostos que são vulneráveis a posteriores reações de redução, oxidação e hidrólise.

Yesilada (1995) estudou o descoloramento do corante derivado do trifenilmetano cristal violeta pelos fungos *T. versicolor* e *P. chrysosporium* entre outros, verificando que em 3 dias de incubação ocorreu um descoloramento da ordem de 92% ocasionado pelo *T. versicolor* e de 62% pelo *P. chrysosporium*. Foi registrado também que após este período a biomassa do *T. versicolor* apresentava uma sorção de 4,5% e a do *P. chrysosporium* 25% do cristal violeta inicialmente adicionado.

2.4.3 Outras aplicações dos Basidiomycetes

Além da aplicação no tratamento de efluentes do branqueamento das polpas kraft e nos efluentes contendo corantes sintéticos, os Basidiomycetes também têm sido utilizados em diversos tipos de substratos suscetíveis à atividade das enzimas polifenol-oxidases por eles produzidas.

A transformação estrutural de resíduos lignocelulolíticos como a palha de trigo, com a finalidade de aumentar sua digestibilidade para os ruminantes foi estudada por Agosin et al., (1985) e Endres (1995) utilizando os fungos *P. chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Cyathus stercoreus*, obtendo resultados que mostraram que todos os componentes da palha, celulose, hemicelulose e lignina, foram degradados pelos fungos, mas em diferentes graus de intensidade. Zadrazil (1985) pesquisou cento e cinquenta espécies de fungos com a finalidade de estabelecer os mais eficazes na transformação da palha de trigo em substrato apto para alimentar ruminantes, encontrando que várias espécies apresentam características promissoras para aumentar a digestibilidade de tal substrato.

O cultivo de dezoito fungos da podridão-branca, entre eles o *P. sanguineus* e o *T. versicolor*, sobre resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar foi realizado por Rolz et al., (1987) durante 6 semanas a 20°C, após o que se constatou que o *P. sanguineus* reduziu a lignina em 32,3% e o *T. versicolor*, em 38,9%. Rolz et al., (1988)

também pesquisaram vinte e seis fungos da podridão-branca cultivados sobre polpa de café constatando que o *P. sanguineus* reduziu o teor de polifenóis em 38,4% enquanto que com *T. versicolor* esta redução foi de 58,9%, mostrando que há atividade de polifenol-oxidases por parte destes dois fungos.

Outra importante linha de pesquisa desenvolvida com os fungos da podridão-branca tem sido a busca de mineralização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Bumpus (1989) pesquisou a capacidade do *P. chrysosporium* em degradar HPAs presentes no destilado do alcatrão do carvão, obtendo cerca de 70 a 100% de desaparecimento dos HPAs em 27 dias de incubação. Sutherland (1992) pesquisou um grupo variado de fungos quanto à habilidade em destoxificar HPAs contendo, entre outros, antraceno, benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, naftaleno e fenantreno. Obteve resultados que mostram que os HPAs foram transformados por vários fungos em dihidrodiois, fenóis, quinonas, tetralonas e outros metabólitos, que são menos tóxicos que os produtos originais.

Bogan e Lamar (1996) utilizaram o *Phanerochaete laevis* para degradar HPAs, registrando que em meios com baixos níveis de nitrogênio a produção de manganês-peroxidase foi elevada, pouca lacase foi detectada e nenhuma lignina-peroxidase. Foram transformados intensamente antraceno, fenantreno, benzo[a]pireno e benzo[a]antraceno. Bezalel et al., (1996) cultivando

Pleurotus ostreatus sobre vários tipos de HPAs obtiveram reduções de 7% de catecol, 3% de fenantreno e 0,19% de benzo[a]pireno em 11 dias de incubação. Foram observadas atividades das enzimas lacase e manganês-peroxidase, mas não foi possível relacioná-las com as degradações dos HPAs.

Além do uso direto das culturas fúngicas sobre determinados tipos de substratos, alguns pesquisadores utilizaram os filtrados das culturas dos fungos para avaliar sua capacidade de transformação, como foi o caso de Shannon e Bartha (1988) que utilizaram o filtrado contendo lacase produzida pelo *Geotrichum candidum* sobre poluentes lixiviáveis tóxicos do solo, conseguindo a degradação de mais de 90% do 4-metilfenol em dois dias e de 88% do 2,4-diclorofenol em duas semanas. Ruggiero et al., (1989) trabalhando com uma lacase do *T. versicolor* imobilizada em argila conseguiram remover mais de 95% do 2,4-diclorofenol adicionado ao solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Uma balança analítica e uma balança de precisão foram utilizadas no preparo dos meios de cultura, soluções tampão e soluções salinas de corantes. Os meios de cultura, soluções tampão e salinas, vidraria e demais utensílios foram esterilizados em autoclave vertical marca Phoenix.

As inoculações dos meios solidificados, líquidos e semi-sólidos foram executadas numa câmara de fluxo laminar horizontal marca Veeco. Nas incubações dos diversos meios de cultura utilizaram-se estufas bacteriológicas marca Fabbe e Fanem, que foram também utilizadas na quantificação do teor de umidade dos meios semi-sólidos. Nas incubações realizadas com caldos de extrato de malte mantidos sob agitação foi utilizado um incubador horizontal orbital marca Superohm.

A separação dos caldos sobrenadantes da biomassa fúngica produzida foi realizada com auxílio de centrífuga Fanem. A padronização do método e as quantificações da atividade enzimática da lacase produzidas nos experimentos, bem como o monitoramento da variação da

absorbância das soluções de corantes foi realizada em fotocolorímetro Varian Techtron, série 634, utilizando-se cuvetas de 3 mL. A variação do pH das soluções de corantes foi monitorada em medidor de pH Digimed, modelo DMPH-2, na temperatura de 25°C.

3.2 Reagentes e meios de cultura

Uma lista das abreviaturas das estirpes dos fungos, dos meios de cultura líquidos, sólidos e semi-sólidos utilizados e que são citados ao longo do texto são apresentados no Apêndice I. Os meios de cultura solidificados utilizados nos experimentos foram o ágar batata dextrose (ágar BD), o ágar extrato de malte (ágar EM), o ágar batata dextrose-ácido tânico (ágar BDT) e o ágar farelo de trigo (ágar FT), cujas composições são apresentadas nos Apêndices II e III, respectivamente.

Os meios líquidos utilizados nos experimentos foram o caldo extrato de malte e o caldo de extrato de malte com 100 mg L⁻¹ de glicose (caldos EM e EMG), o caldo de Bushnell-Haas e o caldo de Bushnell-Haas com 100 mg L⁻¹ de glicose (caldos BH e BHG), cujas composições são apresentadas no Apêndice IV. Como meios semi-sólidos foram utilizados o farelo de trigo proveniente do Moinho da Fronteira S.A., com 11% de fibra bruta composta de frações de, aproximadamente, 10,5% de celulose, 22% de hemicelulose e 3,6% de lignina (Mendez *et al.*, 1992), polpa kraft delignificada proveniente da Riocell, Guaiba-

RS, serragem da madeira cedrinho (*Cedrella* spp.) e algodão hidrófilo comercial marca Topz.

Os corantes utilizados na pesquisa foram os seguintes:

1) vermelho congo, sal dissódico 3,3'-[[1,1'Bifenil] 4,4'-diylbis-(azo)]bis [4-amino-1-ácido naftalenesulfônico] produto Merck 2.493, Índice de Cor (I.C.) 22.120.

2) verde malaquita, cloreto de fenil-fenilmetileno N-[4-[[4-(Dimetilamino) fenil]fenilmetileno] 2,5-ciclohexadieno-1-ylidene]-N-cloreto-metilmetanamino; bis [cloreto p-(dimetilamino)- fenil] fenilmetileno, produto Merck 5.581, I.C. 42.000.

3) azul de metileno, cloreto 3,7-bis (dimetilamino) fenazationio, I.C. 52.015, produto Merck 5.979.

4) violeta cristal, cloreto de N-[4-[Bis[4-(dimetilamino)-fenil] metileno]-2,5-ciclohexadieno-1-ylidene]-N-metilmetanaminio, produto Merck 4.287, I.C. 42.555.

5) anilina verde com sulfato de sódio e anilinas vinho e vermelha com cloreto de sódio, da Indústria e Comércio Guarany S.A., São Paulo.

Os espectros de varredura do vermelho congo e do verde malaquita foram feitos medindo-se a absorbância na temperatura de 25°C nos comprimentos de onda visível variando de 400 a 600nm na solução aquosa do corante vermelho congo e de 580 a 660nm na solução do verde malaquita. As soluções aquosas foram feitas com 25 mg L⁻¹

dos corantes, com valores de pH ajustados em 5,0 e 6,0. Os espectros de varredura das soluções destes dois corantes são apresentados no Apêndice V.

As curvas-padrão das soluções do vermelho congo e do verde malaquita foram feitas em caldo BH com concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 mg L⁻¹, medindo a absorbância na temperatura de 25°C, nos comprimentos de onda de 488nm e 617nm, respectivamente, onde ocorre a máxima absorção de cada um dos corantes Merck Index (1989).

A máxima absorção nestes comprimentos de onda foi comprovada pelos valores obtidos nos espectros de varredura das soluções dos dois corantes. Também foram feitas curvas-padrão destas mesmas soluções diluídas na proporção de 1:3 com água destilada, medindo-se a absorbância na temperatura de 25°C.

Na quantificação da enzima lacase extracelular produzida pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* foi utilizada siringaldazina (4-hidroxi, 3,5-dimetoxi-benzaldeido azina), produto Sigma Código S 7896, de peso molecular 360,4, em soluções utilizando como solventes o álcool etílico e posteriormente o álcool metílico (soluções SYR-E e SYR-M).

No decorrer das quantificações da enzima lacase adicionou-se 2,0 mL de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,0 ± 0,1 às misturas de reação. As composições das soluções de siringaldazina e a forma de preparar a solução tampão são apresentadas no Apêndice VI.

Todos os reagentes utilizados na pesquisa apresentaram qualidade analítica ou eram de qualidade para uso microbiológico. As soluções utilizadas nos diversos experimentos foram esterilizadas por um período padronizado de 15 minutos a 103 kPa (121°C) antes das inoculações com os fungos. As outras condições de esterilização que foram utilizadas fora das condições padronizadas são indicadas nas partes apropriadas do texto.

3.3 Culturas-padrão, manutenção e inoculação

As culturas-padrão dos Basidiomycetes *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr., estirpe 20 - ICN, (*P. sanguineus*) e do *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pilát., estirpe 74-ICN, (*T. versicolor*), foram fornecidas pela Professora Rosa Guerrero, do Departamento de Botânica da UFRGS, tendo sido isoladas e examinadas por Susin (1987), pertencendo ao herbário da Fundação Universidade do Rio Grande sob números 3020 e 3074, respectivamente. A origem e as denominações das estirpes destes Basidiomycetes utilizados na pesquisa são apresentados no Apêndice VII.

Estas estirpes foram recebidas em ágar batata dextrose, repicadas para tubos de ensaio e placas de Petri contendo meios de ágar BD e ágar farelo de trigo. Após incubação por um período de 7 dias a 30°C, foram armazenadas como cultura-estoque as culturas mantidas em ágar FT e as culturas de trabalho aquelas mantidas em ágar BD, ambas estocadas na temperatura de + 4°C. Em

intervalos de 6 meses foram feitas reinoculações das culturas-estoque em ágar FT e as culturas de trabalho em ágar BD.

Em todos os ensaios realizados, as inoculações dos meios solidificados, semi-sólidos e líquidos com *P. sanguineus* e *T. versicolor* foram executadas através da utilização de discos de ágar BD com 20 mm de diâmetro, retirados da região periférica das colônias dos dois fungos após os mesmos terem sido cultivados em placas de Petri entre 7 e 10 dias a 30°C.

3.4 Condições gerais das experiências

As experiências foram realizadas com repetições, algumas sendo executadas com 5 repetições, como na elaboração das curvas-padrão dos corantes vermelho congo e verde malaquita, na avaliação das taxas de crescimento radial, na produção de biomassa, quantificação da atividade enzimática e avaliação da atividade dos fungos sobre os corantes em meios líquidos. Na avaliação da atividade dos fungos nos meios semi-sólidos e sobre os corantes em meios solidificados, as experiências foram conduzidas com 3 repetições.

Os períodos de incubação dos meios solidificados, semi-sólidos e líquidos variaram de 3 a 20 dias, as temperaturas das incubações situaram-se numa faixa de 20 a 35°C e os valores de pH dos meios líquidos foram 5, 6 e 7. As combinações desses parâmetros que foram efetuadas

no decorrer das diversas experiências são descritas no Capítulo de Resultados e Discussão.

As inoculações dos diferentes meios de cultura e soluções foram realizadas com discos de ágar BD de 20 mm de diâmetro retirados da região periférica das colônias dos fungos após um período de incubação entre 5 e 7 dias, servindo como inóculos-padrão. Os procedimentos de inoculação diferiram em função dos meios, utilizando-se um disco de inóculo colocado no centro das placas de Petri para avaliação das taxas de crescimento radial e da atividade dos fungos sobre as soluções dos corantes vermelho congo, verde malaquita, violeta cristal e azul de metileno em meios solidificados pela adição de 2,0% de ágar.

Nas experiências realizadas com os meios líquidos e semi-sólidos o procedimento para a inoculação dos dois tipos de meios foi o de utilizar a proporção de um disco de inóculo para cada 25 mL dos meios líquidos, e de um disco de inóculo para cada 10 g dos meios semi-sólidos.

Nos meios solidificados inoculados com *P. sanguineus* e *T. versicolor* utilizaram-se os meios ágar BD e ágar EM para medir o crescimento radial, o ágar BD e o ágar BDT para avaliar a atividade dos fungos sobre os corantes e a sua reação na presença de ácido tânico em meio solidificado.

Nos meios líquidos inoculados com *P. sanguineus* e com *T. versicolor* foi utilizado o caldo EM para quantificar as produções de lacase e de biomassa fúngica.

Os caldos BH com vermelho congo e verde malaquita foram utilizados para estudar as reações dos fungos na presença dos dois corantes; os meios semi-sólidos compostos com farelo de trigo, polpa kraft, serragem e algodão serviram para avaliar o crescimento micelial e produção da enzima lacase.

As experiências seguiram uma seqüência composta das etapas de preparo dos meios de cultura, inoculação e incubação a 30°C e 35°C por períodos pré-determinados, com posterior avaliação dos resultados obtidos. A observação dos meios durante o período de incubação, a retirada das amostras e as diferentes quantificações foram realizadas normalmente em intervalos de 24 e 48 horas.

O crescimento em meios solidificados e semi-sólidos, o monitoramento da variação da absorbância e da concentração dos corantes em meios líquidos, a produção de lacase e a variação do pH em meios líquidos foi realizada em intervalos de 48 horas. Os períodos máximos de incubação das soluções com vermelho congo e verde malaquita foram de 10 dias, após o qual foi avaliada a biomassa formada, a variação da concentração dos corantes, bem como a sorção dos corantes pelos micélios e pelos discos de ágar dos inóculos.

3.5 Crescimento radial e reação com ácido tânico

O crescimento radial do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* foi quantificado utilizando placas de Petri

com ágar BD e ágar EM, inicialmente em pH 5,0 e, nos ensaios posteriores nos pH 5,0, 6,0 e 7,0 e nas temperaturas de 20, 30 e 35°C.

Para medir o crescimento radial dos fungos foram traçadas sobre cada placa duas linhas transversais, medindo-se sobre estas linhas com régua milimetrada, a partir de 48 horas do início da incubação, os diâmetros das colônias em intervalos de 24 horas (Pirt, 1975; Lonergan *et al.*, 1993), até o recobrimento total da superfície das placas pelos fungos. As taxas de crescimento radial médio diário de cada estirpe fúngica foram calculadas pelo seguinte procedimento:

- com as 10 medidas das 5 repetições, realizadas a cada 24 horas, foi calculado o valor médio do crescimento alcançado;

- com esses valores foram calculadas as taxas de crescimento médio diário para cada tipo de meio de cultura, temperatura de incubação e pH utilizados;

- as taxas médias diárias de crescimento radial foram obtidas pela divisão à metade, das taxas médias diárias de crescimento, expressando-se os resultados obtidos para cada fungo em mm dia⁻¹.

Na experiência com ácido tânico utilizou-se o ágar BDT, que é o ágar batata dextrose adicionado de 0,5% de ácido tânico (p/p). Após a inoculação com os fungos, incubaram-se as placas com *P. sanguineus* a 35°C e as placas com *T. versicolor* a 30°C por um período de 5 dias. Depois desse período foi feita uma observação visual das

placas para constatar o efeito ocasionado pela atividade dos fungos sobre o ácido tânico.

3.6 Padronização da quantificação da lacase

A metodologia para quantificação da lacase foi padronizada pelo uso de misturas de reação compostas de caldos de extrato de malte (caldos EM), com valores iniciais de pH 6,0 e 7,0, inoculados separadamente com *P. sanguineus* e *T. versicolor* e incubados por diferentes períodos de tempo; soluções de siringaldazina com concentrações variando de 0,25 a 2,0 mM, inicialmente elaboradas com etanol e, posteriormente, com metanol (soluções SYR-E e SYR-M) conforme sugerido por Harkin e Obst (1973) e utilizadas por Leonowicz e Grzywnowicz (1981); Dubourdieu et al., (1984) e Palmieri et al., (1993); além de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,1$ (Szklarz e Leonowicz, 1986).

A atividade enzimática da lacase foi quantificada em misturas de reação contendo caldos EM, EMG, BH e BHG pela quantificação das taxas de variação da absorbância medidas no comprimento de onda de 525nm (Harkin e Obst, 1973; Bollag e Leonowicz, 1984), efetuando as leituras em intervalos de 1 minuto durante um período de 5 minutos. A calibração do fotocolorímetro foi realizada com água destilada antes do início das leituras da absorbância das soluções.

Uma unidade enzimática de lacase foi definida como sendo a variação, medida no comprimento de onda de

525nm, de 0,001 unidades de absorvância por minuto, em 3 mL de mistura de reação, em pH 5,0 e 25°C, utilizando-se a siringaldazina como substrato para a lacase.

No transcorrer das experiências de padronização do método de quantificação da lacase foi sendo modificada a composição das misturas de reação, sendo utilizadas as seguintes composições:

3.6.1 Primeira experiência

a)- misturas de reação com 2,0, 4,0 e 9,0 volumes de caldo EM com pH inicial 6,0, incubado 10 dias com *P. sanguineus* e com *T. versicolor*, para 1,0 volume de solução SYR-E com 1 mM em etanol, obtendo uma concentração final de 10^{-3} mM de siringaldazina.

b)- misturas de reação com 0,75, 1,5 e 3,0 volumes de solução SYR-E com 1 mM em etanol, para 1,0 volume de caldo EM com pH inicial 6,0, incubado 10 dias com *P. sanguineus* e com *T. versicolor* e 2,5 volumes de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,1$, obtendo concentrações finais de 75×10^{-5} ; 15×10^{-4} e 3×10^{-3} mM de siringaldazina.

3.6.2 Segunda experiência

c)- misturas de reação contendo 0,2 mL de caldos EM com valores iniciais de pH 6,0 e 7,0, incubados 20 dias com *T. versicolor*, em concentrações de 100, 75, 50, 37,5 e 25%; 0,2 mL de solução SYR-M 1 mM e 2,5 mL de

solução tampão citrato fosfato pH $5,0 \pm 0,1$, com concentração final de 2×10^{-4} mM de siringaldazina.

3.6.3 Terceira experiência

d)- misturas de reação contendo 0,2 mL do caldo EM com pH inicial 7,0, incubado 20 dias com *T. versicolor*, diluído na proporção de 3:1 e de 1:1 com água destilada pH 6,0 e solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,1$; 2,5 mL de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,1$ e 0,2 mL de solução SYR-M 1 mM, com concentração final de 2×10^{-4} mM de siringaldazina.

3.6.4 Quarta experiência

e)- misturas de reação com 0,2 mL dos caldos EM com pH inicial 6,0 e 7,0, incubados 20 dias com *T. versicolor*; 0,2 mL de solução SYR-M com 0,25; 1,0; 1,5 e 2,0 mM; 2,5 mL de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,1$, obtendo misturas de reação com concentrações finais de $0,5 \times 10^{-4}$; 2×10^{-4} ; 3×10^{-4} e 4×10^{-4} mM de siringaldazina.

A partir destas experiências de padronização da quantificação da lacase ficou estabelecido a utilização de misturas de reação com a composição básica sugerida por Bollag e Leonowicz (1984), utilizando 0,2 mL de solução SYR-M 1 mM (Palmieri et al., 1993), 0,2 mL dos caldos EM após incubação com *P. sanguineus* e com *T.*

versicolor, respectivamente, e 2,5 mL de solução citrato fosfato 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,1$ (Szklarz e Leonowicz, 1986).

Nas experiências realizadas com corantes, a quantificação da lacase foi efetuada utilizando misturas de reação com a composição básica de Bollag e Leonowicz (1984), com caldos BH com pH inicial 5,0 e 6,0, adicionados de corantes e incubados com *P. sanguineus* e com *T. versicolor* em diferentes períodos. As medidas da variação da absorvância foram feitas nas soluções sem diluição e diluídas com água destilada na proporção de 1:3.

3.7 Crescimento em meios líquidos e produção de biomassa

Para avaliar as taxas de crescimento e produção de biomassa de cada fungo foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de caldo EM com pH 5,0. Estes frascos foram inoculados, separadamente, com discos de ágar BD de 20 mm de diâmetro com micélios de *P. sanguineus* e de *T. versicolor*. Foram avaliadas também as biomassas produzidas em caldos BH e BHG, e em caldos BH e BHG adicionados dos corantes vermelho congo e verde malaquita.

Nas experiências realizadas com caldos EM avaliaram-se o crescimento e a produção de biomassa pelos fungos num período de 5 dias, bem como a influência de diferentes idades do inóculo nas taxas de crescimento. Nos caldos BH e BHG com e sem corantes, avaliaram-se as

biomassas produzidas pelos dois fungos após 10 dias de incubação.

Em todas as experiências realizadas foi adotado o seguinte procedimento para quantificação das biomassas produzidas, levando em consideração as recomendações de Milstein et al., (1981).

a) após o período de incubação, as biomassas produzidas pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor*, respectivamente, foram separadas dos discos de inóculo e dos caldos sobrenadantes de cada frasco;

b) estas biomassas foram colocadas em discos de papel de filtro previamente secados até peso constante, e daí em estufa a 60°C até obtenção de peso constante;

c) os pesos secos das biomassas formadas pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* foram obtidos pelas diferenças de peso dos papéis de filtro com as biomassas e seus pesos secos iniciais.

3.8 Crescimento em meios semi-sólidos

Nas experiências realizadas com meios semi-sólidos contendo substratos como farelo de trigo, polpa kraft, algodão e serragem de madeira, foi adicionada água destilada até obtenção de umidade entre 70 e 80% (p/p) base úmida, conforme recomendado por Chahal (1985); Abdullah et al. (1985); Reid (1989); Roussos et al. (1991) e Ortega et al. (1993).

A proporção de água e farelo de trigo foi de 2:1, utilizando-se placas de Petri com 35 g de farelo e 70 g

de água e frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 10 g de farelo e 20 g de água, ficando nas placas e frascos Erlenmeyer uma camada com 1 a 2 cm de espessura de meio semi-sólido, conforme recomendado por Abdullah et al., (1985).

Após a adição de água, os Erlenmeyers com o farelo de trigo foram esterilizados a 103 kPa (121°C) por 60 minutos, e as placas de Petri por 30 minutos. As placas e frascos foram inoculados, individualmente, com 1 disco de ágar BD com 20 mm de diâmetro, uma série com micélio do *P. sanguineus* e outra com *T. versicolor*, incubados em estufas bacteriológicas a 35°C e 30°C respectivamente.

As placas foram incubadas 5 dias e os Erlenmeyers 20 dias, a cada 5 dias retirando frascos de cada estirpe e extraíndo as enzimas produzidas pelo método de Roussos et al., (1991), pela adição de porções de 5 mL de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,0 ± 0,1 em cada frasco, agitando-os por 15 minutos a 180 rpm, decantando-se a parte sólida e avaliando-se a atividade enzimática da lacase no sobrenadante utilizando misturas de reação com a composição básica proposta por Bollag e Leonowicz (1984).

Além do farelo de trigo, a polpa kraft de eucalipto proveniente da Indústria de Celulose Riocell, também foi utilizada em porções de 5 g nas quais foram adicionados 5 g de água destilada, obtendo-se um teor final de umidade de 56% (p/p) em base úmida,

esterilizando-se a 103 kPa (121°C) por 30 minutos, e inoculando as placas com discos de ágar BD com 20 mm de diâmetro, uma série contendo *P. sanguineus* e outra contendo *T. versicolor*, incubando-as a 35°C e 30°C, respectivamente, por um período de 15 dias.

Foi utilizado também como substrato semi-sólido o algodão hidrófilo comercial, marca Topz, no qual foi adicionado água destilada até obtenção de umidade, em base úmida, de 90% (p/p), esterilizando-se a 103 kPa (121°C) por 30 minutos, e inoculando uma série de placas com *P. sanguineus* e outra com *T. versicolor*, incubando-as de forma idêntica à polpa kraft.

A serragem de cedrinho (*Cedrella* spp.) foi utilizada na forma de meio solidificado pela adição de 2% de ágar e de 13,5% (p/p), de serragem em caldo BH, esterilizando por 30 minutos a 103 kPa (121°C), vertendo nas placas de Petri, inoculando e incubando nas mesmas condições que a polpa kraft e o algodão hidrófilo.

3.9 Corantes em meios líquidos e solidificados

As experiências com corantes foram realizadas utilizando-os em soluções aquosas e em caldos de Bushnell-Haas (caldos BH) e em meios solidificados pela adição de 2% de ágar às soluções, adotando-se os procedimentos descritos.

(a) soluções das anilinas de cor vermelha (λ máximo = 560nm), vinho (λ máximo = 400nm) e verde (λ máximo = 640nm), com concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg

L⁻¹ em caldos BH, foram subdivididas em porções de 25 mL em frascos Erlenmeyer, esterilizando-as a 103 kPa (121°C) e inoculando uma série de frascos com *P. sanguineus* e outra série com *T. versicolor*. Após a inoculação, os frascos com *P. sanguineus* foram incubados a 35°C e os com *T. versicolor* a 30°C por um período de 20 dias.

As absorbâncias das soluções das anilinas foram medidas nos comprimentos de onda da máxima absorção de cada uma das anilinas, utilizando-se uma mistura de 2,0 mL de água destilada e 0,5 mL das soluções de anilina. As leituras da absorbância foram feitas antes da inoculação das soluções e após em intervalos de 5 dias.

(b) Na avaliação da atividade existente no caldo de extrato de malte (caldo EM) após um período de incubação com *T. versicolor* utilizou-se solução aquosa com 25 mg L⁻¹ de anilina de cor vermelha. A solução da anilina foi esterilizada a 103 kPa (121°C) por 15 minutos e misturada com caldo EM com pH 6,0, incubado 20 dias com *T. versicolor*, numa mistura de reação composta de 2,0 mL da solução de anilina e 0,2 mL do caldo EM. A absorbância da mistura foi monitorada no comprimento de onda de 560nm e temperatura de 25°C, em intervalos de 1 minuto, durante um período de 10 minutos.

c) As anilinas em meio solidificado foram testadas quanto às suas reações aos fungos adicionando-se 2% de ágar à solução aquosa com 25 mg L⁻¹ de anilina vermelha e às soluções com 15 mg L⁻¹ das anilinas verde e vinho. As soluções foram esterilizadas a 103 kPa (121°C)

por 15 minutos e inoculadas com discos de ágar BD de 20 mm de diâmetro. Sendo uma série de placas com *P. sanguineus* e outra série com *T. versicolor*, incubando-as a 35 e 30°C, respectivamente e avaliando as modificações ocorridas em intervalos de 48 horas durante 12 dias.

d) Os corantes vermelho congo e verde malaquita foram utilizados em meios solidificados de ágar BD com 25 mg L⁻¹ de cada corante em placas de Petri. Depois de inocular uma série de placas de cada corante com discos de ágar BD com 20 mm de diâmetro com *P. sanguineus* e outra série com *T. versicolor*, as placas foram incubadas por 10 dias, observando-as visualmente após 5 e 10 dias.

e) Avaliação de soluções de vermelho congo (λ máximo= 488nm) e verde malaquita (λ máximo= 617nm) com 25 mg L⁻¹ em caldo de Bushnell-Haas (caldos BH) e caldo de Bushnell-Haas com 100 mg L⁻¹ de glicose (caldos BHG), em pH 5 e 6, pela inoculação de frascos com 100 mL das soluções com 1 disco de ágar BD com 20 mm de diâmetro, uma série com *P. sanguineus* e outra com *T. versicolor*, monitorando da variação da concentração dos corantes nas soluções através da medida das absorvâncias em intervalos de 48 horas.

f) Avaliação da sorção de vermelho congo e verde malaquita pela biomassa produzida pelos dois fungos e pelos discos de ágar BD do inóculo foi realizada pela imersão dos micélios em 50 mL de água destilada e mantidos por um período de 48 horas com regulares agitações, ao cabo do qual foram medidas as absorvâncias

das soluções obtidas com as biomassas produzidas no vermelho congo e no verde malaquita.

A sorção dos corantes pelos discos de ágar BD foi testada através da imersão de discos de ágar BD não inoculado, na mesma proporção que a utilizada nos experimentos, em 100 mL de soluções BH contendo 25 mg L⁻¹ de vermelho congo e verde malaquita, respectivamente, medindo a variação da absorbância das soluções dos corantes nos comprimentos de onda de maior absorção de cada corante no período de 5 e 10 dias.

3.10 Análise estatística

Na maioria das experiências realizadas nesta pesquisa foram calculadas a média e o desvio padrão dos resultados obtidos, calculando-se a dispersão dos valores dentro de um intervalo de confiança de 95% de probabilidade, calculado de acordo com o sugerido por Parker (1979) para médias de pequenas amostras. As fórmulas utilizadas para os cálculos dos intervalos de confiança são apresentadas no Apêndice VIII.

Nas outras experiências que foram realizadas, como na quantificação do crescimento radial e as variações na concentração e no valor do pH das soluções com vermelho congo e verde malaquita em caldos BH e BHG, os resultados obtidos nos diversos experimentos foram analisados estatisticamente através de procedimentos normais de análise de variância e pela aplicação do teste

Tukey para comparação de médias, ao nível de 5% de probabilidade.

Para a realização desta análise estatística dos resultados obtidos nas soluções de vermelho congo e verde malaquita inoculadas com *P. sanguineus* e *T. versicolor* foi utilizado o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG 6.0, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1996.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Introdução

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nas experiências realizadas nas diferentes etapas da pesquisa, bem como também as discussões relacionadas com os resultados obtidos em cada experiência. Foram estudadas as condições de cultivo mais adequadas ao crescimento dos fungos e à produção da enzima lacase, a padronização dos procedimentos para a quantificação da atividade da lacase, bem como a comparação das taxas de crescimento e de produção de biomassa pelos fungos sob diferentes condições, além de avaliar a sua atividade sobre corantes sintéticos do tipo anilinas, sobre corantes azóicos e derivados do trifenilmetano.

Na pesquisa realizada foram utilizados dois fungos Basidiomycetes cujas estirpes foram isoladas por Susin (1987), sendo que o *Pycnoporus sanguineus* foi encontrado sobre Araucárias, Eucalyptus, Pinus e mata nativa, já o *Trametes versicolor* foi encontrado sobre Eucalyptus e Pinus. A razão da escolha de fungos Basidiomycetes para esta pesquisa é que tais organismos têm capacidade para produzir um grande número de enzimas

extracelulares, o que os torna capazes de atacar matéria orgânica de diferentes tipos de árvores, como mostra o trabalho de Susin (1987). O *P. sanguineus*, apesar de ser um microrganismo abundante na região sul do Brasil não tem sido muito pesquisado com relação às enzimas oxidases por ele produzidas, havendo poucas informações sobre o mesmo na literatura.

Entre os fungos da classe *Basidiomycetes* a maioria das espécies são decompositores de madeira e saprófitos da serrapilheira e do solo (Silveira e Guerrero, 1991). Attili et al., (1993), relatam que os fungos dessa classe são essencialmente terrestres, degradadores de madeiras ou produtores de substâncias tóxicas, sendo bastante distribuídos e, na sua maioria, saprófitas. Entretanto, podem ser parasitas de plantas.

As experiências com estes fungos foram iniciadas com a medição e comparação do crescimento radial em meios adicionados de ágar, como ágar batata dextrose (ágar BD) e ágar extrato de malte (ágar EM), pois de acordo com Pirt (1975) um dos métodos básicos de estudo de espécies microbianas é propiciar o crescimento em meios sólidos, sendo fundamental calcular a taxa de crescimento radial, pois estas taxas indicam as condições mais propícias ao desenvolvimento dos microrganismos. Lonergan et al., (1993) citam que a quantificação das taxas de crescimento radial pode ser feita em placas de Petri, inoculando os substratos com discos de ágar com o micélio dos fungos numa fase de crescimento padronizada.

A comparação das taxas de crescimento radial do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* serviram como referência para estabelecer os intervalos de temperatura e pH adequados às duas estirpes utilizadas na pesquisa, de modo a propiciar um ambiente com características favoráveis a ambos.

4.2 Crescimento radial sob diferentes pH e temperaturas

As taxas de crescimento radial foram quantificadas de acordo com a metodologia descrita no sub-título 3.5, com a experiência realizada com *P. sanguineus* em ágar BD e ágar EM com pH 5,0 e temperaturas de 20, 30 e 35°C. As taxas de crescimento radial apresentaram valores variando de 4,6 a 6,3 mm dia⁻¹ na temperatura de 20°C, e de 8,8 a 13,5 mm dia⁻¹ entre as temperaturas de 30 e 35°C, valores situados num intervalo de confiança de 95% de probabilidade (I.C. 95%).

Pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, constatou-se que não houve diferença significativa nas taxas de crescimento radial do *P. sanguineus* nos meios ágar BD e ágar EM nas temperaturas de incubação utilizadas na experiência. Com relação aos meios de cultura para cultivo dos fungos, Attili et al., (1993) citam o ágar BD e o ágar EM como meios de uso geral, salientando que o ágar BD estimula o crescimento micelial, o que não foi constatado nessa experiência com o *P. sanguineus*.

Não havendo diferença significativa no crescimento do *P. sanguineus* nos dois meios solidificados, adotou-se o ágar BD para avaliar as taxas de crescimento e manutenção das culturas-estoque, principalmente pelo fato de ser o meio de cultura de menor custo e de ser bastante adequado para cultivo de fungos.

Esta experiência também permitiu evidenciar a influência que as temperaturas de incubação apresentaram sobre as taxas de crescimento do *P. sanguineus*, pois pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, constataram-se diferenças significativas nas taxas de crescimento em todas as temperaturas de incubação. Para se ter uma idéia mais clara das diferentes taxas de crescimento, entre 30 e 35°C o fungo recobriu totalmente a superfície das placas em cerca de 5 dias, o que a 20°C só ocorreu após 7 dias de incubação.

4.2.1 Influência do pH e temperatura

Nesta experiência empregaram-se meios ágar BD com pH 5,0; 6,0 e 7,0, incubando-se as placas nas temperaturas de 20, 30 e 35°C, e obtendo as taxas de crescimento do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* que são apresentadas na figura 1.

A observação dos valores apresentados na figura 1 permitiram registrar que na temperatura de 20°C e em todos os valores de pH, as taxas diárias de crescimento radial do *P. sanguineus*, com valor médio de 4,0 mm dia⁻¹

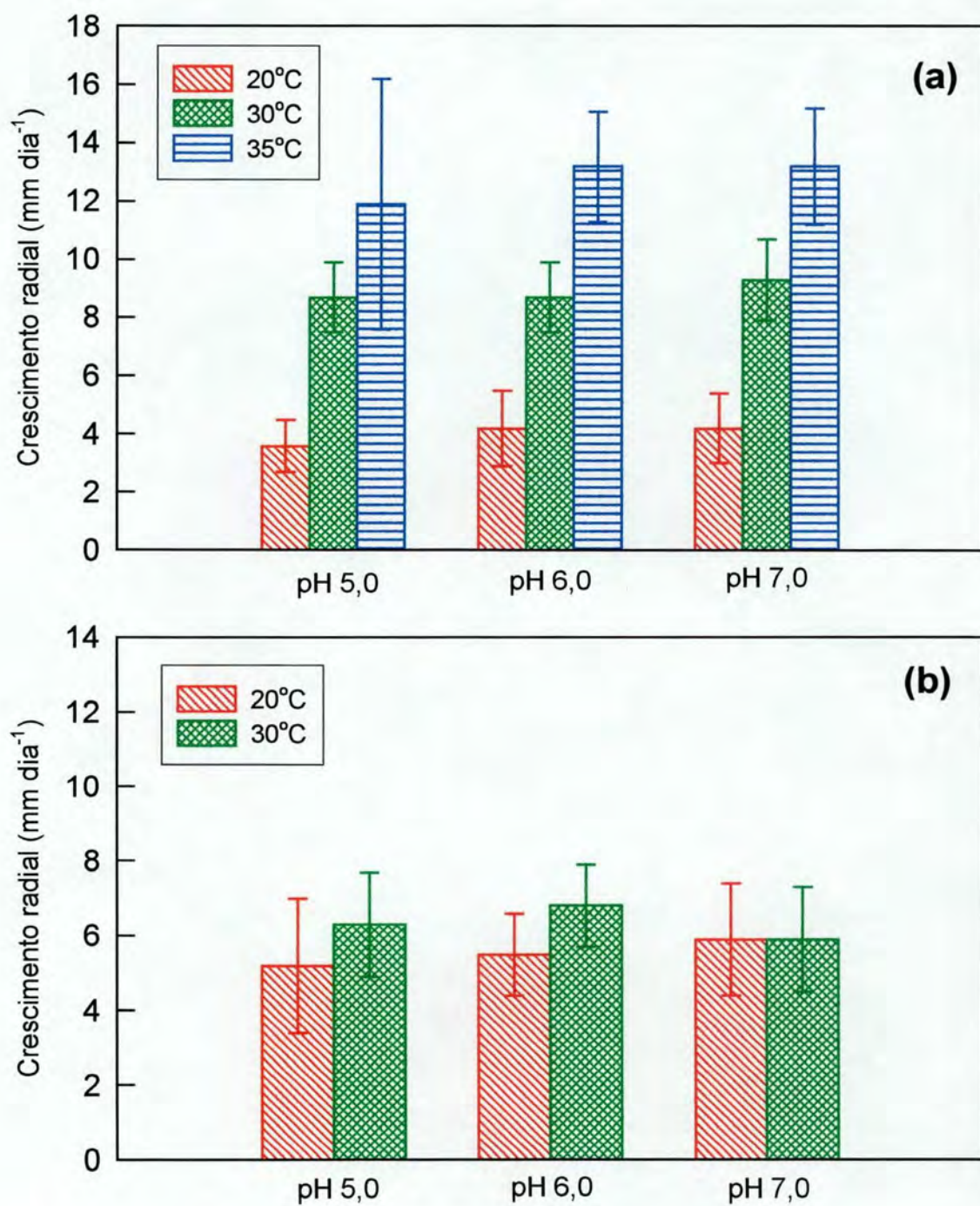


Figura 1: Crescimento radial do *Pycnoporus sanguineus* (a) e *Trametes versicolor* (b) sobre ágar BD pH 5,0, 6,0 e 7,0 a 20, 30 e 35°C. Barras indicam desvio padrão, n=5.

e situadas entre 3,4 e 4,6 mm dia⁻¹ (I.C. 95%), foram similares que as do *T. versicolor*, com valor médio de 5,5 mm dia⁻¹ e valores entre 4,9 e 6,1 mm dia⁻¹ (I.C. 95%). Os valores obtidos a 30°C mostraram situação idêntica, com o *P. sanguineus* apresentando taxas diárias de crescimento com valor médio de 8,9 mm dia⁻¹ e situadas entre 8,2 e 9,5 mm dia⁻¹ (I.C. 95%), em todos os valores de pH, e com o *T. versicolor* com valor médio de 6,3 mm dia⁻¹ e situadas entre 5,4 e 7,1 mm dia⁻¹ (I.C. 95%).

Na temperatura de 35°C as taxas diárias de crescimento do *P. sanguineus* apresentaram valor médio de 12,8 mm dia⁻¹, variando de 11,4 a 14,1 mm dia⁻¹, mas não se observou crescimento do *T. versicolor* nessa temperatura, confirmando o relatado por Eaton (1985), de que não constatou crescimento do *T. versicolor* em temperatura superior a 27°C, além de que diversas referências de autores que trabalharam com este fungo citaram temperaturas de cultivo de 20°C (Bourbonnais et al., 1995), 25°C (Fähraeus e Ljunggren, 1961; Blaich e Esser, 1975), 27°C (Bettucci et. al., 1992) e 30°C (Davis e Burns, 1990, 1992; Lonergan e Baker, 1995), mas nenhuma referência citando o cultivo do *T. versicolor* em temperaturas superiores a 30°C.

Pelos valores da figura 1 é possível assinalar que o *P. sanguineus* apresentou as maiores taxas de crescimento na temperatura de 35°C e nos meios com pH 6,0 e 7,0, ao passo que o *T. versicolor* não apresentou diferença nas taxas de crescimento nas temperaturas de 20

e 30°C em todos os valores de pH. Como o *P. sanguineus* apresentou valores idênticos nas suas taxas de crescimento a 30°C nos meios com pH 5,0 e 6,0 e similares às taxas do *T. versicolor*, optou-se por realizar todas as experiências com os dois fungos utilizando os meios de cultura com pH 5,0 e 6,0.

O *T. versicolor* demonstrou sensibilidade à temperaturas superiores a 30°C, apresentando um crescimento lento e pouco uniforme, cuja medição só pode ser realizada após 48 horas de incubação, pois não foi observado crescimento do fungo nesse período de tempo. Pirt (1975) relata que os fungos necessitam de um período de tempo para adaptação ao ambiente, após o qual a taxa de crescimento se torna constante. Devido a esta característica do *T. versicolor*, as medições das taxas de crescimento foram realizadas após 48 horas de incubação, tanto nas placas inoculadas com *P. sanguineus* como com *T. versicolor*.

As taxas de crescimento radial do *T. versicolor* evidenciaram similaridade com os valores encontrados por Blaich e Esser (1975) para uma estirpe do *T. versicolor*, alcançando 6 mm dia⁻¹ a 25°C e por Bettucci et al., (1992) com taxas de crescimento entre 5 e 10 mm dia⁻¹ a 27°C. Constatou-se também, analisando estatisticamente os valores das taxas de crescimento do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* que não há diferença significativa entre elas em decorrência do valor do pH dos meios.

Os resultados das experiências de crescimento radial em meio ágar BD ressaltam a característica do *P. sanguineus* ser estimulado em temperaturas superiores a 30°C, tornando-o capaz de ser aplicado a diferentes condições ambientais nos processos de biorremediação, pois de acordo com Reddy (1995) os fungos da podridão-branca são microrganismos capazes de degradar ou mineralizar uma grande variedade de poluentes tóxicos ambientais, pois seus sistemas enzimáticos extracelulares apresentam capacidade de transformar ou degradar uma ampla gama de substratos.

Para as experiências posteriores com os dois fungos, o *P. sanguineus* foi cultivado a 35°C e o *T. versicolor* a 30°C, em meios com pH 5,0 e 6,0, condições similares às utilizadas por Lonergan e Baker (1995) que cultivaram o *Pycnoporus cinnabarinus* e *P. coccineus* temperaturas de 37°C, e o *T. versicolor* na temperatura de 30°C.

4.2.2 Efeito sobre o ácido tânico em meio solidificado

Pela figura 2 vê-se o aspecto gerado pelos dois fungos no meio de ágar BD com ácido tânico após 5 dias de incubação, distinguindo-se o crescimento micelial e o escurecimento do meio na zona periférica das colônias devido à produção e secreção de enzimas polifenol-oxidases, entre as quais encontra-se a lacase, que são responsáveis pela oxidação do ácido tânico. Não foi

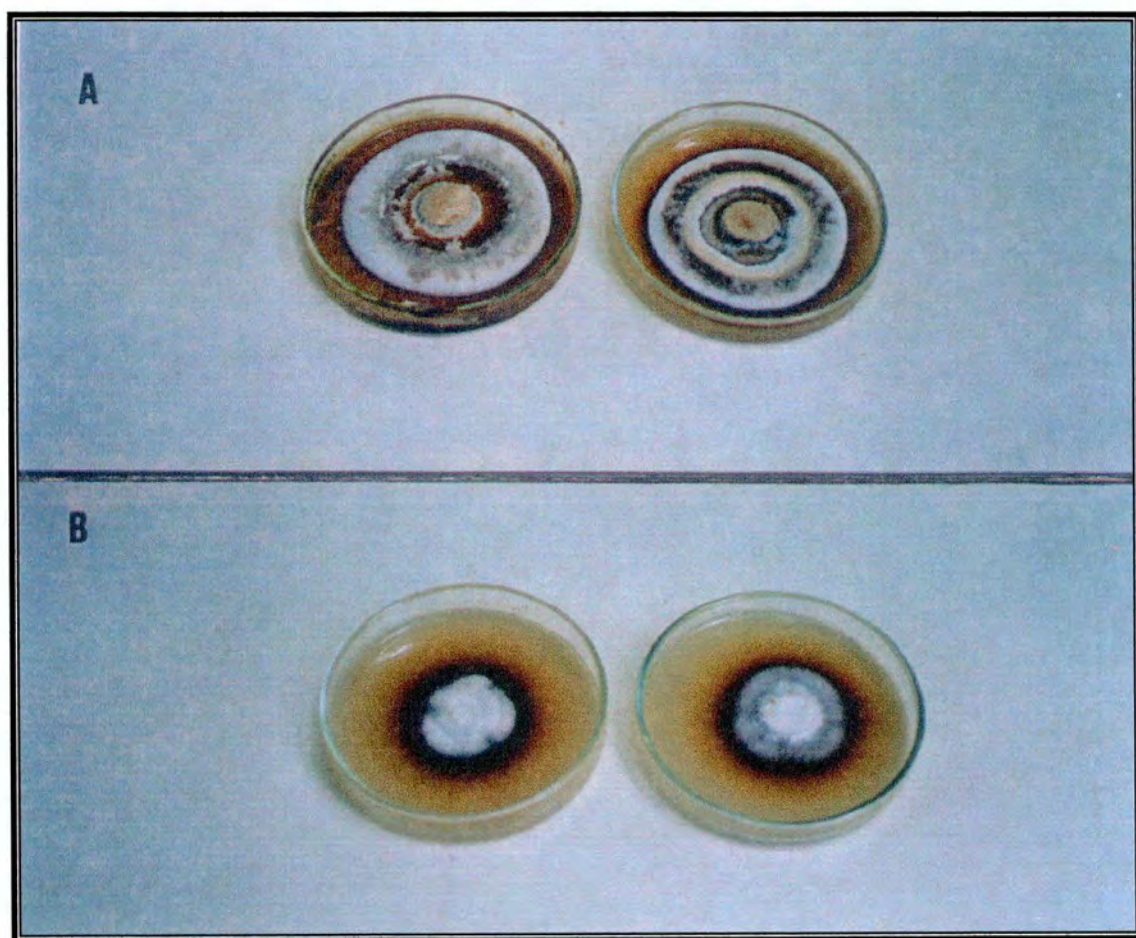


Figura 2: Culturas de 5 dias do *Pycnoporus sanguineus* (A) e *Trametes versicolor* (B) sobre ágar batata dextrose com 0,5% de ácido tânico (ágar BDT), a 35 e 30°, respectivamente.

quantificada a lacase produzida pelos dois fungos nesta experiência.

Observando-se as placas constatou-se o maior crescimento do *P. sanguineus* em comparação ao *T. versicolor*, mas com ambos os fungos produzindo halos escuros ao redor das zonas de crescimento, devido à produção de enzimas polifenol-oxidases, incluindo a lacase, pois na oxidação de substratos fenólicos mediada pela lacase, o passo inicial é a produção de intermediários tipicamente instáveis, que podem sofrer reações não enzimáticas de polimerização, com formação de produtos amorfos e insolúveis do tipo melaninas (Bollag et al., 1979; Salgues et al., 1986; Davis e Burns, 1992; Thurston, 1994).

4.3 Atividade sobre corantes em meios solidificados

A observação da atividade dos fungos sobre corantes em meios solidificados com ágar visaram indicar se os corantes têm suscetibilidade à ação dos fungos, de modo a dar continuidade nas experiências utilizando os fungos para transformar substâncias corantes.

Objetivou-se, nessa experiência, apenas constatar o crescimento dos fungos e as conseqüentes modificações do aspecto das culturas e dos corantes propriamente ditos pela atividade fúngica desenvolvida no período de incubação, utilizando-se para tanto corantes como anilinas, azóicos, derivados do trifenilmetano e

heterocíclicos. As placas foram examinadas sob lupa para observar crescimento e descoloramento.

4.3.1 Atividade sobre Anilinas

Na experiência com anilinas em meios solidificados foi seguida a metodologia descrita na alinea (c) do sub-título 3.9. Após 3 dias de incubação constatou-se, a olho nú, crescimento micelial do *P. sanguineus* sobre as placas com as anilinas vermelha e verde, mas sem descoloramento. Nas placas inoculadas com *T. versicolor* só foi possível observar o micélio com auxílio de lupa com magnificação de 20X, sendo observado leve descoloramento da anilina verde na região ao redor do inóculo.

Depois de 10 dias de incubação constatou-se que as placas apresentavam o aspecto mostrado nas Figuras 3 e 4. Pela figura 3 vê-se que a anilina vermelha foi descorada apenas pelo *T. versicolor*, que não mostrou crescimento micelial visível a olho nú. Com o *P. sanguineus*, entretanto, o resultado foi diferente, pois houve crescimento visível do fungo mas não afetando a coloração original do meio.

O aspecto das placas com a anilina verde após o mesmo período de incubação, que é apresentado na figura 4, demonstrou que esta anilina foi suscetível à atividade tanto do *P. sanguineus* como do *T. versicolor*, devido à observação de seu intenso descoloramento, não sendo também registrado crescimento do *T. versicolor*.

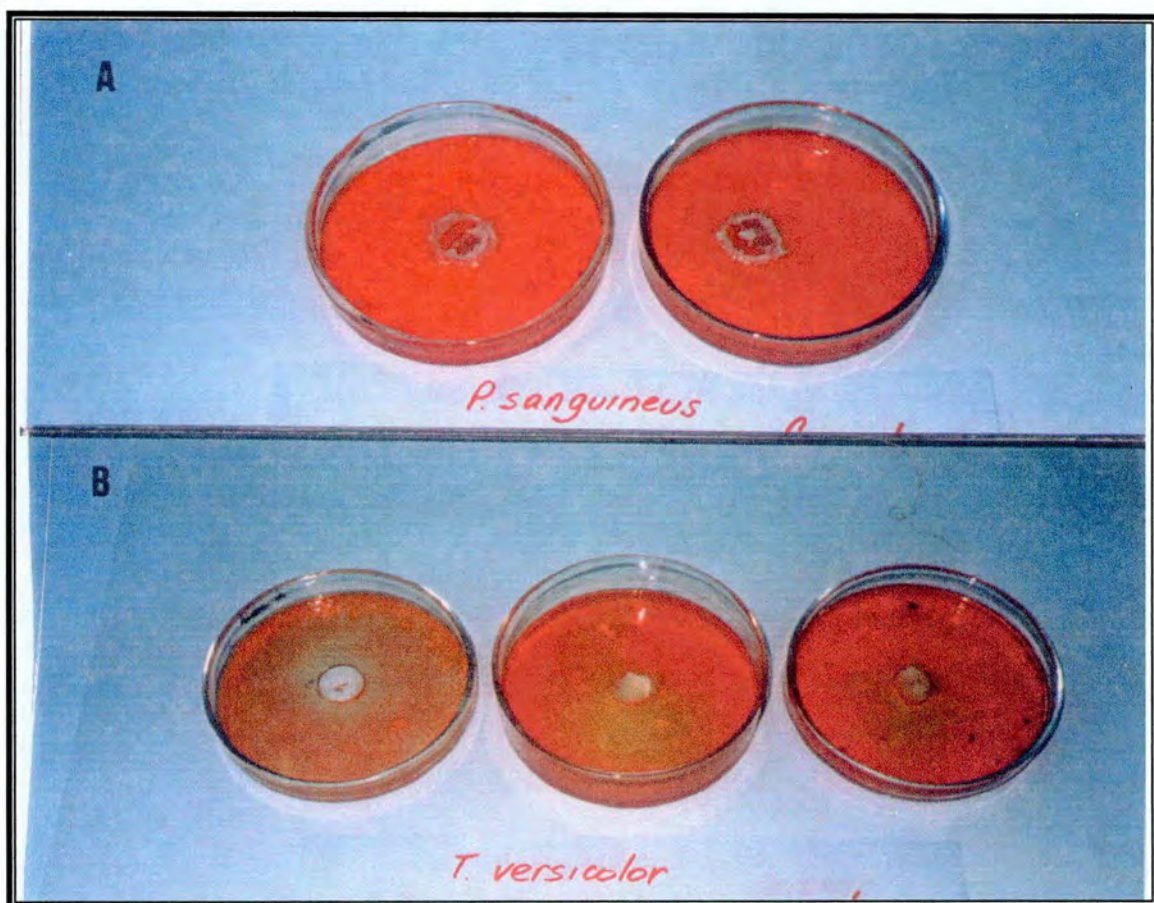


Figura 3: Culturas de 10 dias do *Pycnoporus sanguineus* (A) e *Trametes versicolor* (B) sobre os meios solidificados com ágar e 25 mg L⁻¹ de anilina vermelha, a 35 e 30°, respectivamente.

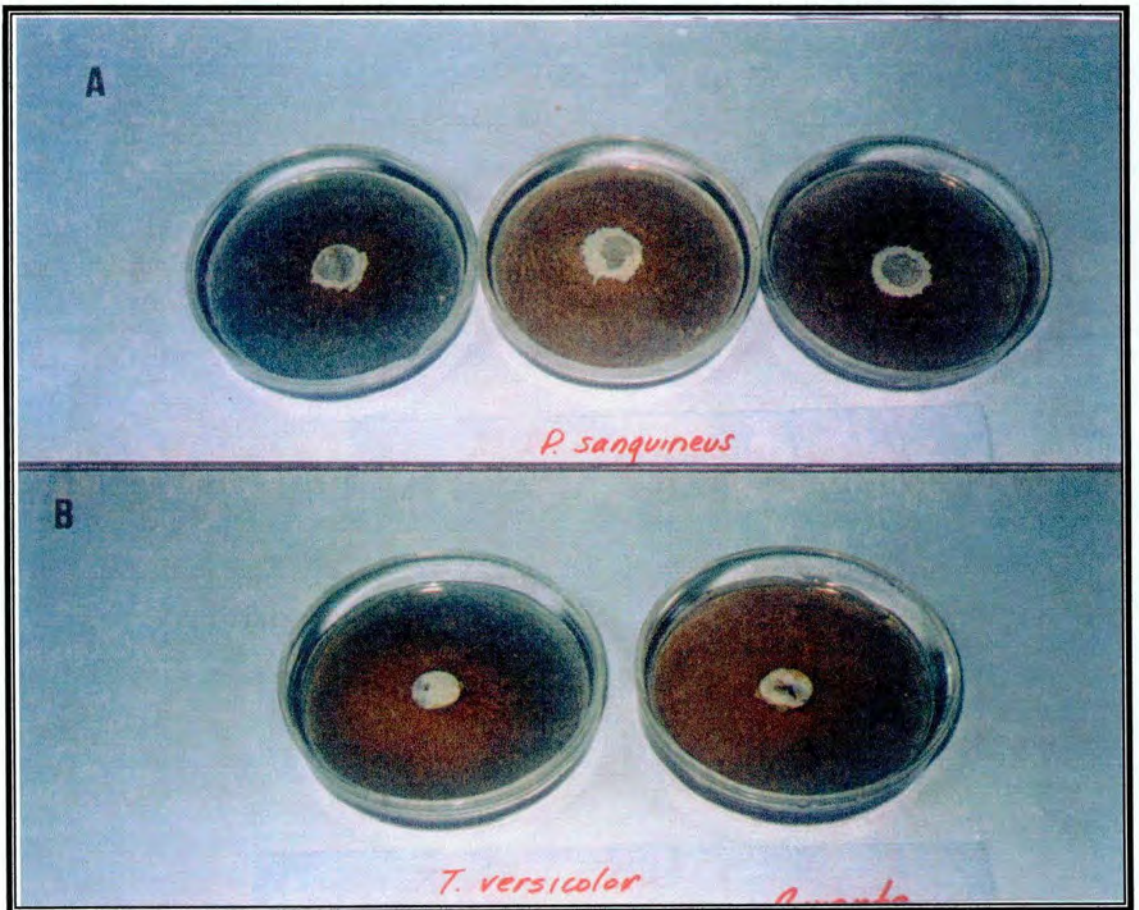


Figura 4: Culturas de 10 dias do *Pycnoporus sanguineus* (A) e *Trametes versicolor* (B) sobre os meios solidificados com ágar e 15 mg L^{-1} de anilina verde, a 35 e 30° , respectivamente.

A atividade dos fungos sobre as anilinas vermelha e verde em meios solidificados mostram reações diferentes para cada anilina. Isso provavelmente mostra que diferentes sistemas enzimáticos são responsáveis por corantes com estruturas específicas. Ficou evidenciado também que o *T. versicolor*, mesmo sem crescimento visível a olho nú, parece difundir sistemas enzimáticos através do meio solidificado, capazes de descorar as anilinas, provavelmente contendo a enzima lacase. Nestas experiências foram observados apenas as modificações dos corantes, não sendo quantificada a lacase.

Estes resultados mostraram que os fungos Basidiomycetes são capazes de transformar substâncias corantes, conforme citado por Hoff *et al.*, (1985) que mostraram que a lacase do *T. versicolor* é capaz de descorar várias anilinas substituídas, e que a biodegradabilidade das anilinas pode variar, dependendo do tipo, número e posição dos substituintes (Pitter e Chudoba, 1990)

4.3.2 Atividade sobre o vermelho congo e verde malaquita

O representante do corante azóico empregado na pesquisa foi o vermelho congo, e o corante derivado do trifenilmetano foi o verde malaquita, utilizados em meios solidificados com ágar e inoculados com *P. sanguineus* e *T. versicolor*, de acordo com a metodologia descrita na alínea (d) do sub-título 3.9, e cujas culturas após 10

dias de incubação apresentavam o aspecto mostrado na figura 5.

A figura 5 mostra que, após o período de 10 dias de incubação o crescimento dos fungos recobriu completamente as superfícies das placas dos dois corantes. Da mesma forma, foi possível registrar que as atividades de cada fungo foram diferenciadas, pois o *T. versicolor* cresceu e descorou os dois corantes, constatado pela existência do micélio branco produzido. O *P. sanguineus* também cresceu sobre os dois corantes, mas somente sorveu os corantes pelo micélio produzido, que apresenta a cor original dos corantes.

Estes resultados demonstraram que houve efeito enzimático sobre os dois corantes pelo *T. versicolor*, enquanto que o *P. sanguineus* reduziu a coloração também por sorção no micélio produzido. A biodegradação do vermelho congo foi obtida com *Phanerochaete chrysosporium* por Cripps et al., (1990), obtendo uma biodegradação aeróbia de 93% da coloração original em 24 horas, e Ollikka et al., (1993) utilizaram a enzima bruta do *P. chrysosporium* e obtiveram 54% de descoramento do v. congo em 24 horas. Também com *P. chrysosporium*, Bumpus e Brock (1988) descoraram o verde malaquita em cerca de 76,8% após 24 horas.

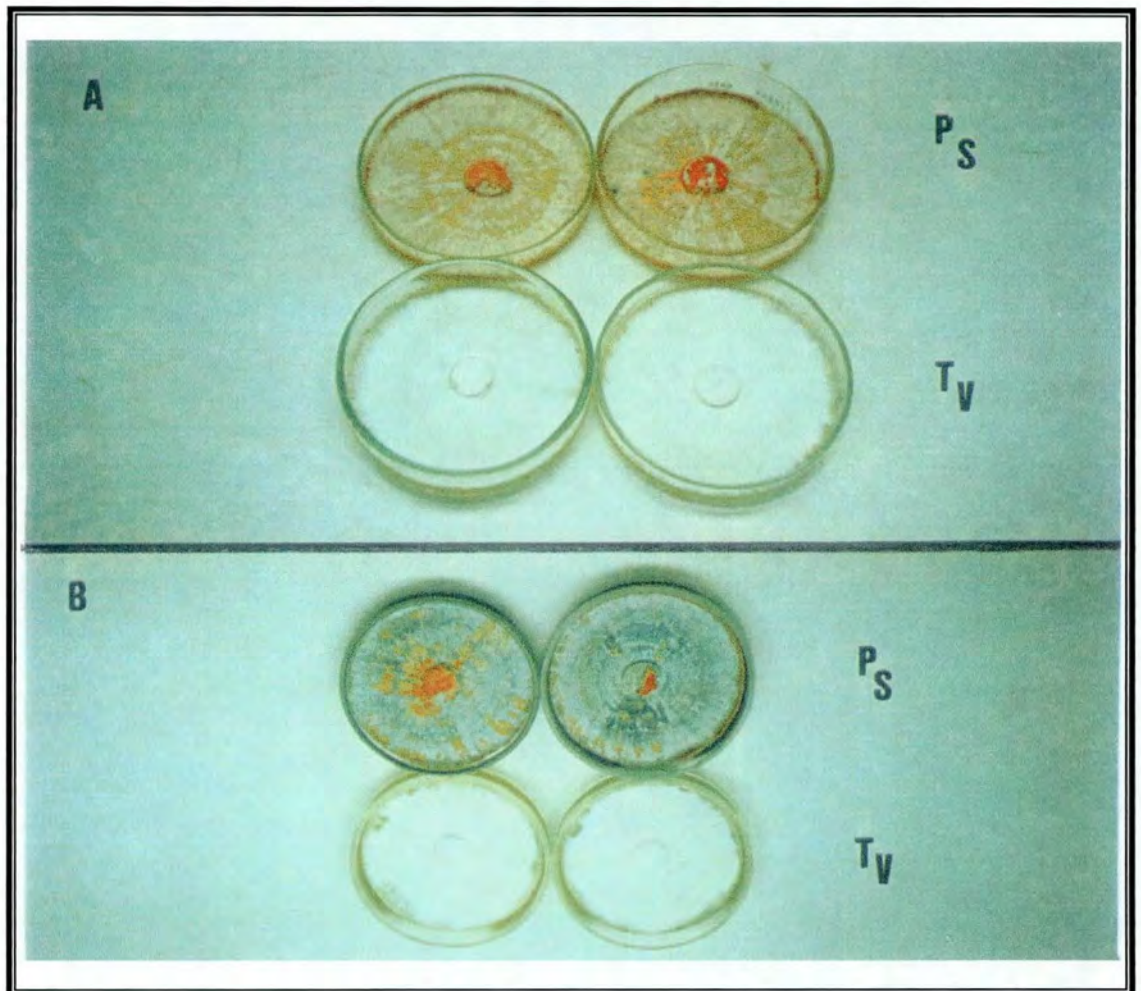


Figura 5: Culturas de 10 dias do *Pycnoporus sanguineus* (Ps) e *Trametes versicolor* (Tv) sobre ágar batata dextrose com 25 mg L^{-1} de vermelho congo (A) e verde malaquita (B), a 35° e 30° , respectivamente.

4.3.3 Atividade sobre violeta cristal e azul de metileno

O violeta cristal é um corante derivado do trifenilmetano, sendo utilizado em têxteis e pigmentos, e o azul de metileno é um importante corante heterocíclico, utilizado para colorir papéis e de uso analítico. A incubação destes corantes em meios solidificados inoculados com *P. sanguineus* e *T. versicolor* por um período de 10 dias ocasionou as modificações na coloração original dos corantes mostradas na figura 6.

Da mesma forma que ocorreu nas placas com vermelho congo e verde malaquita, também nestes corantes a atividade enzimática do *T. versicolor* foi bem mais intensa do que a do *P. sanguineus*, com crescimento micelial recobrindo toda superfície das placas e descorando completamente os dois corantes, o que não foi obtido nas placas inoculadas com *P. sanguineus*, que além de manter a cor original dos corantes não conseguiu recobrir totalmente a superfície das placas com violeta cristal.

4.4 Quantificação da lacase

Como substrato para a quantificação da lacase foi escolhida a siringaldazina, composto descrito no subtítulo 3.2 e proposto em 1973 por Harkin e Obst para detectar enzimas polifenol-oxidases produzidas por fungos e vegetais. A siringaldazina tem a característica de desenvolver intensa cor púrpura ao sofrer oxidação

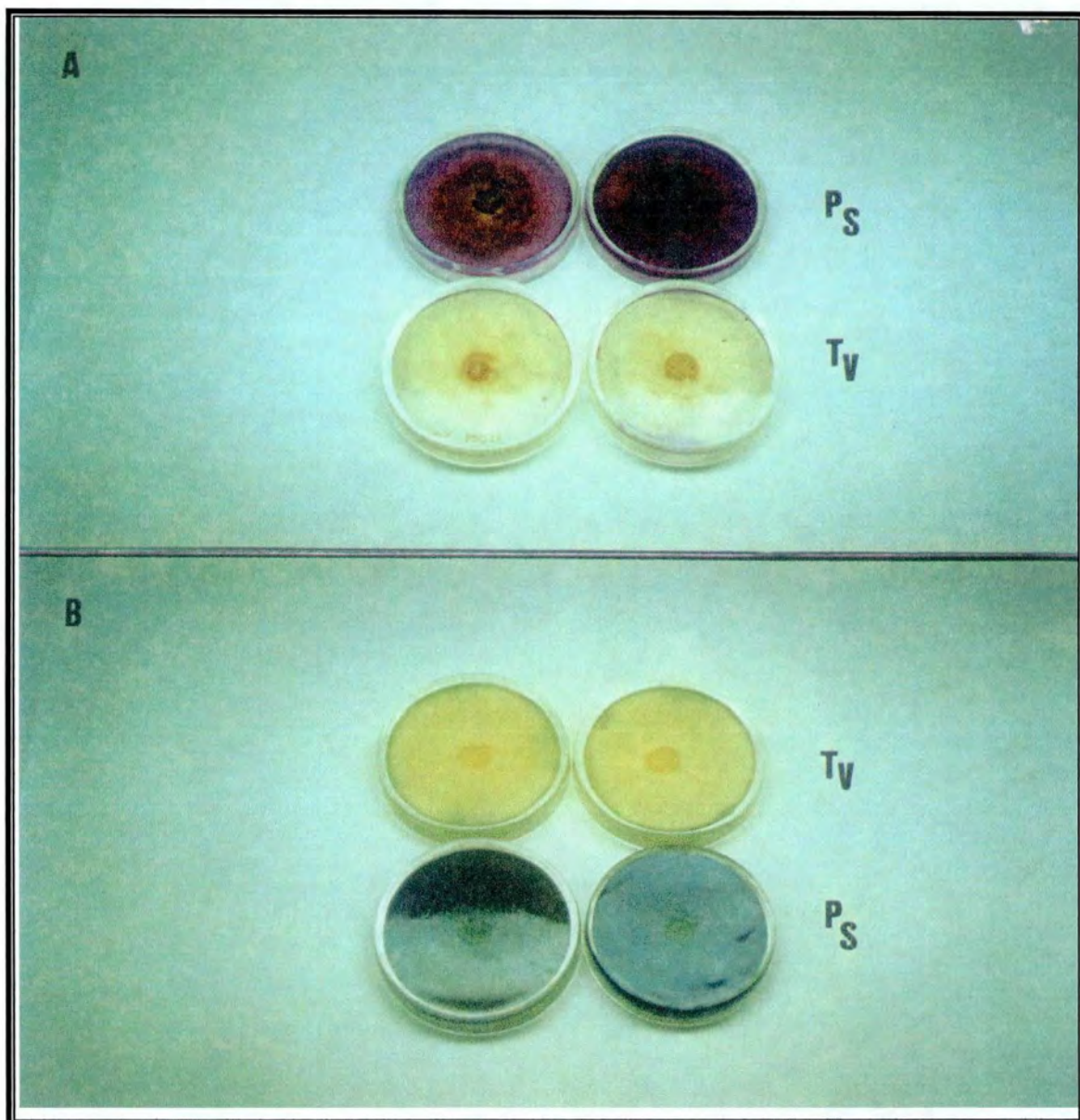
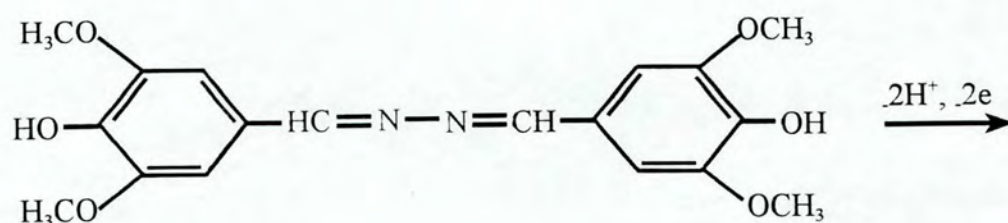
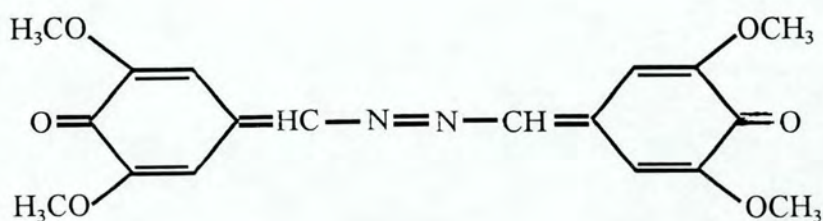


Figura 6: Culturas de 10 dias do *Pycnoporus sanguineus* (Ps) e *Trametes versicolor* (Tv) sobre ágar batata dextrose com 25 mg L⁻¹ de violeta cristal (A) e azul de metileno (B), a 35 e 30°C, respectivamente.

catalisada por este tipo de enzimas, decorrente da formação do composto tetrametoxi-azo-bis metileno quinona, na reação típica mostrada na figura 7.



(a)



(b)

Figura 7: Esquema da oxidação da siringaldazina, mostrando a forma reduzida incolor **(a)** e a forma oxidada da quinona **(b)**, que é colorida (Harkin e Obst, 1973).

Como não há referências citando a existência de um método padronizado para a quantificação da lacase, e como vários pesquisadores têm utilizado os mais diversos substratos na quantificação da lacase, nesta pesquisa foram realizadas experiências visando a padronização da quantificação da lacase utilizando a siringaldazina como substrato, que serão descritas em detalhes a seguir.

4.4.1 Efeito da proporção entre enzima e substrato.

Para avaliar a influência que as proporções entre enzima e substrato possam ter na quantificação da lacase foram utilizadas misturas de reação de acordo com o descrito na alínea (a) do sub-título 3.6, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Atividade enzimática do *P. sanguineus* a 35°C em 10 dias de incubação em caldo EM, pH inicial 6,0, em diferentes quantidades de enzima e 10⁻³ mM de siringaldazina. Medindo a variação da absorvância em 525 nm a 25°C, n= 5.

C/S ² (mL)	Unidades enzimáticas ¹		
	Substrato (mM)	média	$\Delta\%$ (IC 95%) ³
2,0:1,0	10 ⁻³	409	± 12
4,5:1,0	10 ⁻³	550	± 5
9,0:1,0	10 ⁻³	912	± 8

¹ Uma unidade enzimática= ΔA_{525nm} de 0,001 min⁻¹

² relação entre caldo EM e substrato, em mL

³ intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

Pela tabela 1, vê-se que a quantificação da atividade da lacase foi realizada apenas em misturas de reação com volumes crescentes do caldo EM inoculado com *P. sanguineus* e mesma quantidade de substrato, demonstrando que a maior quantidade de enzima ocasiona um aumento da velocidade de reação e, conseqüentemente, do valor da atividade enzimática que é quantificada.

Na quantificação da lacase no caldo EM inoculado com o *T. versicolor* a velocidade de reação foi intensa, de modo que os valores da absorbância da mistura de reação ultrapassaram a escala de leitura do equipamento em menos de 1 minuto, impossibilitando a quantificação da lacase produzida pelo *T. versicolor* pelo método espectrofotométrico adotado na pesquisa. Estes resultados evidenciam que o *T. versicolor* produz maior quantidade de lacase no caldo EM do que o *P. sanguineus* nas condições de cultivo experimentadas.

Considerando os resultados obtidos, decidiu-se efetuar nova quantificação da atividade da lacase aumentando as quantidades de substrato em relação aos caldos EM e adicionando solução tampão citrato fosfato 0,1 M com pH $5,0 \pm 0,1$ na mistura de reação, conforme realizado por Bollag e Leonowicz (1984); Grotewold et al., (1988); Assavanig et al., (1992) e Thakker et al. (1992). Foram obtidas misturas de reação com as composições descritas na alínea (b) do sub-título 3.6, com a quantificação da atividade da lacase produzindo os valores apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Atividade enzimática do *P. sanguineus* (Ps) a 35°C e do *T. versicolor* (Tv) a 30°C, após 10 dias de incubação em caldo EM, pH inicial 6,0, e quantidades crescentes de substrato em relação caldo EM e solução tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0 ± 0,1. Medindo a variação da absorbância em 525 nm a 25°C, n= 5.

C/S ²		Unidades enzimáticas ¹			
(mL)	Substrat omM	<i>P.sanguineus</i> média	Δ% (95%) ³	<i>T.versicolor</i> média	Δ% (95%)
1,0:0,75	75.10 ⁻⁵	198	± 10	414	± 4
1,0:1,5	15.10 ⁻⁴	197	± 10	756	± 5
1,0:3,0	03.10 ⁻³	176	± 20	---4	

1 Uma unidade enzimática=ΔA_{525nm} de 0,001 min⁻¹.

2 relação entre caldo EM e substrato, em mL

3 intervalo de confiança de 95%.

4. Valores fora da escala do equipamento.

A adição de solução tampão às misturas de reação, associada com simultânea redução da concentração de enzimas possibilitou quantificar a lacase nos caldos EM inoculados com ambos os fungos. Os valores da atividade da lacase foram menores do que os apresentados na tabela 1 para o *P. sanguineus*, decorrente da composição da mistura de reação.

Observou-se que no caldo EM inoculado com *T. versicolor* a velocidade de reação aumentou com a concentração de substrato. Já com o caldo EM inoculado com *P. sanguineus* não foi observado aumento da atividade enzimática da lacase com aumento da concentração do

substrato, provavelmente pela menor quantidade de lacase produzida pelo *P. sanguineus* em relação ao *T. versicolor*.

Os resultados destas duas experiências evidenciaram a necessidade de padronizar uma composição-padrão para as misturas de reação, pois só desta forma haverá possibilidade de comparar a capacidade de produção de lacase pelos dois fungos. De acordo com Miller e Niessner (1994) a espectrofotometria de absorção é o método mais utilizado na enzimologia moderna, desde que efetuado numa mistura de reação de composição definida, adicionada de solução tampão com pH padronizado e medindo-se a variação da absorbância em temperatura definida, pois as enzimas são proteínas e, desta forma suscetíveis às influências do pH e temperatura (Cornish-Bowden e Cárdenas, 1987).

Considerando estas condições de contorno para a quantificação da atividade enzimática da lacase e baseados nas recomendações de Bollag e Leonowicz (1984), Evans et al., (1984) e Palmieri et al., (1993), padronizou-se a quantificação da lacase na temperatura de 25°C e pH 5,0, numa mistura de reação com a composição básica contendo 2,5 mL de solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,0 ± 0,1, e quantidades iguais de 0,2 mL do caldo de cultura e da solução do substrato (Bollag e Leonowicz, 1984).

4.4.2 Efeito do solvente da siringaldazina

Loneragan e Baker (1995) citaram que, como a siringaldazina é insolúvel em água pode ser utilizada em soluções com etanol (Ander e Eriksson, 1976; Bollag e Leonowicz, 1984 e Szklarz e Leonowicz, 1986), mas pelo fato de se constatar baixa solubilidade da siringaldazina em etanol, o que pode ocasionar precipitação de parte do produto com a conseqüente redução da concentração da solução, decidiu-se utilizar solução de siringaldazina em metanol, de acordo com o realizado por Palmieri et al., (1993).

A experiência de quantificação da lacase com solução de siringaldazina em metanol utilizou misturas de reação com a composição descrita na alínea (c) do subtítulo 3.6. No sentido de avaliar a coerência e reprodutibilidade nos valores da atividade da lacase, foram utilizados caldos EM sem diluição e caldos EM diluídos com água destilada em várias proporções, dessa forma obtendo diferentes concentrações de enzima nas misturas de reação. Os valores obtidos na experiência são apresentados na figura 8.

A atividade da lacase produzida pelo *T. versicolor* no caldo EM com pH inicial 6,0 apresentou um valor cerca de 90% superior à atividade produzida no caldo EM com pH inicial 7,0. Estes valores caracterizam o caldo EM com pH 6,0 como o que mais favorece a produção de lacase pelo *T. versicolor*, confirmado pela mistura de

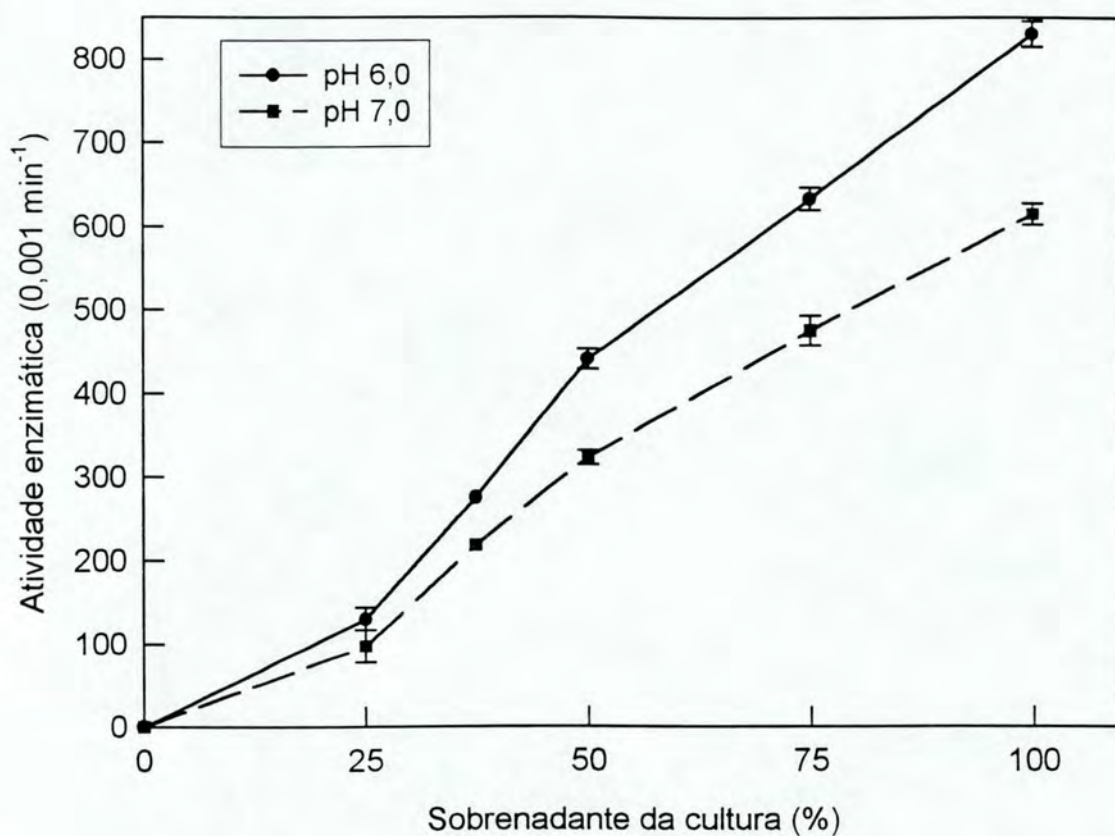


Figura 8: Atividade da lacase do *Trametes versicolor* em 20 dias em caldos de extrato de malte (caldo EM), pH 6,0 e 7,0. Lacase quantificada em 525nm e 25°C, com diferentes percentuais de caldo EM na mistura de reação. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de $0,001 \text{ min}^{-1}$, c.v. $\leq 20\%$, n = 3.

reação com 50% da concentração inicial de caldo EM com pH 6,0, onde ocorreu uma redução de 63% da atividade enzimática obtida no caldo sem diluição, enquanto que no caldo EM com pH 7,0 com 50% da concentração inicial, a redução da atividade da lacase foi de 78%.

Calculando o intervalo de confiança, com 95% de probabilidade, dos valores obtidos, encontrou-se uma variação de 6,2% nas 5 repetições do caldo EM com pH inicial 6,0, enquanto que nas 5 repetições do caldo EM com pH 7,0 a variação entre os valores encontrados foi de 9,6%. Estas variações mostram a possibilidade de que a quantidade de lacase produzida pelo *T. versicolor* no pH 6,0 seja superior à produzida em pH 7,0.

Estas observações são corroboradas pela variação dos valores obtidos nas 5 repetições das misturas de reação com concentrações de enzima menores, com variação de 12,2% no caldo EM com pH 6,0 e 29,2% no caldo EM com pH 7,0, quando a concentração de enzima foi 50% da concentração inicial. Com 25% de caldo EM nas misturas de reação as variações foram bem maiores, alcançando 43,3% no caldo com pH 6,0 e de 75% no caldo com pH 7,0.

Por estes valores vê-se que a quantificação da lacase pelo método espectrofotométrico apresenta relação com a concentração da enzima na mistura de reação, pois ocorre maior dispersão dos valores da absorbância nas misturas de reação à medida em que se reduz a quantidade da enzima. Outra constatação resultante da avaliação da

influência do solvente da siringaldazina é a de que os resultados obtidos na quantificação da lacase com a solução de siringaldazina em metanol foram mais coerentes do que os obtidos com a solução de siringaldazina em etanol.

4.4.3 Influência dos diluentes sobre a atividade da lacase.

Para observação da possível interferência do diluente dos caldos EM sobre os valores da quantificação da lacase, alterando a composição da mistura de reação, foi realizada uma experiência utilizando água destilada pH 6,0 e solução tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,0 \pm 0,1 como diluentes, de acordo com o descrito na alínea (d) do sub-título 3.6.

Os valores da atividade da lacase nos caldos EM diluídos na proporção de 3:1 foram 256 unidades enzimáticas no caldo diluído com água destilada, (c.v. \leq 7,9%), e de 255 unidades enzimáticas no caldo diluído com solução tampão, (c.v. \leq 16,9%). Nos caldos EM diluídos na proporção 1:1, os valores da atividade da lacase foram 109 unidades enzimáticas, (c.v. \leq 22,7%), no caldo diluído com água, e de 105 unidades enzimáticas, (c.v. \leq 42%), no caldo diluído com solução tampão.

Comparando os valores da atividade da lacase obtidos nos caldos EM com diluição 3:1 em água destilada e em solução tampão, constatou-se uma diferença de 0,4% nos valores obtidos da atividade da lacase. Nos caldos EM

com diluição 1:1 a diferença entre os valores da atividade da lacase foi de 3,7%, evidenciando que a diluição dos caldos EM com água ou solução tampão não interferem na metodologia de quantificação da lacase produzida pelo *T. versicolor* em caldo EM com pH inicial 7,0.

Pode-se comparar também os valores da atividade da lacase obtidos nessa experiência com os valores obtidos na segunda experiência, quando também foi quantificada a atividade da lacase em caldo EM com pH inicial 7,0 diluído com água destilada nas mesmas proporções, obtendo-se 231 unidades enzimáticas na diluição 3:1 e de 106 unidades enzimáticas na diluição 1:1. Estes valores diferiram em 9,7 e 2,8% dos valores obtidos na segunda experiência com caldos EM diluídos nas mesmas proporções com água destilada, constatando-se também a reprodutibilidade da metodologia de quantificação da lacase produzida em caldos EM utilizando a siringaldazina como substrato da lacase.

4.4.4 Efeito da concentração das soluções de siringaldazina

Harkin e Obst (1973), estudando a siringaldazina como substrato para a lacase constataram que, dependendo da quantidade de siringaldazina utilizada na mistura de reação poderia haver a precipitação dos produtos insolúveis provenientes da reação de oxidação. Devido a esta constatação, a quarta experiência teve a finalidade

de encontrar uma concentração adequada de substrato para a quantificação da lacase, utilizando misturas de reação com quantidades crescentes de siringaldazina, cujas composições estão descritas na alínea (e) do sub-título 3.6. Os resultados obtidos são apresentados na figura 9.

Pela figura 9 foi possível constatar a característica da cinética enzimática descoberta em 1913 por Michaelis e Menten (apud Robyt e White, 1987), de que a taxa ou velocidade da catálise enzimática varia com a concentração de substrato, aumentando a velocidade com o aumento do substrato até chegar a uma velocidade máxima.

Os resultados obtidos na quantificação da lacase com quantidades crescentes de siringaldazina nas misturas de reação demonstraram que utilizando uma quantidade de siringaldazina entre 2×10^{-4} mM e 3×10^{-4} mM, é suficiente para quantificar a lacase, pois os valores da atividade enzimática obtidos nos caldos EM com pH inicial 6,0 diferiram apenas em 0,4% e nos caldos EM com pH inicial 7,0 esta diferença foi de 8,3%.

Considerando estes resultados, decidiu-se padronizar o uso de alíquotas de solução 1 mM de siringaldazina em metanol nas misturas de reação para a quantificação da atividade enzimática da lacase, concentração suficiente de substrato, considerando inclusive que Bollag e Leonowicz (1984) e Palmieri et al. (1993), realizaram quantificações de lacase utilizando soluções de siringaldazina com concentrações similares e até menores do que 1 mM.

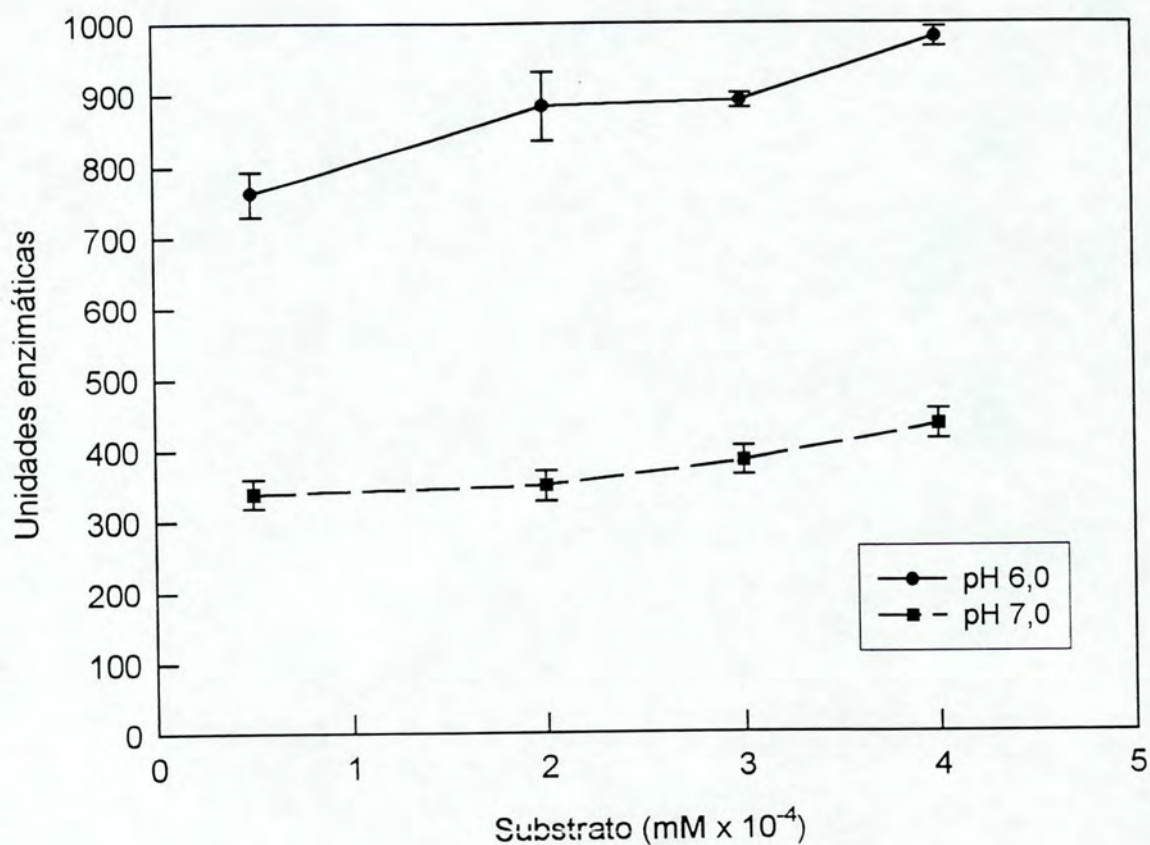


Figura 9: Atividade da lacase do *Trametes versicolor* em 20 dias em caldos de extrato de malte (caldo EM), pH 6,0 e 7,0. Lacase quantificada em 525nm e 25°C, com quantidades crescentes de substratos na mistura de reação. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min⁻¹, c.v. ≤ 6%, n = 2.

4.5 Capacidade produtora de lacase

4.5.1 Efeito da agitação dos caldos

As experiências de produção e padronização da quantificação de lacase foram realizadas a partir de incubações estáticas dos caldos de extrato de malte (caldos EM) inoculados com *P. sanguineus* e com *T. versicolor*, por períodos de até 20 dias. Porém, considerando que vários pesquisadores utilizaram fungos da podridão-branca em culturas aeradas ou sob agitação para degradar compostos fenólicos ou corados presentes em efluentes, foi efetuada uma experiência em que se aplicou agitação aos meios de cultura, observando-se a influência da agitação na produção de lacase.

Na experiência, caldos EM com pH inicial 6,0, após inoculação com *P. sanguineus* e com *T. versicolor*, foram mantidos em agitador orbital com 180 rpm, a 30°C, durante 3 dias, quantificando a lacase produzida em intervalos de 24 horas. Os valores obtidos são apresentados na figura 10.

Pela figura 10 observa-se que a atividade enzimática produzida pelo *P. sanguineus* aumenta consideravelmente em 3 dias de incubação, ficando evidente que o fungo responde favoravelmente à agitação, pois também produziu biomassa em quantidade apreciável, tornando viscoso o caldo EM pelo micélio nele disperso.

Além disso, em 24 horas produziu mais lacase do que o *T. versicolor*, alcançando 73 unidades enzimáticas, enquanto em cultura estática produziu 23 unidades

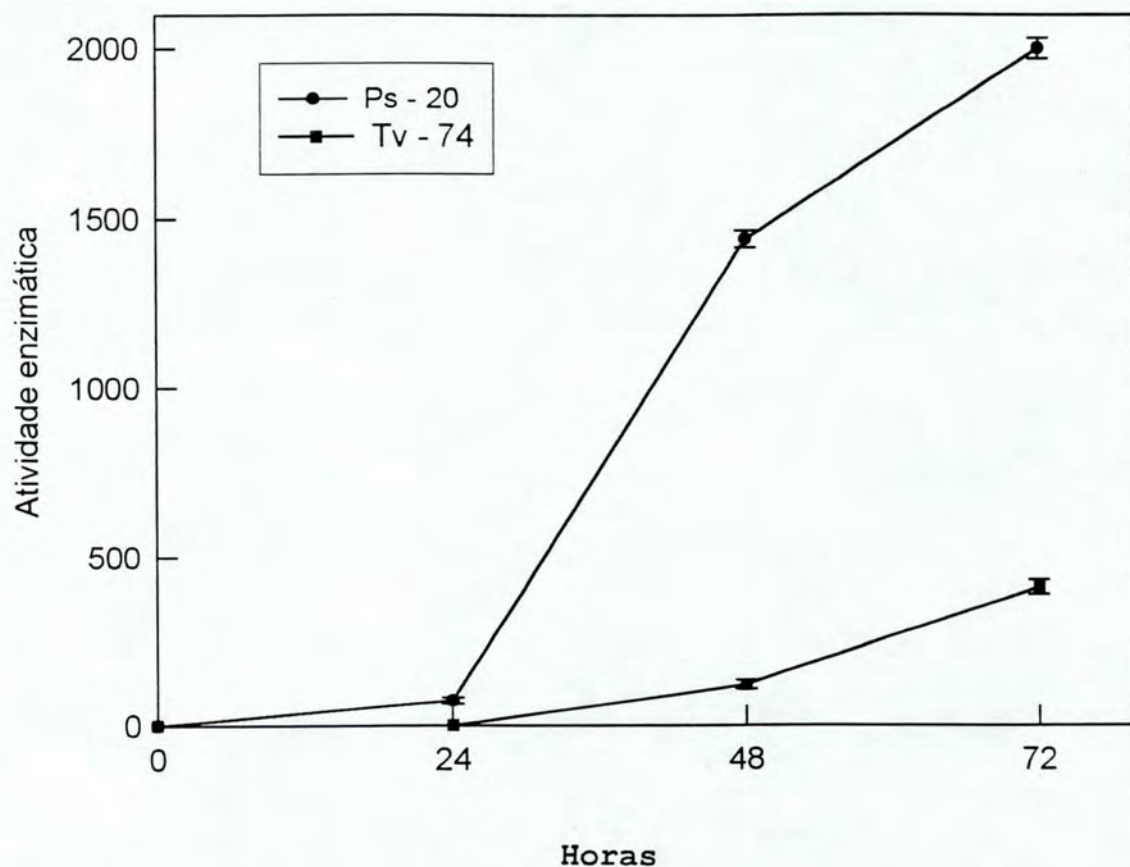


Figura 10: *Pycnoporus sanguineus* (Ps) *Trametes versicolor* (Tv), atividade da lacase em caldos de extrato de malte (caldo EM), pH 6,0, 180 rpm e 30°C por 3 dias. Lacase quantificada em 525nm e 25°C. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 min^{-1} , c.v. $\leq 13,7\%$, n = 3.

enzimáticas em 5 dias. Nas primeiras 24 horas o *T. versicolor* não produziu lacase, mas nos períodos posteriores reagiu favoravelmente à agitação, produzindo em 72 horas 413 unidades enzimáticas, um valor elevado considerando sua produção em cultura estática, que foi de 49 unidades enzimáticas em 5 dias.

Apesar da suposta indução que a agitação dos caldos EM ocasionou na produção de lacase, principalmente por parte do *P. sanguineus*, optou-se por realizar as experiências sempre com incubações estáticas, de modo a avaliar a capacidade produtora de lacase pelo *P. sanguineus* nas culturas estáticas com meios semi-sólidos, que são muitas vezes encontrados na prática, possibilitando compará-lo com a capacidade do *T. versicolor* em produzir lacase e descorar efluentes líquidos com compostos aromáticos, como efetuado por Selin et al. (1975) e Paice e Jurasek (1984).

4.5.2 Efeito da adição de glicose

A adição de glicose ao caldo EM com pH 6,0 visou avaliar se uma fonte de carbono induziria maior produção de lacase, tanto pelo *P. sanguineus* como pelo *T. versicolor*. Para tanto, foram adicionados 100 mg L⁻¹ de glicose ao caldos EM, incubando-os por 10 dias a 35 e 30°C, respectivamente. A quantificação da lacase foi efetuada a cada 48 horas, obtendo-se os valores apresentados na figura 11.

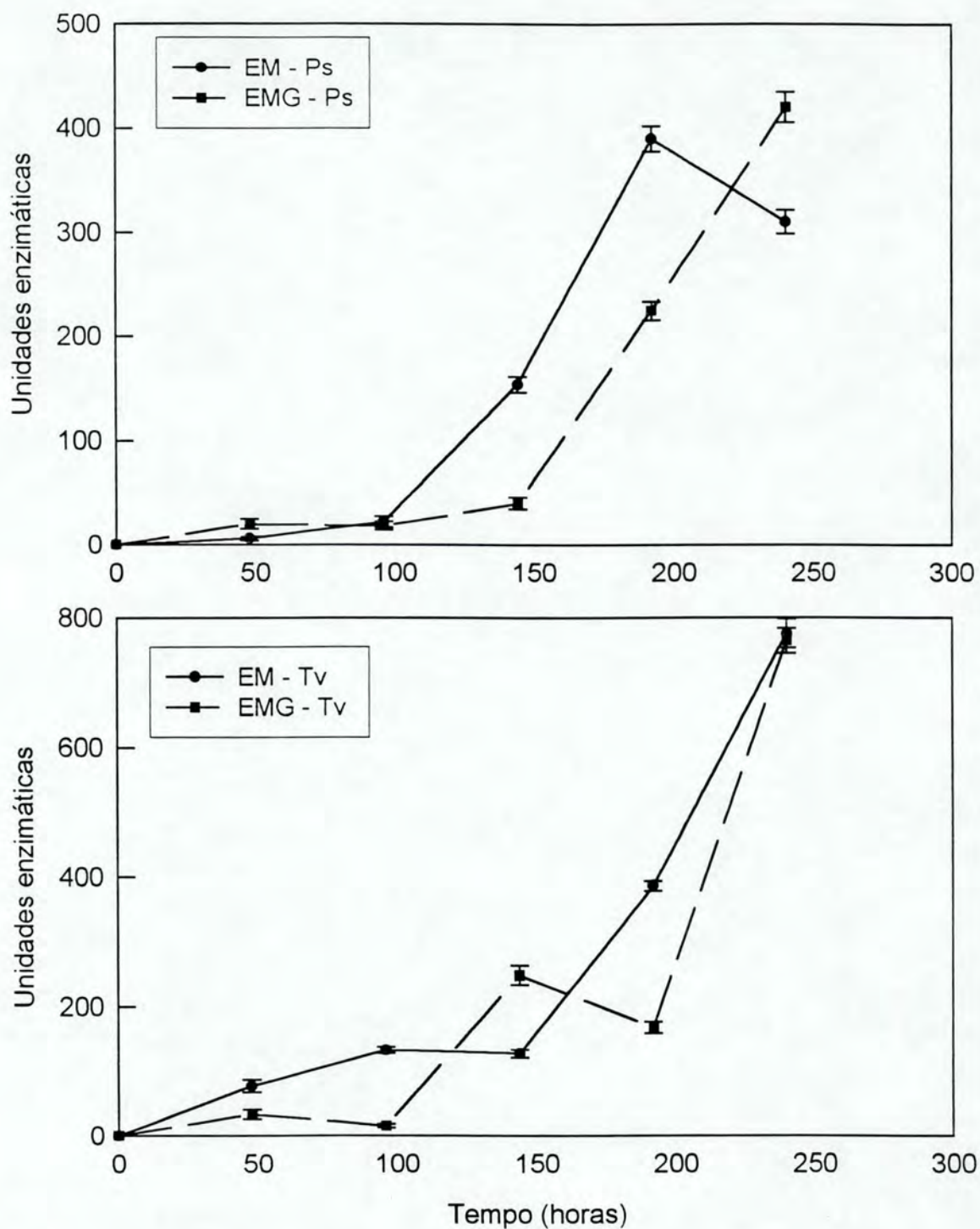


Figura 11: Atividade da lacase do *P. sanguineus* (Ps) e *T. versicolor* (Tv) em 10 dias a 35 e 30°C, respectivamente, em caldo de extrato de malte (EM) e com 100 mg L⁻¹ de glicose (EMG). Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de 0,001 a 25°C, n = 2. As barras indicam o desvio padrão.

Pela figura 11 vê-se que a produção de lacase pelo *P. sanguineus* nos caldos com glicose nos primeiros 6 dias não ultrapassou de 40 unidades enzimáticas. Após este período, entretanto, ocorreu um aumento considerável na produção de lacase, alcançando uma taxa horária de 4,89 unidades enzimáticas nos últimos 4 dias de incubação. Nos caldos EM sem adição de glicose registrou-se uma produção de lacase pelo *P. sanguineus* similar à obtida com glicose nos primeiros 4 dias de incubação, ocorrendo um acréscimo na produção entre 6 e 8 dias de incubação, com taxas similares às obtidas pelo *P. sanguineus* nos caldos EM com glicose, mas caindo de produção após 8 dias de incubação.

Nos caldos EM sem glicose que foram inoculados com *T. versicolor* a produção de lacase nos primeiros 4 dias apresentou acréscimos de valor, o que não ocorreu nos caldos com *P. sanguineus*. Mas só após 6 dias de incubação é que ocorreu um acréscimo acentuado, alcançando uma taxa horária de 6,8 unidades enzimáticas nos últimos 4 dias de incubação.

Pelo observado nos caldos EM com glicose verificou-se inibição da produção de lacase nos primeiros 4 dias de incubação, pois só depois de 8 dias ocorreu um incremento súbito na produção de lacase, com uma taxa horária de 12,1 unidades enzimáticas, alcançando ao final da experiência 98,6% do valor da atividade enzimática produzida nos caldos EM sem glicose.

A observação da figura 11 mostrou que o *T. versicolor* apresentou, nos caldos EM com e sem glicose, maior atividade de lacase do que o *P. sanguineus* após 8 dias de incubação. Em 8 dias de incubação, entretanto, nos caldos EM sem glicose a produção de lacase ocorreu de forma idêntica tanto pelo *P. sanguineus* como pelo *T. versicolor*, com cerca de 400 unidades enzimáticas.

No final do período de 10 dias de incubação o *P. sanguineus* apresentou maior produção na presença de glicose, o que não ocorreu nos caldos inoculados com *T. versicolor*, que produziu praticamente a mesma quantidade de lacase nos caldos com ou sem glicose, demonstrando, dessa forma que tanto o *T. versicolor* como o *P. sanguineus* não sofreram indução para maior produção de lacase pela presença de glicose no meio.

Os resultados sobre a produção de lacase na presença de glicose pelo *P. sanguineus* e pelo *T. versicolor* concordam com os dados de Reid (1989) que na delignificação biológica, a glicose pode aumentar ou diminuir a perda de peso de madeiras de pinho inoculadas com o *Phanerochaete chrysosporium*. Já os estudos de Kent Kirk et al., (1976) mostraram que o *T. versicolor* necessitava de um substrato para o crescimento na presença de lignina, cuja maior degradação ocorre na presença de celulose ou glicose. Ao selecionar fungos para a biodegradação de lignina, Durrant e Mello (1992) observaram que as maiores produções de lacase e peroxidase foram obtidas adicionando glicose à serragem.

A inibição da produção de enzimas polifenol-oxidases pode ocorrer nos fungos, devido a limitação de nitrogênio e carboidratos, ou por excesso de nutrientes e agitação (Faison e Kent Kirk, 1985). Estudando a atividade ligninolítica do *Pleurotus pulmonarius* Masaphy e Levanon (1992) constataram que a produção de lacase em cultura submersa pode ser induzida pela fração solúvel de palha de trigo, mas que o pico da atividade ocorre após a glicose e NH_4^+ apresentarem sua mais baixa concentração, indicando correlação com atividade ligninolítica.

4.5.3 Produção de lacase em Caldos de extrato de malte

Para comparar a quantidade de lacase produzida pelo *P. sanguineus* com a produzida pelo *T. versicolor* foram realizadas experiências com caldos de extrato de malte (caldo EM), que segundo Reid (1989) é capaz de estimular a atividade ligninolítica de alguns fungos pelo seu teor de carboidratos.

Nesta experiência foi examinada também a influência do período de incubação e o pH do meio na produção de lacase, coletando amostras com intervalos de 5 dias e quantificando a lacase em misturas de reação com composição básica de Bollag e Leonowicz (1984), descrita na alínea (e) do sub-título 3.6. Os valores da atividade enzimática encontrados nos caldos EM em 10, 15 e 20 dias são apresentados na Figura 12.

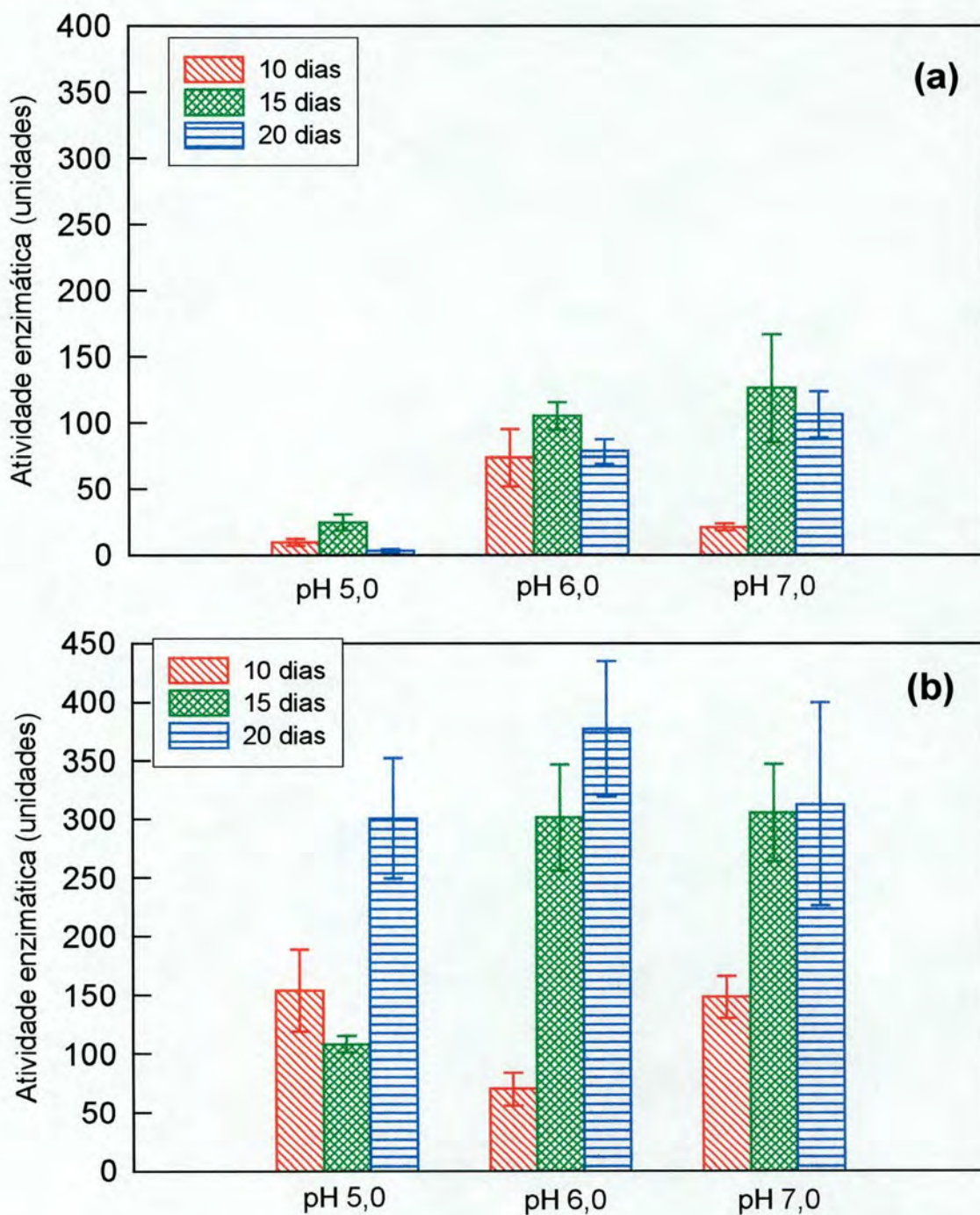


Figura 12: Atividade da lacase do *P. sanguineus* (a) e *T. versicolor* (b) em caldos de extrato de malte (caldo EM) em 10, 15 e 20 dias a 35 e 30°C, respectivamente. Uma unidade enzimática = $\Delta A_{525\text{nm}}$ de 0,001 a 25°C, n = 3. As barras indicam o desvio padrão.

A lacase produzida em 5 dias pelo *P. sanguineus* não ultrapassou 8 unidades enzimáticas no caldo EM com pH 6,0, enquanto que nos caldos EM com pH 5,0 e 7,0 os valores da lacase foram menores, não sendo mostrados na Figura 12. Nos caldos inoculados com o *T. versicolor* a produção de lacase em 5 dias foi de 3 unidades enzimáticas em todos os três valores de pH utilizados. Estes resultados da lacase produzida em 5 dias são similares aos que Blaich e Esser (1975) encontraram para uma estirpe do *T. versicolor*, que em 7 dias praticamente não produziu enzimas e nem biomassa, e Bollag e Leonowicz (1984) que constataram que a secreção de lacase pelo *T. versicolor* só ocorreu depois de 20 dias de cultivo.

Já Bourbonnais e Paice (1990, 1992), estudando a atividade da lacase do *T. versicolor* sobre substratos não-fenólicos e polpa kraft, cultivaram o fungo entre 7 e 8 dias antes de extrair a lacase produzida. Posteriormente, Bourbonnais et al., (1995) estudando a oxidação da lignina pelo *T. versicolor*, incubaram por 7 dias o fungo antes de extrair as enzimas produzidas.

Nesta experiência constatou-se uma progressiva elevação da produção de lacase a partir do décimo dia de incubação, principalmente pelo *T. versicolor* entre 15 e 20 dias de incubação, evidenciando a maior capacidade produtiva do *T. versicolor* sobre o *P. sanguineus*. A produção de lacase pelo *T. versicolor* nesse período corrobora os procedimentos de Evans (1985), que cultivou

T. versicolor por 20 dias para então quantificar a lacase produzida.

Comparando os valores da quantificação da lacase produzida pelos dois fungos em caldos de extrato de malte com três valores de pH foi possível encontrar similaridade na dispersão dos valores obtidos nas 3 repetições, pois os coeficientes de variação dos valores da lacase produzida pelo *P. sanguineus* variaram de 1,6 a 36,1%, enquanto que os valores da lacase do *T. versicolor* variaram de 3,7 e 36,9%.

4.5.4 Produção de lacase em Caldos de Bushnell-Haas

O caldo mineral de Bushnell-Haas (caldo BH) foi desenvolvido para o isolamento de fungos a partir de compostos aromáticos, com uma composição de sais de nitrogênio, fósforo e potássio, mas sem fonte de carbono. Pela limitação de carbono existente no caldo BH visou-se avaliar se qual o efeito que cultivo do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* neste caldo, adicionado dos corantes e glicose, teria na produção de lacase por estes fungos.

A quantificação da lacase foi realizada em intervalos de 48 horas, e como a finalidade do experimento era observar a produção ou não de lacase, foram calculados apenas os coeficientes de variação dos resultados obtidos nas diversas composições experimentadas, sendo apresentados nas tabelas 3 e 4

apenas as condições da experiência em que foi detectada lacase .

Tabela 3: Atividade enzimática do *P. sanguineus* em caldos de Bushnell-Haas (caldo BH) nos pH 5,0 e 6,0. Variação da absorbância medida em 525nm a 25°C, n= 3.

Composição ²	Unidades enzimáticas ¹				
	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h
BHG-6-VM	43	10	5	48	83
BH-5-VC	8	11	24	26	25
BHG-5-VC	23	127	13	35	32
BH-6-VC	8	11	8	8	6
BHG-6-VC	6	11	12	13	18
BH-6	11	26	15	28	27

1. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de $0,001 \text{ min}^{-1}$.

2. Caldos BH com 25 mg L^{-1} de vermelho congo e com 25 mg L^{-1} de verde malaquita (BH-VC e BH-VM) e caldos BH com 100 mg L^{-1} de glicose (BHG-VC e BHG-VM).

3. C.V. máximo $\leq 17\%$

Com referência à tabela 3, é possível observar que o *P. sanguineus* produziu lacase em todas as condições na presença do vermelho congo. Mas só numa condição foi detectada lacase na presença do verde malaquita. No caldo BH sem glicose e corantes utilizado como controle, foi detectada presença de glicose.

Estes valores de atividade enzimática da lacase produzida pelo *P. sanguineus*, praticamente inexistentes nas soluções com verde malaquita, mas detectados em todas as soluções com vermelho congo poderia ser explicada pela

relação carbono:nitrogênio de cada corante. No corante verde malaquita tem-se uma relação de 9,8:1,0 e que é aumentada pela adição de glicose ao meio, enquanto que o vermelho congo tem-se a relação de 4,5:1,0, proporcionando uma situação em que a quantidade de carbono é a metade da existente nos caldos com verde malaquita, induzindo uma produção maior de lacase pelo fungo.

Tabela 4: Atividade enzimática do *T. versicolor* em caldos de Bushnell-Haas (caldo BH) pH 5,0 e 6,0. Variação da absorbância medida em 525nm a 25°C, n = 3.

Composição ²	Unidades enzimáticas ¹				
	48 h	96 h	144 h	192 h	240 h
BH-5-VM	28	11	38	25	182
BH-6-VM	2	137	239	289	311
BH-5-VC	50	342	584	593	438
BH-6-VC	49	398	264	375	139
BHG-6-VC	5	11	12	8	7
BH-6	10	13	18	16	22

1. Uma unidade enzimática = ΔA_{525nm} de $0,001 \text{ min}^{-1}$.

2. Caldos BH com 25 mg L^{-1} de vermelho congo e com 25 mg L^{-1} de verde malaquita (BH-VC e BH-VM) e caldos BH com 100 mg L^{-1} de glicose (BHG-VC e BHG-VM)

3. C.V. $\leq 12,3\%$

Com referência à tabela 4, onde são apresentadas as condições em que foi detectada lacase produzida pelo *T. versicolor* em caldos BH com vermelho congo e verde malaquita, verificou-se que na única detecção de lacase

em meio com glicose os valores situaram-se num patamar muito inferior aos encontrados nos caldos BH sem adição de glicose, evidenciando que na presença de glicose praticamente não há produção de lacase pelo *T. versicolor*, ao contrário do constatado para o *P. sanguineus*.

Nas soluções com verde malaquita sem glicose detectou-se, após 240 horas de incubação, maior atividade de lacase no caldo BH com pH 6,0, enquanto que nas soluções com vermelho congo a maior atividade foi detectada no pH 5,0. Comparando a atividade enzimática detectada nas soluções sem glicose com as produções do caldo BH com pH 6,0 utilizado como controle e com a solução adicionada de glicose, observou-se que a presença dos corantes induziu maior produção de lacase pelo *T. versicolor* nas condições experimentadas sem adição de glicose.

Com as soluções inoculadas com o *P. sanguineus* não ocorreu indução na produção de lacase pela presença de corantes na solução, pois os valores quantificados na maioria dos experimentos não apresentaram valores maiores dos que foram obtidos na solução-controle no mesmo período de tempo.

Esta característica relativa à produção de lacase pelos fungos demonstrou que com *T. versicolor* a produção de lacase pode ser induzida pela presença de compostos aromáticos como os corantes vermelho congo e verde

malaquita, mas que não se constatou a mesma influência dos corantes nas soluções inoculadas com o *P. sanguineus*.

Esta aparente diversidade na atividade de cada fungo pode ser um indicio de que no *P. sanguineus* a produção de lacase é constitutiva de seu ciclo vital, não sofrendo indução pela presença dos corantes com estrutura aromática nos meios de cultura, ao passo que o *T. versicolor* a produção de lacase é induzida pela presença dos corantes na solução.

Os resultados ainda demonstraram que a limitação de carbono atua como um inibidor na produção de lacase, tanto no *P. sanguineus* como no *T. versicolor*, coincidindo com as constatações obtidas por Kent Kirk et al. (1976). Estes autores trabalhando com *T. versicolor*, constataram que a lignina pura não servia como fonte de carbono, tendo que adicionar celulose ou glicose ao meio para o desenvolvimento do fungo. Da mesma forma, Sandhu e Arora (1985) trabalhando com *Pycnoporus sanguineus* notaram que sem fonte de carbono não ocorria degradação de lignina.

Muitos outros pesquisadores encontraram fungos que também sofrem influência da limitação de carbono, não possibilitando crescimento nem produção enzimática como encontrados nas culturas do *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata* e *Pleurotus pulmonarius*, que só cresceram e produziram enzimas extracelulares em meios contendo carbono (Faison e Kent Kirk, 1985; Hatakka et al. 1991; Masaphy e Levanon, 1992 e Assavanig et al., 1992).

4.6 Crescimento fúngico em meios semi-sólidos e líquidos

4.6.1 Produção de lacase em meios semi-sólidos

Thiemann (1985) cita que os processos de bioconversão em meios semi-sólidos têm aplicação quase exclusiva na produção de enzimas fúngicas, e Roussos et al., (1991) salientaram que este processo é ainda utilizado por possibilitar maior produção de enzimas do que os processos em meios líquidos, além de tornar mais fácil sua remoção dos substratos enzimáticos ou utilizá-los diretamente em processos industriais.

Como os Basidiomycetes utilizados na pesquisa pertencem à ordem *Aphylllophorales*, que têm habitat predominantemente terrestre, crescendo em substratos sólidos com elevado teor de umidade (Stevenson, 1974; Silveira e Guerrero, 1991), o *P. sanguineus* e o *T. versicolor* foram cultivados sobre substratos semi-sólidos com a finalidade de observar seu crescimento e produção de lacase neste tipo de meio.

Como substratos para os meios semi-sólidos foram utilizados o farelo de trigo, polpa kraft, algodão hidrófilo e serragem de madeira. Na experiência com farelo de trigo foi quantificada a produção de lacase, enquanto que nos outros substratos observou-se unicamente o crescimento micelial, não sendo quantificada a produção de lacase.

A quantificação da lacase produzida no farelo de trigo foi realizada num extrato obtido conforme método de

Roussos et al. (1991) e descrito no sub-título 3.8, detectando-se produção de lacase pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* em 5 dias de incubação, mas não sendo quantificada sua atividade enzimática porque a variação da absorbância nos extratos das quatro primeiras extrações ultrapassou o limite de leitura do equipamento em menos de 1 minuto.

Nos extratos das quatro extrações subsequentes encontrou-se 527 unidades enzimáticas produzidas pelo *T. versicolor*, não sendo quantificada a lacase produzida pelo *P. sanguineus* por ultrapassar a leitura do equipamento. Nas três porções de extratos obtidos após 10, 15 e 20 dias de incubação no meio inoculado com *T. versicolor* não foi quantificada a lacase pela rápida variação da absorbância. Nos extratos obtidos nos meios inoculados com *P. sanguineus* nos mesmos períodos de incubação, foram obtidas 978, 784 e 918 unidades enzimáticas, respectivamente.

Estes resultados mostraram que o farelo de trigo é um bom substrato para a produção de lacase devido, provavelmente, ao seu conteúdo de amido, celulose e lignina, como citado por Mendez et al., (1992). O cultivo do *P. sanguineus* e *T. versicolor* em meios semi-sólidos representa uma alternativa para a aplicação de fungos em resíduos industriais, como citado por Zadrazil (1985) e Agosin et al. (1985), que pesquisaram a transformação enzimática de palha de trigo em ração, por Zabel e Morrel (1992) que estudaram modificações químicas das madeiras

por atividade fúngica e por Rolz et al. (1986) que avaliaram a biodelignificação de bagaços cítricos.

Dos resultados obtidos com farelo de trigo constatou-se similaridade com os dados de Susin (1987), que encontrou forte reação de polifenol-oxidases no *P. sanguineus* após 5 dias de cultivo em ágar com ácido gálico e com ácido tânico, com as mesmas reações para o *T. versicolor* após 10 dias de cultivo. Estes resultados demonstram que em farelo de trigo a produção de lacase ocorreu de forma mais rápida no *P. sanguineus* do que no *T. versicolor*,

4.6.2 Crescimento em meios semi-sólidos

Os meios semi-sólidos utilizados para avaliar a produção de biomassa pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* foram o farelo de trigo, polpa kraft, algodão hidrófilo e serragem de madeira. Todos estes substratos foram utilizados com um teor de umidade entre 70 e 80 % (p/p) em base úmida, como sugerido por Chahal (1985), observando-se o crescimento micelial visualmente.

No meio semi-sólido com farelo de trigo constatou-se, após 5 dias de incubação crescimento intenso do *P. sanguineus*, recobrando a superfície das placas utilizadas no experimento. Mas nas placas com farelo inoculado com *T. versicolor* o micélio só recobriu metade da superfície das placas no mesmo período.

No meio composto de polpa kraft o *P. sanguineus* recobriu metade da superfície das amostras de polpa em 5

dias, recobrando-as totalmente após 15 dias de cultivo, apresentando, inclusive, a formação do pigmento vermelho característico. Nas amostras de polpa kraft inoculadas com *T. versicolor* não houve constatação de crescimento após 15 dias de incubação.

Nas amostras de meios com algodão hidrófilo inoculadas com os dois fungos observou-se, depois de 15 dias de incubação, que nas placas inoculadas com *P. sanguineus* formara-se uma zona de cor amarela ao redor do disco de inóculo, mas não se constatou crescimento micelial. Nas placas inoculadas com *T. versicolor* não houve modificação nenhuma na aparência das amostras de algodão hidrófilo no mesmo período de incubação.

Nas placas contendo o meio com serragem da *Cedrella* spp. solidificado com ágar, observou-se um crescimento esparso recobrando toda a superfície das placas inoculadas com *P. sanguineus*, mas não se constatou crescimento ou modificação em nenhuma das placas inoculadas com *T. versicolor* no mesmo período de tempo.

Os resultados apresentados nestes substratos mostram que os dois fungos crescem mais intensamente naqueles substratos que, além de celulose, hemicelulose e lignina, contêm polissacarídios, como é o caso do farelo de trigo, que também contém amido. O *P. sanguineus* mostrou uma capacidade de crescimento superior à do *T. versicolor* neste tipo de substratos, mostrando-o mais apto na sua aplicação sobre um número maior de substratos.

4.6.3 Quantificação de biomassa em meios líquidos

Para comparar a capacidade de crescimento do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* em meios líquidos foram utilizados caldos de extrato de malte (caldos EM), quantificando-se as biomassas produzidas pelos dois fungos nos experimentos, de acordo com as recomendações de Milstein et al. (1981), descritas no sub-título 3.7.

4.6.3.1 Produção de biomassa pelo *P. sanguineus* e pelo *T. versicolor* em caldo de extrato de malte

As biomassas produzidas pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* em 5 dias de incubação no caldo EM com pH 5,0 situaram-se entre os limites de 1,2 a 2,0 g L⁻¹, calculados com um intervalo de confiança de 95% de probabilidade (I.C. 95%), com o *P. sanguineus* apresentando um valor médio de 1,7 g L⁻¹ e o *T. versicolor* um valor médio de 1,6 g L⁻¹. Os valores de biomassa produzida pelo *T. versicolor* são superiores aos que foram encontrados por Lindeberg e Fähræus (1952) numa estirpe do *T. versicolor* em meio com 2 % de glicose, que alcançou um valor médio de 1,4 g L⁻¹ em 7 dias de incubação.

Comparando as biomassas formadas pelo *P. sanguineus* e pelo *T. versicolor* nesse experimento, foi possível constatar que as taxas diárias de produção de biomassa pelos dois fungos situaram-se entre os valores de 0,32 e 0,34 g L⁻¹ dia⁻¹, (I.C. 95%), demonstrando que

os dois fungos crescem de forma similar no caldo de extrato de malte num período de 5 dias de incubação.

4.6.3.2. Produção de biomassa pelo *T. versicolor* em função da idade do inóculo

Os caldos EM com pH 5,0 foram inoculados com *T. versicolor* a partir de inóculos provenientes de culturas com 45 e 90 dias para observar a influência que o tempo de cultivo do inóculo possa ter nas taxas de crescimento desse fungo. Os resultados que foram obtidos em 5, 10 e 20 dias de incubação são apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Biomassa produzida pelo *T. versicolor* em caldo de extrato de malte (caldo EM) com pH 5,0, após 5, 10 e 20 dias de incubação a 30°C. n = 3

Inóculo (dias)	Biomassa (g L ⁻¹)					
	5 dias		10 dias		20 dias	
	dias	(IC95%) ¹	dias	(IC95%)	dias	(IC95%)
45	1,4	1,1-1,7	2,3	1,9-3,7	8,5	8,0-9,0
90	0,6	0,4-0,8	3,5	3,1-3,9	9,1	6,6-11,6

1. intervalo de confiança com 95 % de probabilidade.

Pelos valores médios da biomassa produzida pelo *T. versicolor* é possível observar que a idade do inóculo apresenta influência sobre o desenvolvimento do fungo nos primeiros 5 dias de incubação. Já as biomassas produzidas pelo *T. versicolor* em 10 e 20 dias de incubação não mostram mais discrepâncias devido à idade do inóculo.

Com o inóculo de 45 dias se obteve uma produção média de biomassa de $1,4 \text{ g L}^{-1}$ nos primeiros 5 dias de incubação, valor igual ao obtido por Lindeberg e Fähræus (1952) em 7 dias de incubação com uma estirpe do *T. versicolor*. Estes resultados mostram que o período de adaptação do fungo aumentou com a idade do inóculo. Assim, levando em consideração a necessidade de uma padronização dos experimentos, os inóculos dos dois fungos foram sempre elaborados a partir de culturas com 10 dias de incubação, um período adequado à produção de biomassa em quantidade suficiente para uso como inóculo.

4.6.3.3 Produção de biomassa pelo *P. sanguineus*

Esta experiência teve a finalidade de avaliar as taxas diárias de produção de biomassa pelo *P. sanguineus*, quantificando as biomassas formadas em 5 e 10 dias de incubação em caldo de extrato de malte (caldo EM) com pH 5,0. Os valores da biomassa produzida em 5 dias de incubação (I.C. 95%), ficaram situados entre os valores de $1,0$ e $1,1 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que as quantidades de biomassa produzidas após 10 dias de incubação situaram-se entre $4,1$ e $5,5 \text{ g L}^{-1}$, (I.C. 95%).

No cálculo das taxas de produção diária utilizando o valor médio de biomassa produzida em 5 dias de incubação encontrou-se um valor de $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Com o valor médio da biomassa produzida em 10 dias de incubação a taxa foi de $0,48 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, um valor cerca de 128% superior ao obtido em 5 dias de incubação. A taxa

de crescimento diário em 5 dias de incubação variou em cerca de 36% do valor obtido na primeira experiência de produção de biomassa pelo *P. sanguineus*, cujo valor médio foi de $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, de acordo com o descrito no sub-sub-título 4.6.2.1.

4.6.3.4 Produção de biomassa pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* em caldo de Bushnell-Haas

A produção de biomassa em caldo de Bushnell-Haas (caldo BH) foi realizada no pH 6,0, pois esse valor de pH é adequado ao *T. versicolor*, permitindo realizar uma comparação com a biomassa produzida pelo *P. sanguineus*. Após 10 dias de incubação a biomassa produzida pelo *T. versicolor* foi $0,32 \text{ g L}^{-1}$ e a do *P. sanguineus* $0,34 \text{ g L}^{-1}$, obtendo-se, nos valores produzidos pelos dois fungos um coeficiente de variação $\leq 16\%$.

Pelos valores das biomassas produzidas pelo *P. sanguineus* e pelo *T. versicolor* nos caldos de extrato de malte (caldos EM) e os valores dos caldos de Bushnell-Haas (caldos BH), ficou claro que ambos os fungos necessitam de uma fonte de carbono para auxiliar no crescimento, pois nos caldos de extrato de malte os valores produzidos em 10 dias de incubação foram superiores àqueles obtidos nos caldos de Bushnell-Haas durante o mesmo período de incubação.

4.6.3.5 Produção de biomassa pelo *P. sanguineus* e *T. versicolor* em caldo de Bushnell-Haas com corantes

Para observar se os corantes vermelho congo e verde malaquita teriam influência na produção das biomassas produzidas tanto pelo *P. sanguineus* como pelo *T. versicolor*, os corantes foram adicionados aos caldos Bushnell-Haas com pH 5,0 e 6,0 (caldo BH5 e caldo BH6), numa concentração de 25 mg L⁻¹.

No sentido de também avaliar qual o efeito da presença de glicose sobre a produção de biomassa, foram adicionados cerca de 100 mg L⁻¹ de glicose às soluções dos corantes nos caldos de Bushnell-Haas (caldo BHG5 e caldo BHG6). As biomassas produzidas pelos fungos foram quantificadas após 10 dias de incubação, cujos valores são apresentados na tabela 6.

Os valores apresentados na tabela 6 mostram que o caldo Bushnell-Haas contendo vermelho congo e glicose nos dois pH, propiciou em 10 dias de incubação a maior produção de biomassa tanto pelo *P. sanguineus* como pelo *T. versicolor*. Constatou-se, entretanto, que as quantidades de biomassa produzidas no pH 6,0 foi, em média, cerca de 32,6% inferior àquelas obtidas por ambos os fungos na primeira experiência com caldo de extrato de malte (caldo EM), pois em 5 dias de incubação foram produzidas, em média, cerca de 1,6 g L⁻¹ de biomassa, apresentado no sub-sub-subtítulo 4.6.2.1.

Tabela 6: Biomassa produzida (mg L^{-1}) pelos fungos *P. sanguineus* (Ps) e *T. versicolor* (Tv) em 10 dias de incubação a 35 e 30°C, n = 3.

Composição dos meios ³	Vermelho congo		Verde malaquita	
	Ps	Tv	Ps	Tv
BH - 5	10 ¹	24 ²	47	82
BH - 6	62	39	50	88
BHG - 5	398	346	123	88
BHG - 6	511	532	58	26

1. C. V máximo ≤ 59 % na biomassa do *P. sanguineus*
2. C.V. máximo ≤ 70 % na biomassa do *T. versicolor*.
3. caldos Bushnell-Haas (caldo BH) pH 5,0 e 6,0, e caldos Bushnell-Haas com 100 mg L^{-1} de glicose (caldo BHG) pH 5,0 e 6,0.

Esta produção inferior de biomassa nos caldos BH com o corante vermelho congo pode ser explicada pelo fato de que esta fonte de carbono não é tão facilmente metabolizada como os carboidratos existentes no extrato de malte, razão pela qual os fungos apresentaram um período de adaptação às condições do meio muito mais prolongadas do que àquelas observadas nos caldos extrato de malte, que de acordo com Reid (1989) pode acentuar a atividade dos fungos pelo seu teor de carboidratos.

Já nos caldos Bushnell-Haas com verde malaquita não se registrou incremento nas quantidades das biomassas produzidas em decorrência da adição de glicose, constatando-se valores similares aos produzidos nos caldos BH sem adição de glicose. Por estes resultados pode-se inferir que o verde malaquita parece ter um efeito estimulante na produção de biomassa tanto pelo

P. sanguineus como também pelo *T. versicolor*, mesmo na presença de caldos BH adicionados de glicose.

Na experiência com os corantes vermelho congo e verde malaquita em meios solidificados com ágar batata dextrose (ágar BD), mostrado no sub-subtítulo 4.3.2, foi registrado crescimento de ambos os fungos em 10 dias de incubação, provavelmente estimulados pelo ágar BD, constatando-se também que descoramento dos corantes só ocorreu nas placas inoculadas com *T. versicolor*.

Nos caldos BH com vermelho congo a presença de glicose teve efeito estimulador na produção de biomassa, como relatado por Selin *et al.*, (1975) de que a adição de 5% de glicose em meio de lignossulfato inoculado com *T. versicolor* ocasionou um incremento de 33% na biomassa produzida em 35 dias de incubação. Sandhu e Arora (1985) trabalhando com *P. sanguineus* em caldo de extrato de malte, observaram um incremento de 230% na biomassa produzida em decorrência da presença de glicose no meio.

A comparação das biomassas produzidas nos caldos Bushnell-Haas com pH 6,0 com os corantes vermelho congo e verde malaquita, apresentados no sub-sub-subtítulo 4.6.3.4, permitiu observar que são muito inferiores às biomassas produzidas, tanto pelo *P. sanguineus* como pelo *T. versicolor*, nos caldos Bushnell-Haas com pH 6,0 (caldos BH-6) sem corantes.

Pode-se concluir, assim, que a presença dos corantes vermelho congo e verde malaquita nos caldos de Bushnell-Haas dificultou a adaptação dos dois fungos às

fontes de carbono presentes nas soluções e, conseqüentemente, em desenvolver produção de biomassa nesse intervalo de tempo.

4.7 Atividades do *P. sanguineus* e *T. versicolor* sobre corantes em meios líquidos

No sentido de comparar a capacidade do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* em transformar ou degradar substâncias corantes, foram realizadas experiências para observar a atividade dos fungos sobre anilinas em solução, bem como o efeito que o caldo de extrato de malte, após inoculação com *T. versicolor* e incubação por um período de 20 dias teria sobre uma anilina em solução.

Na experiência visando observar a atividade direta dos fungos sobre uma anilina em solução foram utilizadas soluções da anilina vermelha em caldo de Bushnell-Haas com pH 6,0 inoculadas com *P. sanguineus* e *T. versicolor*, medindo a quantidade de anilina removida após 5 dias de incubação pelo uso de curvas-padrão, obtendo os resultados apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Anilina vermelha removida de caldo Bushnell-Haas (caldo BH) pH 6,0, após 5 dias de incubação com *P. sanguineus* (Ps) e *T. versicolor* (Tv). Variação da absorvância medida em 488nm e 25°C, n = 2.

Solução Anilina (mgL ⁻¹)	Quantidade de anilina removida após 5 dias (mg)			
	Ps (mg L ⁻¹)	Removido (mg)	Tv (mg L ⁻¹)	Removido (mg)
500	460 ¹	80	160 ²	340
1.000	620	380	490	510
2.000	1.450	550	1.420	580

1. C.V. máximo $\leq 37\%$ no *P. sanguineus*.

2. C.V. máximo $\leq 18,9\%$ no *T. versicolor*

Após 5 dias de incubação das soluções de caldo BH com anilina vermelha verificou-se que os dois fungos reduziram a concentração da anilina, principalmente nas soluções inoculadas com *T. versicolor* e com as menores concentrações de anilina, mas nas soluções com 2.000 mg L⁻¹ de anilina constatou-se remoções similares nas soluções inoculadas com cada um dos fungos, de 550 mg nas soluções com *P. sanguineus* e de 580 mg nas soluções inoculadas com *T. versicolor*.

Nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* houve uma produção de biomassa de forma mais intensa do que nas soluções com *T. versicolor*, evidenciando que o *P. sanguineus* tem uma capacidade de adaptação e crescimento maior do que o *T. versicolor*. Pelos resultados obtidos, entretanto, não se observou correlação entre a quantidade de biomassa produzida e a redução na concentração do

corante, pois embora o *P. sanguineus* tenha produzido mais biomassa, as diminuições da concentração do corante ocorreram sempre em taxas superiores nas soluções do *T. versicolor*.

Em outro experimento foram utilizadas soluções contendo as anilinas de cor verde e vinho na concentração de 1.000 mg L^{-1} e, da mesma forma que as soluções da anilina vermelha, foram inoculadas com *P. sanguineus* e *T. versicolor* e incubadas por 5 dias, após o qual mediram-se as concentrações residuais dos corantes em solução. Nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* não foram constatadas variações nas concentrações de nenhuma das anilinas, resultados que diferem dos encontrados com as mesmas anilinas em meio solidificado, quando foi constatado o descoramento total da anilina verde nas placas inoculadas com *P. sanguineus* e incubadas por um período de 10 dias.

Nas soluções de anilinas inoculadas com *T. versicolor*, entretanto, foram constatadas diminuições substanciais da concentração da anilina verde em 5 dias de incubação, com uma remoção de 800 mg e nas soluções da anilina cor vinho a remoção foi de 200 mg, possibilitando registrar que os fungos apresentam uma atividade diferenciada devido à estrutura das anilinas, pois as variações nas concentrações das anilinas vinho e verde foram muito diferenciadas, podendo-se supor que diferentes sistemas enzimáticos sejam responsáveis para atuar sobre diferentes estruturas moleculares.

Os resultados obtidos pela atividade do *T. versicolor* sobre as anilinas em meios líquidos e solidificados foram coerentes, pois houve descoloramento das anilinas nos meios solidificados e diminuição das suas concentrações em meios líquidos. O *P. sanguineus*, entretanto, não apresentou resultados coerentes entre as anilinas em meios solidificados e líquidos, como mostrado no sub-subtítulo 4.3.1.

Após o final dos 5 dias de incubação, as biomassas produzidas pelos fungos foram separadas dos caldos sobrenadantes e foi realizado um exame visual da aparência das mesmas. O exame possibilitou observar uma coloração residual nos micélios, demonstrando que além da possível modificação das anilinas pela atividade fúngica, também houve sorção das mesmas pela biomassa fúngica, o que denota comportamento similar ao observado por Yesilada (1995), que ao examinar os micélios de fungos cultivados em meios líquidos contendo violeta cristal encontrou parte do corante sorvido pela biomassa.

Estes resultados indicam que a diminuição da concentração dos corantes em solução pela atividade dos fungos pode ocorrer devido a uma ação conjunta da produção de enzimas e pela sorção de parte dos corantes pela biomassa produzida durante o período de incubação. As observações realizadas por Capalash e Sharma (1992) confirmam esta ação conjunta de enzimas e biomassa, pois ao estudarem a degradação de corantes azóicos por fungos concluíram que a cor do corante diminuiu na proporção em

que aumentou a concentração enzimática e a massa celular nas soluções.

Na experiência em que foi utilizado o caldo de extrato de malte (caldo EM) após 20 dias de incubação com *T. versicolor* numa mistura de reação contendo solução com 25 mg L⁻¹ de anilina vermelha, e monitorando a variação da absorbância da mistura como decorrência da atividade enzimática da lacase contida no caldo EM não foi registrado variação da absorbância durante os 10 minutos a partir da mistura dos reagentes.

Em face do resultado obtido com uso do caldo EM incubado com *T. versicolor* pode-se concluir que não houve atividade da lacase sobre a anilina vermelha, ao menos durante o período de 10 minutos de observação da absorbância da mistura de reação. Dessa forma, antevendo a possibilidade da reação de oxidação ser lenta, optou-se por utilizar diretamente os fungos sobre soluções contendo corantes, clarificando-as pela oxidação das substâncias a quinonas, que podem polimerizar em reações não-enzimáticas, formando agregados insolúveis que podem precipitar, como foi constatado nos trabalhos de Atlow et al., (1984), Shutleworth e Bollag (1986), Davis e Burns, (1990, 1992) e de Kirkpatrick et al., (1990).

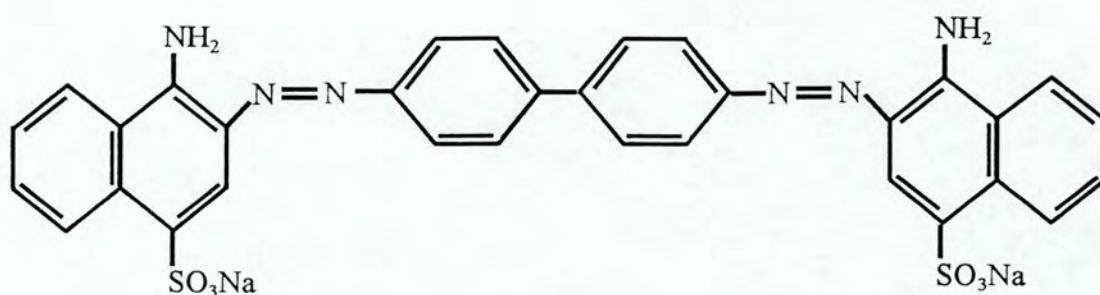
4.8 Características dos corantes vermelho congo e verde malaquita

Este experimento visou monitorar as atividades do *P. sanguineus* e *T. versicolor* sobre substâncias com estruturas aromáticas para servirem como modelos na transformação ou degradação de outros corantes com estruturas similares. A escolha do vermelho congo deveu-se à sua estrutura de corante azóico, e o verde malaquita pertence à categoria dos corantes derivados do trifenilmetano, que segundo Depuy e Rinehart Jr. (1967) pertencem aos dois grupos de corantes sintéticos mais utilizados comercialmente.

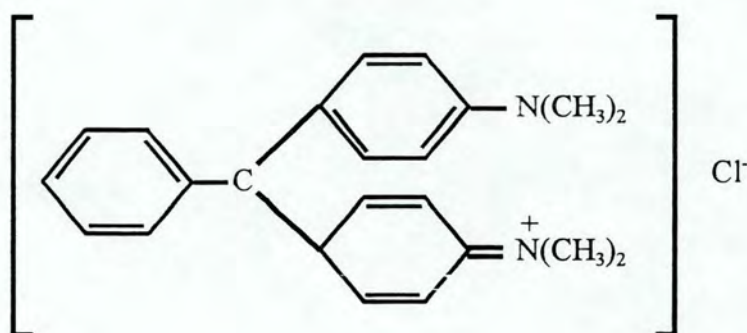
Na figura 13 são mostradas as estruturas dos corantes vermelho congo, um composto aromático difenílico e do verde malaquita, um composto diamino, de modo a caracterizar de forma clara as diferenças estruturais existente entre os dois compostos utilizados na pesquisa.

Pelos valores máximos da absorvância das soluções dos corantes, em 488nm para o vermelho congo e em 617nm para o verde malaquita, foi possível calcular uma diluição adequada para utilizar a espectrofotometria na quantificação da concentração dos corantes em solução.

A diluição das soluções seguiu as recomendações de Robyt e White (1987), de que as leituras da absorvância das soluções devem ficar entre os valores 0,05 e 0,30, sendo estes valores foram obtidos com a diluição das soluções com água destilada na proporção de 1:3, correspondendo a uma concentração inicial de 6,25 mg



(a)



(b)

Figura 13: Estrutura do vermelho congo (a): um sal dissódico 3,3[[1,1'Bifenil]-4,4'-diylbis-(azo)] bis[4-amino-1-ácido naftalenesulfônico]. E estrutura do verde malaquita (b): um cloreto de fenil-fenilmetileno N-[4-[-[4-(Dimetilamino)-fenil] fenilmetileno]-2,5-ciclohexadieno-1-ylidene] - N-cloreto - metilmetanamino; bis [cloreto p-(dimetilamino) - fenil] fenilmetileno.

L⁻¹. No sentido de avaliar se os caldos de Bushnell-Haas adicionados dos corantes e com e sem glicose também apresentariam valores dentro do intervalo sugerido, foram medidos os valores da absorvância de soluções diluídas na proporção 1:3.

Os resultados mostraram que os valores da absorvância de todas as soluções com vermelho congo ficaram entre 0,154 e 0,164, com coeficiente máximo de variação $\leq 4,9\%$, e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, não foram observadas diferenças significativas entre os valores da absorvância das diversas soluções, demonstrando que a composição e o pH das soluções não interferem na absorvância das soluções do vermelho congo.

Nas soluções com verde malaquita a absorvância das soluções com pH 5,0, com e sem glicose, situou-se entre os valores 0,340 e 0,359, com coeficiente máximo de variação $\leq 4,3\%$, e nas soluções com pH 6,0 os valores situaram-se entre 0,270 e 0,279, com coeficiente máximo de variação $\leq 3,4\%$. Pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, verificou-se que nas soluções com verde malaquita a absorvância das apresentou diferenças significativas devido à presença de glicose e valor do pH.

Para quantificar as variações das concentrações das soluções dos corantes vermelho congo e verde malaquita durante os períodos de incubação com *P. sanguineus* e *T. versicolor*, foram elaboradas curvas-

padrão da absorvância de soluções aquosas dos dois corantes, com pH 5,0 e 6,0 e concentrações variando de 5 a 25 mg L⁻¹. As leituras da absorvância foram realizadas na temperatura de 25°C e nos comprimentos de onda de máxima absorção de cada um dos corantes, obtendo os valores de absorvância das soluções que são apresentados no apêndice IX.

4.9 Atividade dos fungos sobre vermelho congo

4.9.1 Variação da concentração do corante

Para avaliar o desempenho do *P. sanguineus* e do *T. versicolor* sobre soluções de vermelho congo com diferentes pH e composições utilizaram-se caldos Bushnell-Haas com pH 5,0 e 6,0 (caldo BH-5 e caldo BH-6) e caldos Bushnell-Haas com 100 mg L⁻¹ de glicose (caldo BHG-5 e caldo BHG-6). Nestes caldos foram adicionados 25 mg L⁻¹ de vermelho congo e inoculados, separadamente, com *P. sanguineus* e *T. versicolor*, incubando por 10 dias e monitorando a cada 48 horas pela quantificação simultânea da absorvância e pH das amostras coletadas. Pela curva-padrão da absorvância das soluções do vermelho congo foi calculada a concentração residual, em mg L⁻¹, do corante em solução, cujos valores são mostrados na figura 14.

A figura 14 demonstra que as soluções do vermelho congo foram modificadas pela atividade do *P. sanguineus* e do *T. versicolor*, que é refletido pela diminuição da concentração do vermelho congo nas soluções com e sem glicose e nos dois pH ao longo do período de incubação.

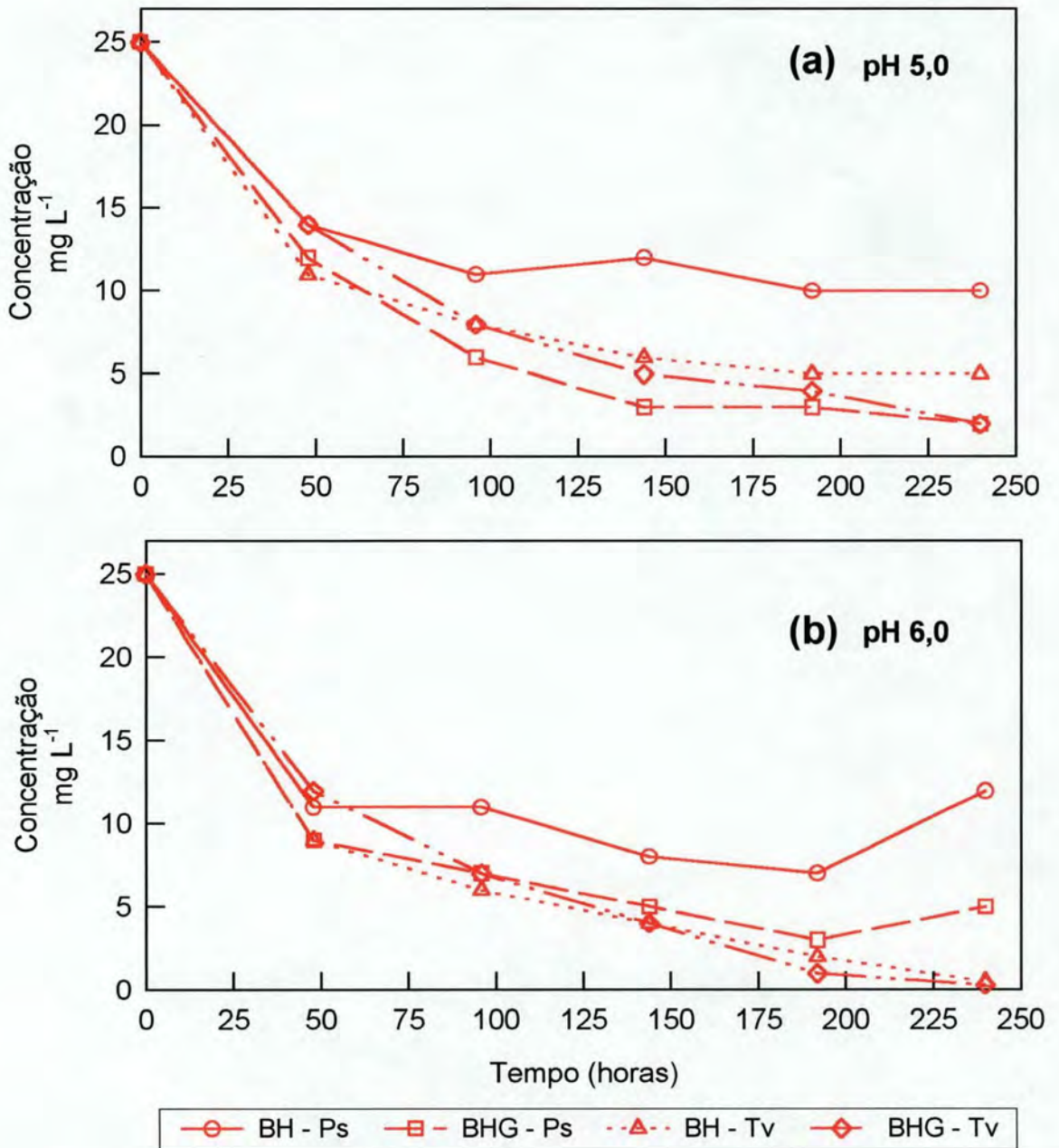


Figura 14: *Pycnoporus sanguineus* (Ps) e *Trametes versicolor* (Tv), variação da concentração do vermelho congo em 10 dias a 35 e 30°C em **(a)** caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg.L⁻¹(BHG) e **(b)** caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose. Coeficiente de variação ≤37,4%, n=5.

As maiores taxas de redução diária situaram-se nas primeiras 48 horas de incubação, alcançando valores entre 5,5 e 8,0 mg L⁻¹ dia⁻¹, tanto nas soluções com *P. sanguineus* como nas soluções com *T. versicolor*, em todas as condições utilizadas durante a experiência.

Pelas taxas de diminuição diária da concentração do vermelho congo calculadas nas primeiras 48 horas de incubação foi possível observar que a presença de glicose no meio de cultura favoreceu a redução da concentração do corante nas soluções inoculadas com *P. sanguineus*, com taxas de 8,0 mg L⁻¹ dia⁻¹ no pH 5,0 e de 6,5 mg L⁻¹ dia⁻¹ no pH 6,0. Nas soluções inoculadas com *T. versicolor* sem adição de glicose ocorreram as maiores diminuições da concentração do vermelho congo, com valores de 8,0 e 7,0 mg L⁻¹ dia⁻¹, nas soluções com pH 5,0 e 6,0, respectivamente.

A partir de 48 horas de incubação a situação se manteve idêntica, pois nas soluções sem glicose inoculadas com o *P. sanguineus* as taxas médias de diminuição da concentração do vermelho congo ficaram situadas entre 1,5 e 1,8 mg L⁻¹ dia⁻¹ e nas soluções com glicose as taxas variaram entre 2,2 e 2,3 mg L⁻¹ dia⁻¹.

Nas soluções com *T. versicolor* foi possível observar que as soluções com pH 5,0 apresentaram as maiores taxas médias diárias de redução da concentração do corante, com um valor de 2,5 mg L⁻¹ dia⁻¹, não havendo influência da presença de glicose sobre a atividade do *T. versicolor*. Nas soluções com pH 6,0 a taxa média diária

de redução da concentração foi de 2,3 mg L⁻¹ dia⁻¹ nas soluções com glicose e de 2,0 mg L⁻¹ dia⁻¹ nas soluções sem glicose.

Estes resultados mostraram que, dependendo do pH das soluções, a presença de glicose no meio pode influenciar a atividade do *T. versicolor*, tal como Archibald et al., (1990) constataram ao utilizar o *T. versicolor* no descoramento de efluentes kraft, quando só foi obtido descoramento nos meios adicionados de glicose.

Comparando os valores das reduções da concentração do vermelho congo ao final do período de incubação vê-se que nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* as percentagens de remoção variaram de 60% nas soluções sem glicose a 92% nas soluções com glicose, ambas no pH 6,0. Nas soluções inoculadas com *T. versicolor* as diminuições da concentração do vermelho congo variaram de 80% nas soluções com pH 6,0 sem glicose a 99%, obtida nas soluções com pH 5,0 adicionadas de glicose.

A análise de variância das variações da concentração do vermelho congo nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* mostrou diferenças significativas, ao nível de significância $\leq 0,1\%$, em relação ao pH, composição da solução, tempos de incubação e interação pH e composição da solução. Pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, verificou-se que nas primeiras 48 horas de incubação a diminuição da concentração do vermelho congo nas soluções com pH 5,0 adicionadas de

glicose apresentaram valores significativamente maiores do que os obtidos nas outras condições da experiência, mas depois de 144 horas não houve mais diferenças significativas nos valores da redução da concentração do corante.

A interação entre a composição das soluções e os valores do pH apontaram que as maiores variações da concentração do vermelho congo ocasionadas pelo *P. sanguineus*, ao nível de significância $\leq 1\%$, ocorreram na presença de glicose em ambos pH, significativamente diferente das variações ocorridas nas soluções sem glicose.

A análise de variância da diminuição da concentração do vermelho congo nas soluções inoculadas com *T. versicolor* mostraram diferenças significativas, ao nível de significância $\leq 0,1\%$, em relação aos pH e tempos de incubação, enquanto que nas interações pH e composições das soluções, pH e tempos de incubação, e composições das soluções com tempos de incubação não apresentaram diferenças significativas.

O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade mostrou diferenças significativas na variação da concentração do vermelho congo em função dos pH e das composições das soluções, com as maiores variações ocorrendo nas soluções com pH 5,0 e glicose. Constatou-se também variações da concentração do vermelho congo com diferenças significativas em todos os intervalos de monitoramento da experiência.

4.9.2 Variação do pH das soluções

Na figura 15 são mostradas as variações do pH das soluções de vermelho congo inoculadas com *P. sanguineus* e com *T. versicolor*. O monitoramento do pH das soluções, efetuado simultaneamente com o da variação da concentração do corante teve a finalidade de acompanhar a influência que a atividade dos dois fungos ocasionaria sobre o valor do pH das diferentes soluções durante o período de incubação.

Pela observação dos valores apresentados na figura 15 ficou patente que as maiores variações dos valores do pH das soluções com vermelho congo ocorreram naquelas com glicose, inoculadas com *P. sanguineus* e com *T. versicolor*, ocorrendo diminuição de 1,5 unidades de pH nas soluções com pH 6,0 e de 1,3 unidades nas soluções com pH 5,0. Nas soluções sem glicose a variação total do pH não ultrapassou 0,3 unidades ao final do período de 10 dias de incubação.

Constatou-se também que nas soluções sem glicose, além da variação do pH ser mínima durante o período de incubação, a variação do pH nas primeiras 48 horas foi de 4,5%, coincidindo com o período onde ocorreram as maiores taxas de diminuição da concentração do vermelho congo, evidenciando que a diminuição da absorbância das soluções com vermelho congo e, conseqüentemente, da concentração do corante, não ocorreu devido à diminuição do pH das

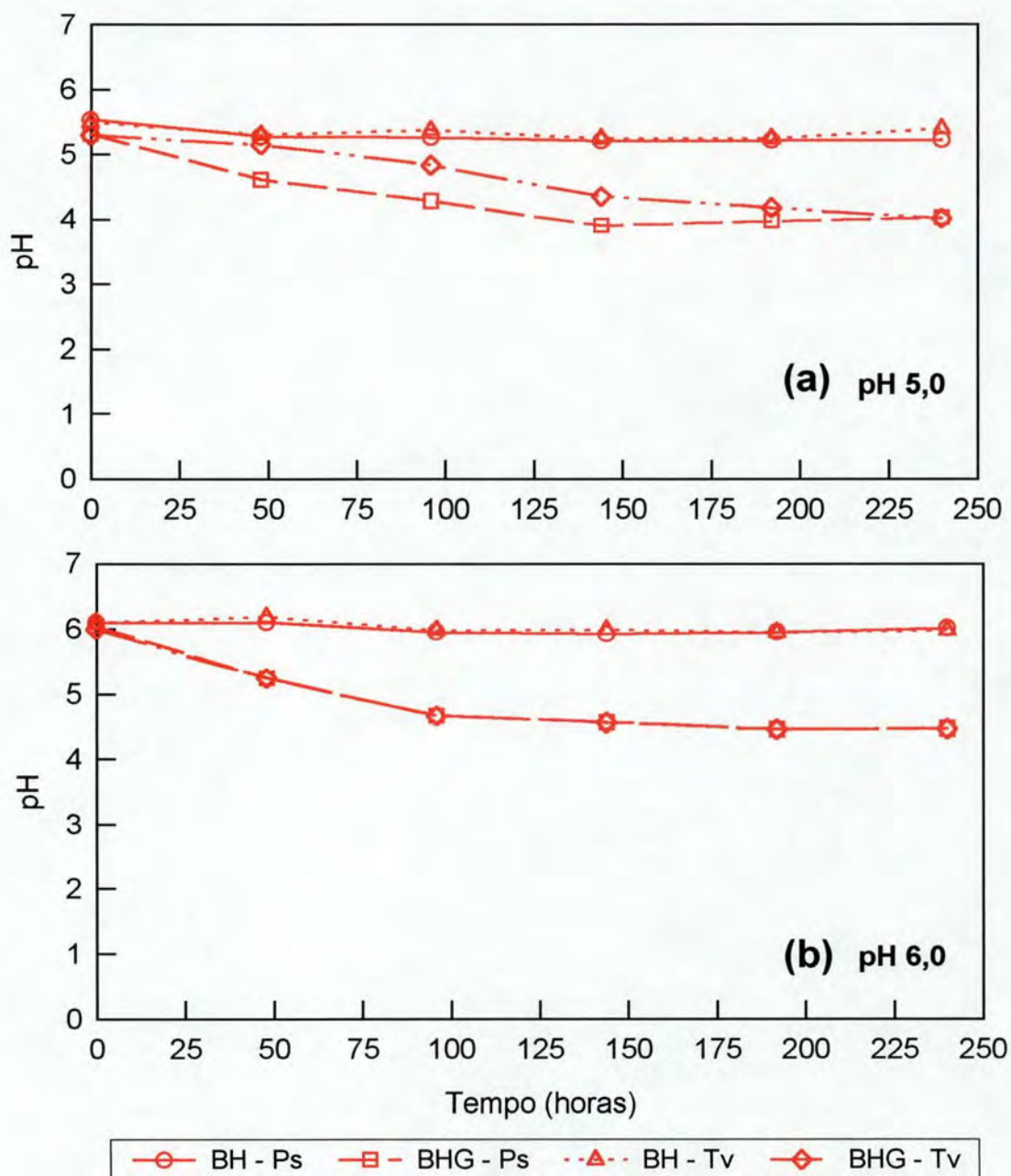


Figura 15: *Pycnoporus sanguineus* (Ps) e *Trametes versicolor* (Tv), variação do pH das soluções do vermelho congo em **(a)** caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg.L⁻¹ (BHG) e **(b)** caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose, em 10 dias a 35 e 30°C. Coeficiente de variação ≤ 3%, n=5.

soluções, mas possivelmente pela transformação ou degradação do corante como decorrência da atividade fúngica ou sorção pelo micélio.

A análise de variância das variações do pH nas soluções do vermelho congo mostrou que as mesmas foram significativas em função dos fungos e dos tempos de incubação, com nível de significância $\leq 1\%$. As variações do pH devido às interações dos fungos com os corantes e com os tempos de incubação não apresentaram diferenças significativas.

O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade mostrou que nas soluções com pH 5,0 a variação entre o valor inicial do pH e o de 48 horas depois apresentou diferença significativa, mas a partir de 48 horas de incubação não foram mais constatadas variações significativas do pH até o fim do período de incubação.

Nas soluções com pH 6,0 o teste de Tukey não mostrou diferenças significativas nas variações do pH nas primeiras 96 horas de incubação, mas entre 96 horas e 144 horas de incubação ocorreram variações do pH que foram significativamente diferentes do valor inicial. A partir de 144 horas de incubação não ocorreram mais diferenças significativas nas variações do pH.

4.9.3 Sorção do vermelho congo pela biomassa e discos de ágar

A observação das soluções de vermelho congo após o período de 10 dias de incubação com *P. sanguineus* e com *T. versicolor* possibilitou visualizar diferentes aspectos das soluções em decorrência das diferentes composições e dos fungos utilizados.

Nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* pode-se apontar a influência que a presença de glicose ocasionou na produção de biomassa, como intensa produção nas soluções com pH 5,0 e 6,0, mas em proporções muito inferiores às experimentadas na presença de glicose. Também foi possível observar que nos micélios produzidos pelo *P. sanguineus* ocorreu sorção parcial do vermelho congo, denotada pela leve coloração característica do corante nos micélios, tal como ocorreu na avaliação dos fungos sobre os corantes em meios solidificados, apresentado no sub-subtítulo 4.3.2.

Nas soluções com glicose os líquidos sobrenadantes apresentaram aspecto límpido e descorado, enquanto que nas soluções sem glicose haviam resquícios de corante. No teste de produção de lacase em caldos BH com o vermelho congo detectou-se atividade em todas as condições experimentadas nas soluções com *P. sanguineus*, como mostrado no sub-subtítulo 4.5.4. Foram também

encontrados resquícios do corante sorvidos nos discos de ágar utilizados como inóculos do *P. sanguineus*.

A observação das soluções inoculadas com *T. versicolor* constatou produção de biomassa em todas as condições experimentadas, sendo notado que praticamente não houve sorção do vermelho congo pelo micélio desse fungo, pois o mesmo apresentou a cor branca característica, tal como ocorreu com o vermelho congo em meio solidificado, quando houve descoramento e produção de micélio de cor branca, citado no sub-subtítulo 4.3.2.

Da mesma forma do que foi registrado nas soluções do vermelho congo com *P. sanguineus*, também nas soluções inoculadas com *T. versicolor* houve sorção do corante pelos discos de ágar do inóculo, porém os líquidos sobrenadantes apresentaram-se límpidos e descorados, o que vem corroborar o fato de que o *T. versicolor* produziu lacase nos caldos BH com vermelho congo, conforme mostrado na tabela 4.

Medindo a absorbância das soluções obtidas pela extração dos resíduos do vermelho congo dos micélios produzidos pelo *P. sanguineus* e pelo *T. versicolor* pôde-se confirmar que não houve sorção do corante pelo micélio do *T. versicolor*, mas nas soluções do *P. sanguineus* constatou-se maior sorção de vermelho congo no micélio produzido na solução com pH 6,0 adicionada de glicose, com um valor de $9,0 \text{ mg L}^{-1}$, coincidindo com a condição

onde foi produzida maior quantidade de biomassa, já nas soluções com pH 5,0 houve sorção de $7,6 \text{ mg L}^{-1}$. Este fenômeno foi também observado por Cripps et al., (1990) e Yesilada (1995).

Para observar as transformações que o *P. sanguineus* e o *T. versicolor* ocasionaram sobre o vermelho congo tornou-se necessário avaliar o impacto que a sorção do corante pelos discos de ágar pode trazer aos resultados obtidos, podendo causar distorções na interpretação da influência que a atividade dos fungos podem ter na transformação ou degradação deste corante.

Dessa forma, para avaliar o grau de sorção do vermelho congo pelos discos de ágar foi efetuada uma experiência incubando 50 mL de soluções de vermelho congo com dois discos de ágar BD com 20 mm de diâmetro, idênticos aos utilizados para inocular as soluções, avaliando a concentração residual do v. corante em solução após 10 dias de incubação. Os resultados obtidos mostraram que houve uma diminuição de cerca de 2,8% do corante da solução, correspondendo a uma sorção de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ durante o período de 10 dias de incubação.

4.10. Atividade dos fungos sobre o verde malaquita

4.10.1 Variação da concentração do corante

Pela figura 16 observou-se que, da mesma forma que constatado nas experiências com as soluções do vermelho congo, também nas soluções com verde malaquita as maiores taxas de diminuição da concentração do corante foram obtidas nas primeiras 48 horas de incubação. Apesar dessa similaridade na variação da concentração do verde malaquita com o ocorrido nas soluções de vermelho congo, com verde malaquita as reduções da concentração do corante após 10 dias de incubação, em todas as condições experimentadas, foram inferiores às obtidas nas soluções com vermelho congo.

As diminuições da concentração do verde malaquita em percentuais inferiores àqueles obtidos nas soluções do vermelho congo foram verificadas principalmente nas soluções inoculadas com o *P. sanguineus*, cuja atividade na solução com pH 6,0 adicionada de glicose propiciou uma redução de 40% da concentração inicial do corante, mas nas outras condições de pH e composições das soluções alcançou uma diminuição total de 28% da concentração inicial do corante.

Nas primeiras 48 horas de incubação a maior taxa diária de redução da concentração do verde malaquita foi de $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, obtida na solução com pH 6,0 e glicose, coincidentemente com a única condição em que foi

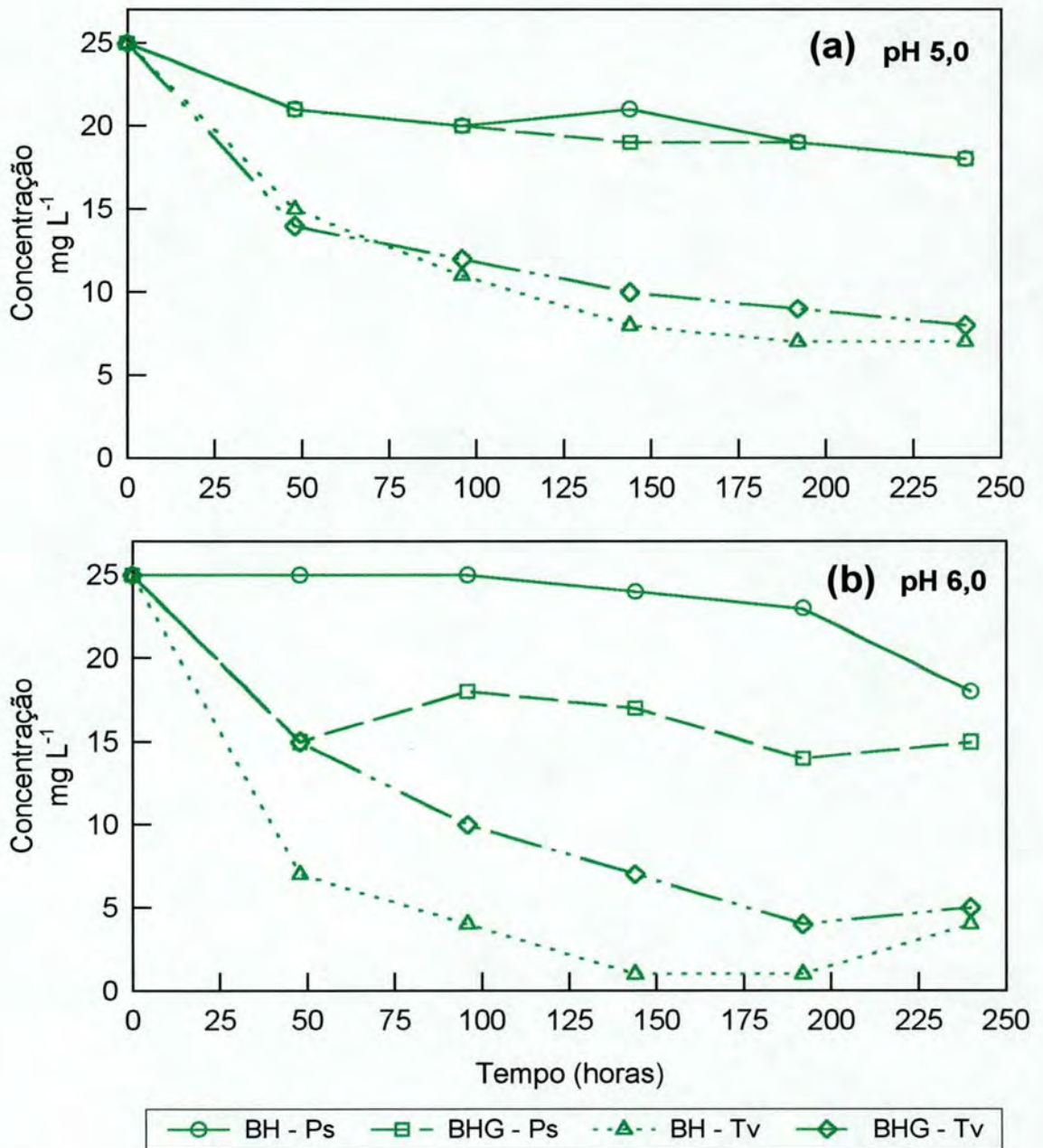


Figura 16: *Pycnoporus sanguineus* (Ps) e *Trametes versicolor* (Tv), variação da concentração do verde malaquita em 10 dias a 35 e 30°C em **(a)** caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg.L⁻¹ (BHG) e **(b)** caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose. Coeficiente de variação ≤23,8%, n=5.

detectada produção de lacase pelo *P. sanguineus* nos caldos BH com verde malaquita, como mostrado na tabela 3, porém nas soluções com pH 6,0 sem glicose não foi constatada variação da concentração do verde malaquita nas primeiras 48 horas de incubação.

É possível assinalar também, que nas soluções com pH 5,0 inoculadas com *P. sanguineus* praticamente não houve diferença nos valores da variação da concentração do verde malaquita durante o período de 10 dias de incubação, nas soluções com ou sem glicose. Esta similaridade na atividade do *P. sanguineus* nas soluções com pH 5,0, evidencia o fato de que neste valor de pH nem a adição de glicose ao meio de cultura foi capaz de induzir atividade mais intensa do *P. sanguineus* sobre o verde malaquita, ocorrendo uma taxa média diária de redução da concentração de $0,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nas duas soluções.

A análise de variância da variação da concentração das soluções com verde malaquita inoculadas com *P. sanguineus* mostrou que existem diferenças significativas, ao nível de significância $\leq 0,1\%$ dos valores da concentração em função do pH, das composições das soluções e dos tempos de incubação, com um coeficiente de variação $\leq 13,3\%$.

O teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade demonstrou que as variações da concentração do verde malaquita nas soluções com pH 6,0 adicionadas de glicose são significativamente maiores das que ocorreram nas

outras condições da experiência. Também se constatou que a diminuição da concentração do verde malaquita nas primeiras 48 horas de incubação apresentou um valor significativamente maior do que as diminuições obtidas a partir de 48 horas de incubação, quando não foram mais observadas diferenças significativas nas variações da concentração do corante até o fim do período de incubação.

A aplicação do teste de Tukey às médias da interação pH e composições das soluções demonstrou que nas soluções com *P. sanguineus*, pH 6,0 com e sem adição de glicose as diminuições da concentração do verde malaquita não apresentaram diferenças significativas entre si, mas foram significativamente diferentes das variações de concentração obtidas nas outras condições experimentadas.

Nas soluções inoculadas com *T. versicolor* também foram registradas as maiores taxas de redução da concentração do verde malaquita nas primeiras 48 horas de incubação, variando entre 5,0 e 9,0 mg L⁻¹ dia⁻¹, valores superiores aos obtidos nas soluções inoculadas com *P. sanguineus*. A diminuição total da concentração do verde malaquita pela atividade do *T. versicolor* variou de 68% nas soluções com pH 5,0 e glicose até 84% nas soluções com pH 6,0 sem glicose.

De forma similar ao observado nas soluções com verde malaquita inoculadas com *P. sanguineus*, também nas soluções com *T. versicolor* foi demonstrado que nas

soluções com pH 5,0 e 6,0 a adição de glicose não influenciou positivamente as taxas de variação da concentração do verde malaquita, ficando as taxas médias de diminuição em $1,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nas soluções sem glicose e de $1,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nas soluções com glicose. Nas soluções com pH 6,0 as taxas médias de diminuição foram $2,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nas soluções sem glicose e de $2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ na presença de glicose.

A análise de variância da variação da concentração das soluções de verde malaquita inoculadas com *T. versicolor* demonstrou diferenças significativas nas variações do corante em função do pH, mas não se registraram diferenças significativas em relação às composições das soluções. As médias das variações da concentração do verde malaquita apresentaram um coeficiente de variação máximo elevado ($\leq 47,3\%$), e a análise estatística das interações pH e composições do meio, pH e tempos de incubação e composições do meio e tempos de incubação apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade mostrou diferenças significativas entre as médias da variação da concentração do verde malaquita em função do pH e composições das soluções, predominando as maiores variações nas soluções com pH 6,0 sem glicose, significativamente diferentes das variações nas soluções com glicose e nas soluções com pH 5,0, que não apresentaram diferenças significativas entre si.

As variações da concentração do verde malaquita em função dos tempos de incubação apresentaram diferenças significativas entre o tempo zero e após 48 horas, não havendo diferenças significativas nas variações entre 48 e 144 horas, mas a partir de 192 horas novamente registrou-se diferenças significativas nas variações da concentração do v. malaquita.

4.10.2 Variação do pH das soluções

Na figura 17 são mostradas as variações do pH das soluções de verde malaquita inoculadas com *P. sanguineus* e com *T. versicolor*. De forma similar ao registrado nas soluções com vermelho congo, observou-se a variação do pH junto com as variações da concentração do verde malaquita para avaliar a influência dos fungos sobre o corante e o pH das soluções durante o período de incubação utilizado na experiência.

A observação da variação dos valores do pH das soluções com verde malaquita durante os 10 dias de incubação permitiram registrar que, tal como ocorreu com as soluções do vermelho congo, as maiores variações do pH foram observadas nas soluções com glicose, com diminuição de 1,3 unidades de pH nas soluções com pH 5,0 inoculadas com *T. versicolor* e de 1,6 unidades nas soluções com pH 6,0 com *P. sanguineus*.

Nas soluções sem glicose a variação máxima registrada foi de 0,5 unidades de pH na solução com pH 5,0 inoculada com *P. sanguineus*. Verificando-se também

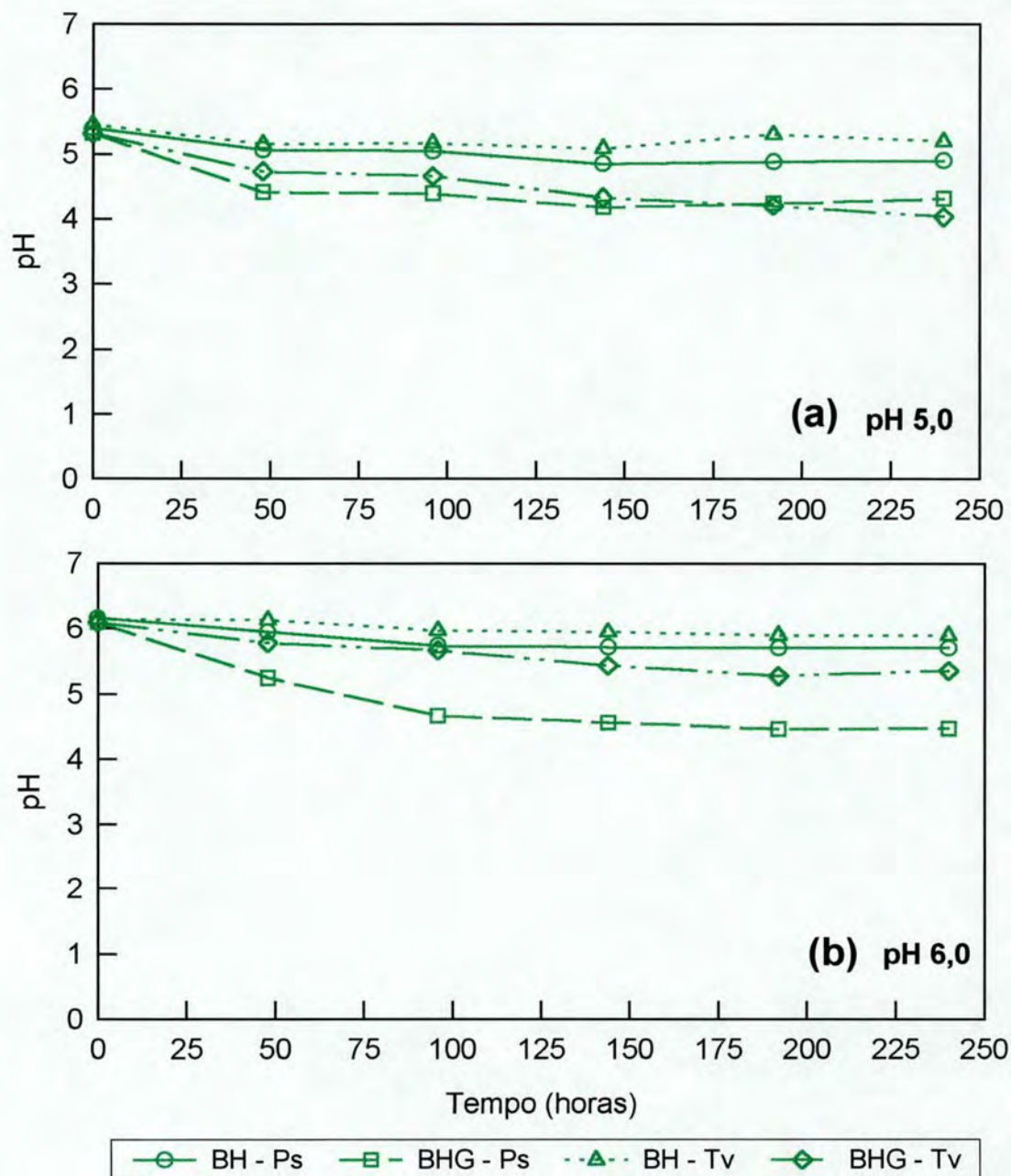


Figura 17: *Pycnoporus sanguineus* (Ps) e *Trametes versicolor* (Tv), variação do pH das soluções do verde malaquita em **(a)** caldos Bushnell-Haas pH 5,0 (BH) e caldo BH com 100 mg.L⁻¹ (BHG) e **(b)** caldo BH pH 6,0 (BH) e com glicose, em 10 dias a 35 e 30°C. Coeficiente de variação ≤ 2%, n=5.

que nas primeiras 48 horas de incubação nas soluções sem glicose o pH variou apenas 1,5%, coincidindo com o período de incubação onde foram registradas as maiores diminuições da concentração do corante, possibilitando supor que não foi pela variação do pH que ocorreu a diminuição da concentração do verde malaquita, mas possivelmente pela atividade enzimática dos fungos, causando a transformação ou degradação do corante.

Estas variações do pH das soluções, tanto do vermelho congo como do verde malaquita nas soluções sem adição de glicose permitiram inferir que não foi em decorrência de uma acentuada variação do pH que foram observadas as variações da absorbância das soluções e, conseqüentemente, da concentração do corante, tal como encontraram Cripps *et al.*, (1990) ao estudarem a biodegradação de corantes azóicos e heterocíclicos pelo *P. chrysosporium*, observando que o descoramento não ocorreu devido às variações do pH das soluções.

A análise de variância da variação do pH nas soluções com verde malaquita mostrou diferenças significativas devido aos fungos e aos períodos de incubação, ao nível de significância $\leq 1\%$, não havendo variações significativas dos valores do pH devido às interações dos fungos e tempos de incubação. Estes resultados apresentaram similaridade com aqueles obtidos com as soluções do vermelho congo, tanto as inoculadas com *P. sanguineus* como as inoculadas com *T. versicolor*.

Pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade vê-se que nas soluções com pH 5,0 ocorreram diferenças significativas entre os valores iniciais do pH e os medidos após 48 horas, mas a partir de 48 horas não foram mais encontradas diferenças significativas nas variações do pH até o fim da incubação, tal como ocorreu também com as soluções com vermelho congo. As variações do pH em função dos fungos e das composições das soluções mostraram diferenças significativas, com valores mais distanciados em relação aos valores iniciais do pH, nas soluções com *P. sanguineus* adicionadas de glicose.

Nas soluções com pH 6,0 a análise de variância mostrou que as variações do pH foram similares às que ocorreram nas soluções com pH 5,0, mas nas primeiras 96 horas de fermentação a variação do pH não foi significativa, só apresentando diferenças significativas entre 96 e 144 horas. A partir daí as variações não foram significativas até o fim do período de incubação. As variações do pH devido à atividade dos fungos e das composições das soluções mostraram os maiores valores nas soluções com *P. sanguineus* e glicose. Nesta condição observaram-se diferenças significativas nas variações do pH pela interação fungos e composição das soluções.

4.10.3 Sorção do verde malaquita pela biomassa e discos de ágar

Observando as soluções de verde malaquita após o período de 10 dias de incubação com *P. sanguineus* e com

T. versicolor foi possível assinalar que na presença do verde malaquita não se constatou produção de biomassa pelo *P. sanguineus* em todas as condições experimentadas, mesmo nas soluções adicionadas de glicose não houve crescimento micelial.

Também pode ser observado que nas soluções com *P. sanguineus* praticamente não ocorreu mudança na intensidade da cor original das soluções, permanecendo os líquidos sobrenadantes límpidos e os discos de ágar apresentando sorção de verde malaquita em todas as condições experimentadas.

Com as soluções inoculadas com *T. versicolor*, entretanto, as condições das soluções após o período de 10 dias de incubação foram diferentes das observadas nas soluções com *P. sanguineus*, pois ocorreu descoramento total dos líquidos sobrenadantes e produção de biomassa em todas as condições experimentadas. Houve também sorção do corante tanto pelo micélio como pelos discos de ágar, numa proporção de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ nas soluções com pH 6,0 sem glicose, e de $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ nas soluções com pH 5,0 e glicose, condições em que foram observadas as maiores produções de biomassa pelo *T. versicolor*.

A avaliação da influência que os discos de ágar, utilizados como inóculos, pudessem ter ocasionado na concentração do verde malaquita pela sorção de parte do corante pelo ágar BD do inóculo foi efetuada uma experiência similar à conduzida com as soluções do vermelho congo, adicionando-se dois discos de ágar em 50

mL de solução do verde malaquita e incubando durante 10 dias. A quantificação das concentrações residuais de verde malaquita em solução mostraram que a sorção do verde malaquita pelos discos de ágar ocorreu numa proporção superior ao obtido com o vermelho congo, com uma diminuição da concentração em torno de 12%, correspondendo a uma sorção de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ durante o período de 10 dias de incubação.

4.11 Avaliação da transformação ou degradação dos corantes pelos fungos

Estudos sobre a atividade de fungos degradadores de madeiras sobre corantes em solução foram realizados por diversos pesquisadores, tal como Glen e Gold (1983) que estudaram a degradação de corantes poliméricos, Chao e Lee (1994) que avaliaram fontes de carbono na degradação de corantes azóicos e Ollikka et al., (1993) que estudaram a atividade de fungos sobre corantes do tipo azóicos, do trifenilmetano, heterocíclicos e poliméricos.

Nas experiências realizadas, as maiores variações da concentração do vermelho congo ocorreram nas soluções com glicose inoculadas com *P. sanguineus*, alcançando um percentual de 88%, ou remoção de 22 mg L^{-1} nas soluções com pH 5,0 e de 92%, ou 23 mg L^{-1} nas soluções com pH 6,0. Nas soluções inoculadas com *T. versicolor* as maiores remoções do vermelho congo ocorreram no pH 5,0,

alcançando 98%, ou 24,5 mg L⁻¹ nas soluções sem glicose e de 99%, ou 24,7 mg.L⁻¹ na solução com glicose.

Nas soluções com verde malaquita as variações foram menores do que as que ocorreram com o vermelho congo, com uma diminuição máxima de 40%, ou de 10 mg L⁻¹ nas soluções com pH 6,0 e glicose inoculadas com *P. sanguineus* e de 84%, ou 21 mg L⁻¹ nas soluções com pH 6,0 sem glicose e inoculadas com *T. versicolor*.

Por estes resultados objetivou-se encontrar uma forma de avaliar a proporção que a atividade enzimática teria na transformação ou degradação destes corantes. Assim, considerando os relatos de Capalash e Sharma (1992), que observaram que a redução da concentração dos corantes ocorria por uma conjugação de produção de enzimas e de biomassa, foi feita uma experiência para quantificar a influência que a biomassa e os discos de ágar BD do inóculo pudessem ter sobre a diminuição da concentração do vermelho congo e do verde malaquita em solução.

A quantidade de vermelho congo que sofreu sorção pelo micélio do *P. sanguineus* no período de 10 dias de incubação foi de 7,6 mg L⁻¹ nas soluções com pH 5,0 e de 9,0 mg L⁻¹ nas soluções com pH 6,0, ambas com adição de glicose. Considerando ainda que nos discos de ágar houve sorção de cerca de 0,7 mg L⁻¹ no mesmo período de incubação, pode-se registrar que das 22 e 23 mg L⁻¹ de remoção do vermelho congo nas soluções com pH 5,0 e 6,0 inoculadas com *P. sanguineus*, a remoção de cerca de 62%

no pH 5,0 e 58% no pH 6,0 ocorreu devido à atividade do fungo, ficando a sorção parcial do corante pela biomassa responsável pela remoção de 35% no pH 5,0 e de 39% no pH 6,0, sendo de 3% a remoção do corante nos dois pH devido à sorção pelos discos de ágar.

Nas soluções de vermelho congo inoculadas com *T. versicolor* constatou-se que a diminuição do corante ocorreu principalmente pela atividade do fungo, pois uma remoção de 97% ocorreu devido a atividade fúngica e 3% pela sorção do corante pelos discos de ágar, uma vez que não foi constatada sorção pela biomassa produzida pelo *T. versicolor* durante o período de incubação.

Nas soluções com verde malaquita foram constatadas sorções do corante nos micélios do *T. versicolor* nos valores de 0,2 mg L⁻¹ nas soluções com pH 6,0 e de 0,9 mg L⁻¹ nas soluções com pH 5,0, ambas sem glicose, enquanto que nas soluções com *P. sanguineus* não foi observado crescimento micelial. As experiências com discos de ágar nas soluções com verde malaquita mostraram uma sorção de 3,0 mg L⁻¹.

Nas soluções com pH 5,0 sem glicose com *T. versicolor* a remoção do verde malaquita foi da ordem de 85% devido à atividade do fungo, 1% pela sorção do corante pelo micélio e de 14% pela sorção dos discos de ágar. Nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* onde ocorreu maior remoção da concentração do verde malaquita, cerca de 70% deveu-se à atividade do fungo e 30% pela sorção do corante pelos discos de ágar do inóculo.

Pelos resultados pode-se traçar uma relação estreita entre a variação da concentração dos corantes e a produção de biomassa, principalmente nas soluções do vermelho congo inoculadas com *P. sanguineus*. Já com as soluções do verde malaquita não foi observada relação entre as remoções do corante com a produção de biomassa.

Nas soluções de vermelho congo inoculadas com *T. versicolor* caracterizou-se a correspondência entre a quantidade de biomassa produzida pelo fungo e a remoção do corante mas, de forma similar ao que ocorreu com as soluções de verde malaquita inoculadas com *P. sanguineus*, também nas soluções com *T. versicolor* não se observou relação entre biomassa e variação da concentração do corante.

Comparando a variação da concentração dos dois corantes, monitoradas em intervalos de 48 horas durante 10 dias de incubação através da análise de variância e do teste de Tukey de diferença de médias ao nível de 5% de probabilidade, foi possível estabelecer que os mais importantes resultados estatísticos do presente trabalho podem ser resumidos como segue.

- 1) A análise de variância das concentrações dos corantes ao longo dos 10 dias de incubação, em função dos fungos, dos períodos de monitoramento, dos pH e das composições das soluções mostraram diferenças muito significativas ($p < 0,1\%$);

- 2) A análise de variância das concentrações dos corantes em função da interação corantes, pH e

composições das soluções mostraram diferenças significativas ($p < 7\%$); e da interação fungos, pH e composições das soluções também mostraram diferenças significativas ($p < 4\%$);

3) Pela análise de variância pode-se concluir que a atividade degradadora do *P. sanguineus* diferenciou-se significativamente da atividade do *T. versicolor* devido às variáveis pH, composições das soluções, tipos de corantes e duração dos períodos de incubação.

A aplicação do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, às médias das concentrações dos corantes ao longo do período de incubação permitiram obter os seguintes resultados:

1) O vermelho congo apresentou as maiores variações de sua concentração em relação às variações do verde malaquita, significativamente diferentes, sendo mais suscetível à atividade fúngica;

2) As maiores variações das concentrações dos corantes ocorreram nas soluções com pH 6,0, com diferenças significativas das variações da concentração obtidas nas soluções com pH 5,0;

3) As maiores variações das concentrações dos corantes ocorreram nas soluções com pH 6,0 adicionadas de 100 mg L^{-1} de glicose, com diferenças significativas das variações obtidas nas soluções sem glicose;

4) As maiores variações da concentração dos corantes ao longo do período de incubação ocorreram nas

soluções com vermelho congo, tanto nas soluções com e sem adição de glicose, sem diferenças significativas;

5) As variações das concentrações das soluções do verde malaquita apresentaram diferenças significativas entre si, com as maiores variações ocorrendo nas soluções com glicose;

6) as variações das concentrações das soluções com verde malaquita em função das composições das soluções foram menores e diferiram significativamente, das variações das concentrações das soluções do vermelho congo;

7) Não foram constatadas diferenças significativas, nas variações das concentrações das soluções do vermelho congo em função dos valores do pH das soluções;

8) As variações das concentrações das soluções do verde malaquita foram significativamente menores do que as variações que ocorreram nas soluções com vermelho congo, sendo também diferentes entre si, com as maiores variações nas soluções com pH 6,0.

É importante considerar que no próximo século a indústria terá, cada vez mais, a necessidade imperiosa de considerar os fatores ambientais quando planejar novos processos, bem como todos os processos serão, por sua vez, objeto de estritas regulamentações ambientais. A geração de resíduos industriais tornar-se-á anti-econômica bem como dispendiosa em termos ambientais, pois o

conceito de que "o poluidor paga" assegurará que muito mais atenção deverá ser dada ao tratamento dos resíduos industriais.

Os processos biológicos exercem importante papel nos processos de tratamentos dos resíduos industriais, atuando através de consórcios bacterianos desconhecidos, como ocorre nos processos de lodos ativados. Mas deve-se considerar que o uso de organismos conhecidos propiciará um maior controle e otimização dos processos de tratamentos biológicos, possibilitando ampliar as aplicações dos mesmos a resíduos recalcitrantes ou de baixo grau de biodegradação pelos tratamentos atualmente aplicados.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados que foram obtidos e discutidos no presente trabalho possibilitaram extrair as seguintes conclusões:

a) O *P. sanguineus* e *T. versicolor* crescem tanto em meios de cultura líquidos e semi-sólidos, com o *P. sanguineus* apresentando as maiores taxas de crescimento;

b) O *T. versicolor* produziu mais lacase em cultura estática em caldo de extrato de malte e pH 6,0 e o *P. sanguineus* em cultura agitada;

c) A ausência de uma fonte de carbono inibiu a produção de lacase pelos dois fungos;

d) Os dois fungos descoraram anilinas em solução e em meios solidificados, com o *T. versicolor* apresentando maior eficiência no descoramento;

e) O grau de descoramento dos corantes não está diretamente relacionado com a produção de biomassa pelos dois fungos;

f) O vermelho congo foi mais suscetível à atividade dos dois fungos do que o verde malaquita;

g) As maiores taxas de remoção dos corantes das soluções ocorreram nas primeiras 48 horas de incubação.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A. L.; TENDERDY, R. P.; MURPHY, V. G. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, p. 20-27, 1985.
- A. CHIMICAL. Problemas com corantes azo. **Revista do Couro**, Estância Velha, v. 21, n. 108, p.55
- ADDLEMAN, K.; ARCHIBALD, F. Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n.1, p. 266-273, 1993.
- AGOSIN, E.; MONTIES, B.; ODIER, E. Structural changes in wheat straw components during decay by lignin-degrading white-rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. **Journal of Science and Food Agriculture**, Chichester, v. 36, p. 925-935, 1985.
- AKHMEDOVA, Z.R.; BELETSKAYA, O.P.; DALIMOVA, G.N. et al. Selection and cultivation of cellulose and lignin degrading fungi. **Microbiology-AIBS**, New York, v. 63, n.5, P. 523-527, 1994.
- ALBERTI, B.N.; KLIBANOV, A.M. Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. **Biotechnology and bioengineering Symposium**, New York, n. 11, p. 373-379, 1981.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: J. Wiley, 1977. 467 p.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-

rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 109, p. 1-8, 1976.

ARCHIBALD, F.; PAICE, M.G.; JURASEK, L. Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus* (*Trametes*) *versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 12, p. 846-853, 1990.

ASSAVANIG, A.; AMORNKITTICHAROEN, B.; EKPAISAL, N. et al. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 38, p. 198-202, 1992.

ATLOW, S. C.; BONADONNA-APARO, L.; KLIBANOV, A. M. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by poliphenol oxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, p. 599-603, 1984.

ATTILI, D. S.; ARAUJO PINTO, I. M.; GRANDI, R. A. P. **Técnicas para detecção, caracterização e identificação de fungos filamentosos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1993. 135 p.

BASF S.A. Avaliação toxicológica de corantes azóicos. **Revista do Couro**, Estância Velha, v. 21, n. 107, p. 44-45, 1995

BENFIELD, G.; BOCKS, S.M.; BROMLEY, K. et al. Studies of fungal and plant laccases. **Phytochemistry**, New York, v. 3, p. 79-88, 1964.

BERGBAUER, M.; EGGERT, C. Degradability of chlorine-free bleachery effluent lignins by two fungi: effects on lignin subunit type and on polymer molecular weight. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 192-197, 1994.

BETTUCCI, L.; SPERANZA, M; PIAGGIO, M. Selection of white-rot fungi for biopulping. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 2., Campinas. [Anais ...]. Campinas: s. n., 1992. v. 3, p. 394 - 401.

BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C.E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1, p. 292-295, 1996.

- BLAICH, R.; ESSER, K. Function of enzymes in wood destroying fungi. II. multiple forms of laccase in white rot fungi. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 103, p. 271-277, 1975.
- BOGAN, B.W.; LAMAR, R.T. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HBH-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1597-1603, 1996.
- BOLLAG, J.-M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.
- BOLLAG, J.-M.; LIU, S.Y. Copolymerization of halogenated phenols and siryngic acid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 23, p. 261-272, 1985.
- BOLLAG, J.-M.; SJOBLAD, R. D.; YEN-LIU, S. Characterization of an enzyme from *Rhizoctonia praticola* which polymerizes phenolic compounds. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 25, p. 229-233, 1979.
- BOLLAG, J.-M.; LIU, S.Y.; MINARD, R.D. cross-coupling of phenolic humus constituents and 2,4-dichlorophenol. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 44, p. 52-56, 1980.
- BOLLAG, J.-M.; SHUTTLEWORTH, K. L.; ANDERSON, D. H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 12, p. 3086-3091, 1988.
- BORRIS, R. Biology of enzymes. In: KENNEDY, J. F. (Ed.) **Enzyme Technology**. Weinheim: VCH, 1987. 761 p., v. 7a., p. 35-62.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Demethylation and delignification of Kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 823-827, 1992.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for lacase in lignin

- biodegradation. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 267, p. 99-102, 1990.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.; REID, I. D. et al. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1876-1880, 1995.
- BOYLE, C.D.; KROPP, B.R.; REID, I.D. solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3217-3224, 1992.
- BUDAVARI, s. (Ed.). **The Merck index**. 11 ed. Rahway, N.J.: Merck, 1989. 1606 p.
- BUMPUS, J.A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 154-158, 1989.
- BUMPUS, J.A.; BROCK, B.J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1143-1150, 1988.
- BUSHNELL, C. D.; HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 41, p. 654-673, 1941.
- CALL, H. P.; MÜCKE, L. Further improvements of the laccase-mediator-system (LMS) for enzymatic delignification (bleaching) and results from large scale trials. INTERNATIONAL NON-CHLORINE BLEACHING CONFERENCE, Amelia Island, Florida, 1995. [Anais ...] Amélia Island: [s. n.], 1995. 7 p.
- CAPALASH, N.; SHARMA, P. Biodegradation of textile azo-dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 8, p. 309-312, 1992.
- CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied and**

- Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 205-210, 1985.
- CHAO, W. L.; LEE, S. L. Decolorization of azo dyes by three white-rot fungi: influence of carbon source. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 556-559, 1994.
- CORNISH-BOWDEN, A.; CÁRDENAS, M.L. Chemistry of enzymes. In: KENNEDY, J. F. ed. **Enzyme Technology**. Weinheim: VCH, 1987. 761 p., v. 7a., p. 3-33.
- CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 1114-1118, 1990.
- DAVIS, S.; BURNS, R. G. Covalent immobilisation of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 37, p. 474-479, 1992.
- DAVIS, S.; BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 32, p. 721-726, 1990.
- DePUY, C.H.; RINEHART Jr., K.L. **Introduction to Organic Chemistry**, New York: J. Wiley, 1967. 392 p. Cap. 16: Color and dyes.
- DHALIWAL, R. P. S.; GARCHA, H. S.; KHANNA, P.K. High laccase producing mutants of *Pleurotus florida*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 8, p. 39-41, 1992.
- DEC, J.; BOLLAG, J.-M. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. **Archives of Environmental contamination and toxicology**, New York, v. 19, p. 543-550, 1990.
- DUBERNET, M.; RIBEREAU-GAYON, P.; LERNER, H.R. et al. Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, New York, v. 16, p. 191-193, 1977.
- DUBOURDIEU, D.; GRASSIN, C.; DERUCHE, C. et al. Mise au point d'une mesure rapide de l'activite laccase dans

les mouts et dans les vins par la methode a la syringaldazine. Application a l'appréciation de l'état sanitaire des vendanges. **Connaissance Vigne Vin**, Montesquieu, v. 18, n.4, p. 237-252, 1984.

DURRANT, L. R.; DE MELLO, A. B. Screening of white-rot fungi for enzymes involved in lignin biodegradation. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 2., Campinas. [**Anais ...**]. Campinas: [s. n.], 1992. v. 3, p. 385-393.

DURRENS, P. The phenoloxidasas of the Ascomycete *Podospora anserina*: the three forms of the major laccase activity. **Archives of microbiology**, Berlin, v. 130, p. 121-124, 1981.

EATON, D.; CHANG, H.M.; KIRK, T.K. Fungal decolorization of kraft bleach plant effluents. **Tappi**, Atlanta, v. 63, n. 10, p. 103-106, 1980.

EATON, D.C.; CHANG, H.M.; JOYCE, T.W. et al. Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents. **Tappi**, Atlanta, v. 65, n.6, p.89-92, 1982.

EATON, D.C. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 7, n. 5, p. 194-196, 1985

ENDRES, E. Seleção de fungos lignocelulolíticos para o melhoramento da palha de arroz: efeitos de *Trichoderma viride*, *Pycnoporus sanguineus* e *Rhizopus stolonifer* na degradação da parede celular. Porto Alegre, 1995. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Microbiologia Agrícola e Ambiental)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

EVANS, C.S. Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor* in vivo and in vitro studies. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 27, p. 339-343, 1985.

EVANS, C. S.; FARMER, J. Y.; PALMER, J.M. An extracellular haem-protein from *Coriolus versicolor*. **Phytochemistry**, New York, v. 23, p. 1247-1250, 1984.

- FÄHRAEUS, G.; LJUNGGREN, H. monophenolase and polyphenolase activity of fungal laccase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 54, p. 192-194, 1961.
- FÄHRAEUS, G.; REINHAMMAR, B. Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 21, p. 2367-2378, 1967.
- FÄHRAEUS, G.; TULLANDER, V.; LJUNGGREN, H. Production of high laccase yields in cultures of fungi. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 11, p. 631-643, 1958.
- FAISON, B.D.; KIRK, T.K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 2, p. 299-304, 1985.
- FROEHNER, S. C.; ERIKSSON, K.E. Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 120, p. 450-457, 1974.
- FROEHNER, S. C.; ERIKSSON, K.E. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 120, p. 459-465, 1974.
- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.-M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 58, p. 1672-1681, 1994.
- GIGI, O; MARBACH, I.; MAYER, A.M. Induction of laccase formation in *Botrytis*. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 2273-2275, 1980.
- GIGI, O; MARBACH, I.; MAYER, A.M. Properties of gallic acid-induced extracellular laccase of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, New York, v. 20, n. 6, p. 1211-1213, 1981.
- GLEN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

- GOSZCZYNSKI, S.; PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B. et al. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, n. 5, p. 1339-1347, 1994.
- GROTEWOLD, E.; TACCIOLI, G. E.; AISEMBERG, G. O. et al. A single-step purification of an extracellular fungal laccase. **MIRCEN Journal**, Oxford, v. 4, p. 357-363, 1988.
- HAMMEL, K.E. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 11, p. 776-777, 1989.
- HARKIN, J. M.; OBST, J. R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia**, Basel, v. 29, p. 381-387, 1973.
- HATAKKA, A.I.; LUNDELL, T.K.; TERVILÄ-WILO, A.L.M. et al. Metabolism of non-phenolic β -O-4 lignin model compounds by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 270-277, 1991.
- HIGUCHI, T. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 30, p. 1-8, 1993.
- HOFF, T.; LIU, S.-Y.; BOLLAG, J.-M. Transformation of halogen-, alkyl-, and alkoxy- substituted anilines by a laccase of *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 5, p. 1040-1045, 1985.
- ISHIHARA, T. The role of laccase in lignin biodegradation. In: KENT KIRK, T.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.M. (Ed.). **Lignin Biodegradation: Microbiology, chemistry and Potential Applications**. 2 ed. Boca Raton, Florida: C.R.C. Press, 1981. V. II.
- JOYCE, T.W.; CHANG, H.M.; CAMPBELL Jr., A.G. et al. A continuous biological process to decolorize bleach plant effluents. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 2, p. 301-308, 1984.

- KERRIGAN, R. W.; ROSS, I.K. Extracellular laccases: biochemical markers for *Agaricus* systematics. *Mycologia*, New York, v. 80, n. 5, p. 689-695, 1988.
- KENT KIRK, T.; CONNORS, W.J.; ZEIKUS, J.G. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 32, n.1, p. 192-194, 1976.
- KENT KIRK, T.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.
- KEREM , Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental Microbiology*, Washington, v. 58, n. 4, p. 1121-1127, 1992.
- KIRBY, N.; Mc MULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolourisation of na artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, Kew, v. 17, n. 7, p. 761-764, 1995.
- KIRKPATRICK, N.; REID, I. D.; ZIOMEK, E. et al. Biological bleaching of hardwood Kraft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 33, p. 105-108, 1990.
- KIRKPATRICK, N.; REID, I. D.; ZIOMEK, E. et al. Relationship between fungal biomass production and the brightening of hardwood kraft pulp by *Coriolus versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 55, n. 5, p. 1147-1152, 1989.
- KLIBANOV, A.M.; ALBERTI, B.N.; MORRIS, E.D. et al. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *Journal of Applied Biochemistry*, Washington, v. 2, p. 414-421, 1980.
- KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v. 151, n. 3, p. 1338-1345, 1982.
- LAMAR, R. T.; DAVIS, M. W.; DIETRICH, D. M. et al. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-

- contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 1603-1611, 1994.
- LANGENBACH, T. Biodegradação de xenobiontes: potencialidades e limites. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., (Ed.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 217-236.
- LAWRENCE, F.R.; MARSHALL, W.J. Aniline. **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**, Weinheim, VCH, 1994, v. A 2, p. 303-312.
- LEACH, J.M.; MUELLER, J.C.; WALDEN, C.C. Biological detoxification of pulpmill effluents. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 13, n. 1, p. 18-21, 1978.
- LEONOWICZ, A.; BOLLAG, J. M. Laccases in soil and the feasibility of their extraction. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 237-242, 1987.
- LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, Washington, v. 3, n. 1, p. 55-58, 1981.
- LEONOWICZ, A.; EDGEHILL, R.U.; BOLLAG, J.M. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 137, p. 89-96, 1984.
- LEONOWICZ, A.; TROJANOWSKI, J. Induction of laccase by ferulic acid in basidiomycetes. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 22, p. 291-295, 1975.
- LEONOWICZ, A.; TROJANOWSKI, J.; ORLICZ, B. Induction of laccase in basidiomycetes: apparent activity of the inducible and constitutive forms of the enzyme with phenolic substrates. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 25, p. 369-378, 1978.
- LINDEBERG, G.; FÄHARAEUS, G. Nature and formation of phenol oxidases in *Polyporus zonatus* and *P. versicolor*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 5, p. 277-283, 1952.

- LIU, S.Y.; MINARD, R.D.; BOLLAG, J.M. Coupling reactions of 2,4-dichlorophenol with various anilines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 29, p. 253-257, 1981.
- LONERGAN, G.; BAKER, W. L. Comparative study of substrates of fungal laccase. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 21, p. 31-33, 1995.
- LONERGAN, G. T.; JONES, C. L.; MAINWARING, D. E. The effect of temperature and culture medium on the degradative activity of *Phanerochaete chrysosporium* evaluated using three qualitative screening methods. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 31, p. 107-114, 1993.
- MASAPHY, S.; LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 828-832, 1992.
- MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 18, p. 193-215, 1979.
- MENDEZ, M.H.M.; DERIVI, S.C.N.; RODRIGUES, M.C.R. et al. **Tabela de composição de alimentos**. Niteroi: Ed. da Universidade Federal Fluminense, 1992. 40 p.
- MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 187, p. 341-352, 1990.
- MICHEL JR., F.C.; BALACHANDRA DASS, S.; GRULKE, E.A. et al. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2368-2375, 1991.
- MILLER, J. N.; NIESSNER, R. Enzyme and immunoassays. In: ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY, Weinheim: VCH, 1994. v. B 5, p. 129-136.
- MILSTEIN, O.; VERED, Y.; GRESSEL, J. et al. Biodegradation of wheat straw lignocarbhydrate complexes (LCC). II. Fungal growth on aqueous hydrolysate liquors and particulate residues of wheat

- straw. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 13, p. 117-127, 1981.
- MOSBACH, R. Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 73, p. 204-212, 1963.
- NEILSON, A.H.; ALLARD, A.-S.; HYNNING, P.-A. et al. distribution, fate and persistence of organochlorine compounds formed during production of bleached pulp. **Toxicological and Environmental Chemistry**, Berkshire, v. 30, p. 3-41, 1991.
- OLLIKKA, P.; ALHONMÄKI, K; LEPPÄNEN, V.M. et al. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4010-4016, 1993.
- ORTEGA, G. M.; MARTINEZ, E. O.; GONZÁLEZ, P. C. et al. Enzyme activities and substrate degradation during white-rot fungi growth on sugar-cane straw in a solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, p. 210-212, 1993.
- PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuffs: Part II- Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. **Chemosphere**, Oxford, v. 15, n.4, p. 479-491, 1986.
- PAICE, M.G.; JURASEK, L. Peroxidase-catalyzed color removal from bleach plant effluent. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, p. 477-480, 1984.
- PAICE, M. G.; REID, I. D.; BOURBONNAIS, R. et al. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 260-265, 1993.
- PAL, M.; CALVO, A. M.; TERRÓN, M. C. et al. Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 541-545, 1995.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L. et al. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic

- fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 39, p. 632-636, 1993.
- PARKER, R. E. **Introductory statistics for biology**. 2 ed. Southampton: E. Arnold, 1979. 122 p.
- PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, A.; COSZCZYNSKI, S. et al. Influence of aromatic substitution patterns of azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 11, p. 1992.
- PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R.L. Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. **Biochemical and biophysical Research communications**, San Diego, v. 178, n. 3, p. 1056-1063, 1991.
- PASZCZYNSKI, A.; PASTI, M.B.; GOSZCZYNSKI, S. et al. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 13, p. 378-384, 1991.
- PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKI, S. et al. Mineralization of sulfonated azodyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**, São Paulo: McGraw Hill, 1980. v. 1, p. 315 - 341.
- PEYTON, T.O. Biological disposal of hazardous waste. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 6, p. 146-154, 1984.
- PETROSKI, R.J.; PECZYNSKA-CZUCH, W.; ROSAZZA, J.P. Analysis, production and isolation of an extracellular laccase from *Polyporus anceps*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n. 6, p. 1003-1006, 1980.
- PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Londres: Blackwell Scientific, 1975. Cap. 23: Growth of microbial colonies on the surface of solid medium.

- PITTER, P.; CHUDOBA, J. **Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 217-231, 249-250.
- REDDY, C.A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Current Opinion in biotechnology or Environmental biotechnology**, Philadelphia, v. 6, p. 320-328, 1995.
- REID, I. D. Solid-state fermentations for biological delignification. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 11, p. 786-803, 1989.
- ROBYT, J.F.; WHITE, B.J. **Biochemical Techniques: Theory and Practice**. Monterey, Ca.: Brooks Cole, 1987. 407 p.
- ROLZ, C.; DE LEON, R.; ARRIOLA, M.C. et al. Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, n. 4, p. 607-611, 1986.
- ROLZ, C.; de LEON, R.; ARRIOLA, M.C. et al. White-rot fungal growth on sugarcane lignocellulose residue. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 25, p. 535-541, 1987.
- ROLZ, C.; de LEON, R.; ARRIOLA, M.C. Solid substrate growth of white rot fungi on coffee pulp. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 8, p. 211-223, 1988.
- ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. et al. Kinetics and rations of carboxy-methyl cellulase and filter paper activities of the cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* on different substrates in solid state fermentation. **Micologia Neotropical Aplicada**, Xalapa, Mex., v. 4, p. 19-40, 1991.
- ROYER, G.; LIVERNOCHE, D.; DESROCHERS, M. et al. Decolorization of kraft mill effluent: kinetics of a continuous process using immobilized *Coriolus versicolor*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 5, p. 321-326, 1983.
- ROYER, G.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L. et al. Batch and continuous decolorisation of bleached kraft effluents by a white-rot fungus. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 35B, p. 14-22, 1985.

- RUGGIERO, P.; SARKAR, J. M.; BOLLAG, J.M. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay. **Soil Science**, New York, v. 147, n. 5, p. 361-370, 1989.
- SALGUES, M.; CHEYNIER, V.; GUNATA, Z. et al. Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n.5, p. 1191-1194, 1986.
- SANDHU, D. K.; ARORA, D. S. Laccase production by *Polyporus sanguineus* under different nutritional and environmental conditions. **Experientia**, Basel, v. 41, p. 355-356, 1985.
- SEAL, K.J.; MORTON, L.H.G. Biodeterioration Biotechnology. In: RATLEDGE, C. (Ed.) **Microbial technology in The Developing World**. New York: Oxford Science, 1987. 444 p.
- SELIN, J.F.; SUNDMAN, V.; RÄIHÄ, M. Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 103, p. 63-70, 1975.
- SHANNON, M.J.R.; BARTHA, R. Immobilization of leachable toxic soil pollutants by using oxidative enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1719-1723, 1988.
- SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R. et al. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, Oxford, v. 22, n. 1-2, p. 107-119, 1991.
- SHUTTLEWORTH, K. L.; BOLLAG, J.M. Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. **Enzyme and Microbial technology**, Surrey, v. 8, p. 171-177, 1986.
- SILVEIRA, R. M .B.; GUERRERO, R. T. *Aphylllophorales* poliporóides (Basidiomycetes) do Parque Nacional de Aparados da Serra, Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Biociências**, Porto Alegre, n. 48, 1991.
- SJOBLAD, R. D.; BOLLAG, J.-M. Oxidative coupling of aromatic pesticide intermediates by a fungal phenol

- oxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, n. 4, p. 906-910, 1977.
- SLOMCZYNSKI, D.; NAKAS, J.P.; TANENBAUM, S.W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 907-912, 1995.
- SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n.8, p. 2397-2401, 1992.
- SPADARO, J. T.; ISABELLE, L.; RENGANATHAN, V. Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 28, p. 1389-1393, 1994.
- SRINAVASAN, C.; D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K. et al. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n.12, p. 4274-4277, 1995.
- STEVENSON, G. B. **Biologia dos Fungos, Bactérias e Virus**. São Paulo: Polígono, 1974. Cap. 9: Basidiomycetes.
- STEVENSON, J. F. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: J. Wiley, 1982 Cap. 8: Biochemistry of the formation of humic substances.
- SUNDMAN, G.; KENT KIRK, T.; CHANG, H.M. Fungal decolorization of kraft bleach plant effluent. **Tappi**, Atlanta, v. 64, n.9, p. 145-148, 1981.
- SUSIN, V. L. N. **Biologia de Aphylophorales Xilófilas (Basidiomycetes)**. Porto Alegre, 1987. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.
- SUTHERLAND, J. B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 9, p. 53-62, 1992.
- SZKLARZ, G.; LEONOWICZ, A. Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivatives. **Phytochemistry**, New York, v. 25, p. 2537-2539, 1986.

- SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.
- THAKKER, G. D.; EVANS, C. S.; KOTESWARA RAO, K. Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 37, p. 321-323, 1992.
- THIEMANN, J. E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referência às celulasas. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE DE BIOMASSAS, 2., Maringá, 1985. *Anais ...Maringá: Universidade de Maringá*, 1985. 2 v. p. 107-131.
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, Washington, v. 140, p. 19-26, 1994.
- WARDLE, D. A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., (ed.) *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 195-216.
- WEBER, E.J.; ADAMS, R.L. Chemical-and sediment-mediated reduction of the azo dye Disperse Blue 79. *Environmental science Technology*, Washington, v. 29, n. 5, p. 1163-1170, 1995.
- WOOD, D.A. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology*, Reading, v. 117, p. 327-338, 1980.
- YESILADA, O. Short communication: decolourization of crystal violet by fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 11, p. 601-602, 1995.
- ZABEL, R. A.; MORREL, J.J. *Wood microbiology: decay and its prevention*. San Francisco: Academic, 1992. Cap. 8: Chemical changes in wood caused by decay fungi.
- ZADRAZIL, F. Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. *Angew Botanik*, Berlin, v. 59, p. 433-452, 1985.

7. APÊNDICES

APÊNDICE I. Abreviaturas utilizadas no texto

Estirpes de Basidiomycetes

Códigos	Estirpes ¹
<i>P. sanguineus</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i> , estirpe 20 - ICN
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i> , estirpe 74 - ICN

Meios de cultura líquidos e soluções

Códigos	Meios de cultura ¹
Caldo EM	Caldo extrato de malte
Caldo EMG	Caldo extrato de malte + 100 mg L ⁻¹ de glicose
Caldo BH	caldo mineral Bushnell-Haas
Caldo BHG	caldo Bushnell-Haas + 100 mg L ⁻¹ de glicose
SYR-E	solução 1 mM de siringaldazina em etanol
SYR-M	solução 1 mM de siringaldazina em metanol
TAMPÃO	solução tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,1

Meios de cultura sólidos

Códigos	Meios de cultura ¹
ágar BD	ágar batata dextrose
ágar BDT	ágar batata dextrose com 0,5% de ácido tânico
ágar EM	ágar extrato de malte
ágar FT	ágar batata dextrose com 6,0% farelo de trigo
V. Congo	solução 25 mg L ⁻¹ de vermelho congo + 2% ágar
V Malaquita	solução 25 mg L ⁻¹ de verde malaquita + 2% ágar
V.Cristal	solução 25 mg L ⁻¹ de violeta cristal + 2% ágar
A metileno	solução 25 mg L ⁻¹ de azul metileno + 2% ágar

APÊNDICE II. Ágar batata dextrose (ágar BD)

Ingredientes	Concentração (g.L ⁻¹)
ágar batata dextrose	39,0 g
água destilada	1000 mL

Após aquecimento para dissolução do meio desidratado, o pH foi ajustado para o valor desejado com acréscimo de 0,2 unidades e autoclavado por 15 minutos a 105 kPa (121°C). O meio ágar batata dextrose utilizado é da marca Merck, artigo 10130.

Ágar extrato de malte (ágar EM)

Ingredientes	Concentração (g. L ⁻¹)
extrato de malte	30,0 g
peptona	5,0 g
ágar	15,0 g
água destilada	1000 mL

Após aquecimento para dissolução dos ingredientes, o pH foi ajustado para o valor desejado com acréscimo de 0,2 unidades e autoclavado por 15 minutos a 105 kPa (121°C). O extrato de malte utilizado é da marca Merck, artigo 5391, a peptona Oxoid, código L37, e o ágar Merck, artigo 1614.

APÊNDICE III. Ágar batata dextrose com ácido tânico
(ágar BDT)

Ingredientes	Concentração (g L ⁻¹)
ágar batata dextrose	39,0 g
ácido tânico	5,0 g
água destilada	1000 mL

Após a mistura dos ingredientes e ajuste do pH no valor desejado com acréscimo de 0,2 unidades, autoclavar por 15 minutos a 105 kPa (121°C).

Ágar farelo de trigo (ágar FT)

Ingredientes	Concentração (g L ⁻¹)
farelo de trigo	60,0 g
ágar	20,0 g
água destilada	1000 mL

Adicionar água ao farelo de trigo e aquecer durante 5 minutos em forno de microondas na potência máxima, esfriar, ajustar o pH no valor desejado acrescido de 0,2 unidades. adicionar o ágar e autoclavar por 15 minutos a 105 kPa (121°C).

APÊNDICE IV. Caldo de extrato de malte (caldo EM).

Ingredientes	Concentração (g. L ⁻¹)
extrato de malte	30,0 g
peptona	5,0 g
água destilada	1000 mL

Após aquecimento para dissolução dos ingredientes, o pH foi ajustado para o valor desejado com acréscimo de 0,2 unidades e autoclavado por 15 minutos a 105 kPa (121°C).

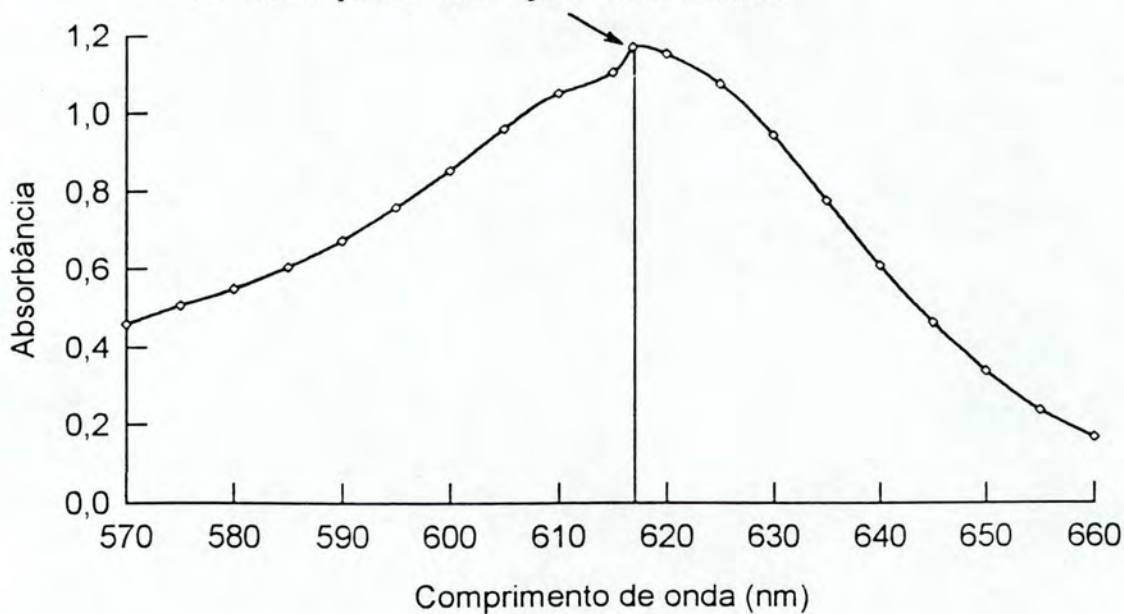
Caldo mineral de Bushnell e Haas (caldo BH)

Ingredientes	Concentração (g.L ⁻¹)
sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,20 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,02 g
Fosfato dibásico de Potássio (KH ₂ PO ₄)	1,00 g
Fosfato monobásico de Potássio (K ₂ HPO ₄)	1,00 g
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	1,00 g
Cloreto férrico heptahidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,05 g

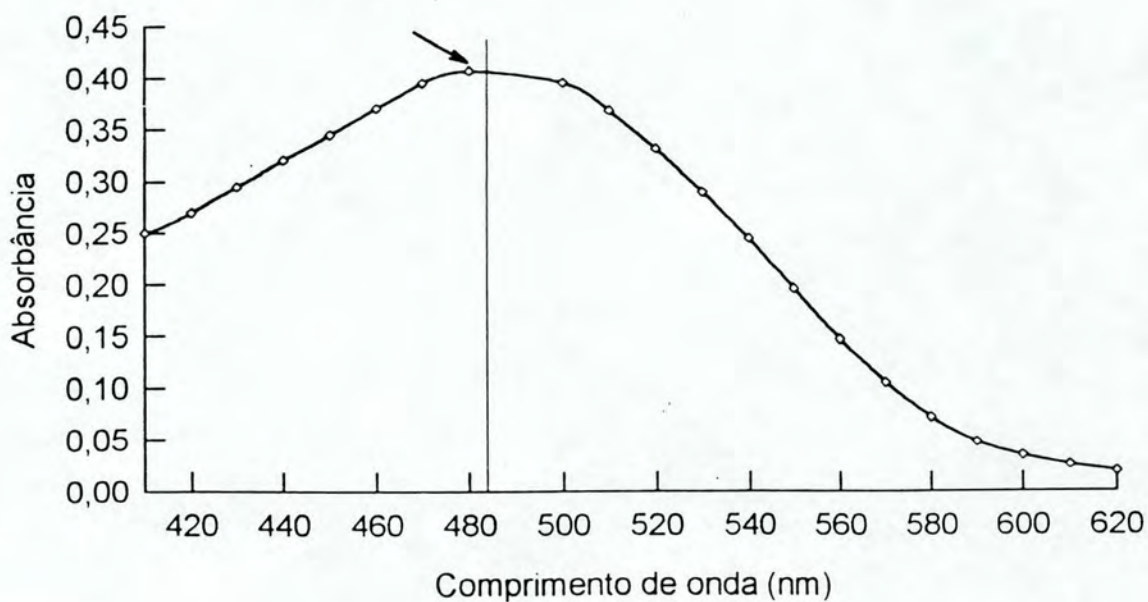
Após dissolução dos ingredientes, o pH foi ajustado no valor desejado acrescido de 0,2 unidades e autoclavado por 15 minutos a 105 kPa (121°C).

APÊNDICE V

Espectro de varredura de uma solução 25 mg L^{-1} de v. malaquita em água destilada.



Espectro de varredura de uma solução 25 mg L^{-1} de v. congo em água destilada.



APÊNDICE VI. Soluções 1 mM de siringaldazina em etanol e metanol (soluções SYR-E e SYR-M)

Composição solução SYR-E

Ingredientes	Concentração (g. L-1)
siringaldazina	360,4 mg
etanol p.a.	1000 mL

Composição solução SYR-M

Ingredientes	Concentração (g. L-1)
siringaldazina	360,4 mg
metanol p.a.	1000 mL

Conservar ambas as soluções a + 4°C, em frasco âmbar.

Solução tampão citrato fosfato 1 M, pH 5,0 ± 0,1.

Misturar dois volumes de solução 1 M de fosfato monobásico de potássio (K_2HPO_4) com um volume de solução 1 M de ácido cítrico (192 g de $C_6H_8O_7$ ou 210 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ por litro) e ajustar o pH com qualquer uma das soluções componentes.

AOAC, 15ª Edição, 1995.

APÊNDICE VII. Origem e denominações das estirpes de Basidiomycetes utilizados na pesquisa.

Pycnoporus sanguineus (L. ex Fr.) Murr.

Boletus sanguineus L., **Sp. Plant.**, 2nd. ed., p. 1646. 1763.

Polyporus sanguineus L. ex Fr., **Syst. Mycol.** 1: 371. 1821.

Pycnoporus sanguineus (L. ex Fr.) Murr., **Bull. Torrey Bot. Club**, 31: 421. 1904.

Trametes versicolor (L. ex Fr.) Pilát

Boletus versicolor L., **Sp. Plant.**, p. 1176. 1753.

Polyporus versicolor L. ex fr., **Syst. Mycol.** 1: 368. 1821.

Coriolus versicolor (L. ex Fr.) Quéll., **Ench. Fung.**, p. 175. 1886.

Silveira e Guerrero (1991).

Apêndice 10. Fórmulas para cálculo da atividade da enzima lacase em unidades enzimáticas/3 mL.

Unidades enzimáticas/3 mL = Δ Abs. x 1.000

Δ Abs. = Absorbância final - Absorbância inicial,
medida em 525 nm, no
intervalo de 1 minuto.

APÊNDICE VIII. Fórmulas para o cálculo da dispersão dos valores dos resultados obtidos com num intervalo de confiança de 95 %.

\bar{x} = média dos valores

s = desvio padrão

n = número de repetições

E = erro padrão da média $E = s / \sqrt{n}$

Intervalo de confiança 95 %

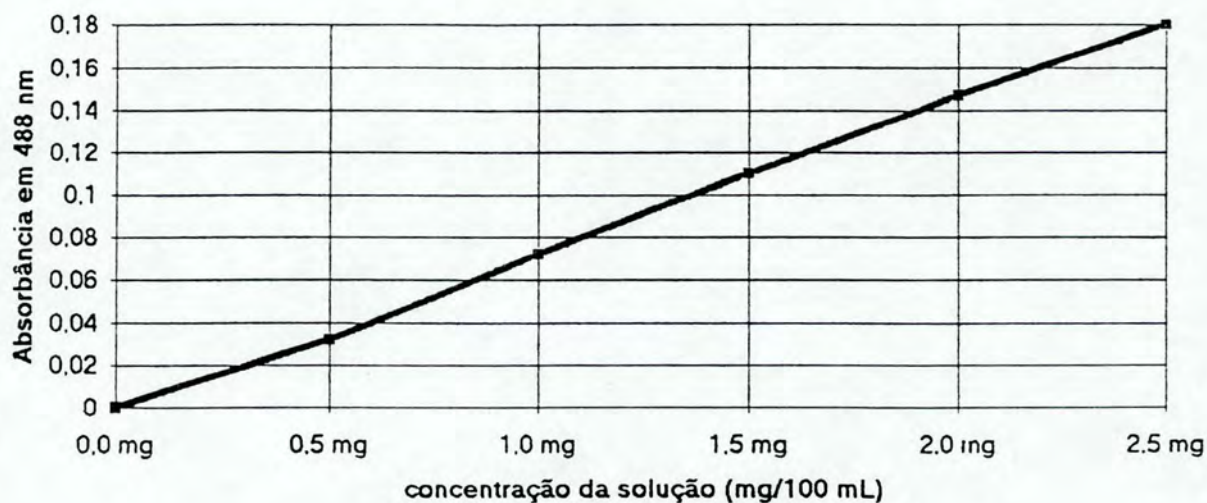
$\bar{x} \pm t_{0,05} \cdot E$

Coefficiente de variação

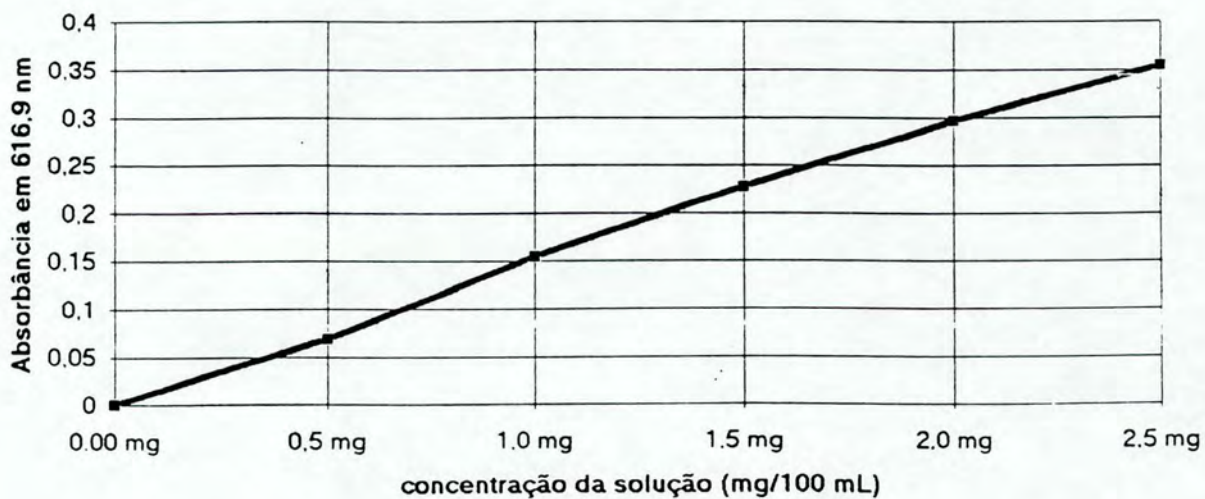
$cv = s/\bar{x} \cdot 100$

APÊNDICE IX: Curvas-padrão da absorbância das soluções do v. congo medida em 488nm e do v. malaquita, medida em 617nm. Foram realizadas 3 leituras, obtendo-se um c. v. $\leq 8,5\%$ no v. congo e c. v. $\leq 8,1\%$ para o v. malaquita.

Vermelho congo



Verde malaquita



Apêndice X: Análise de variância dos valores da concentração do vermelho congo nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* em função do pH, meio de cultura e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
PH	1	0,52873E-02	0,52873E-02	18,853	0,0000
Meio	1	0,21252E-01	0,21252E-01	75,781	0,0000
Período	5	0,13206	0,26412E-01	94,182	0,0000
PH*meio	1	0,22333E-02	0,22333E-02	7,964	0,0064
Resíduo	63	0,17668E-01	0,28044E-03		
TOTAL	71	0,178500			

Média geral = 0,072292 Coeficiente de variação = 23,17%

Apêndice XI: Análise de variância dos valores da concentração do vermelho congo nas soluções inoculadas com *T. versicolor* em função do pH, meio de cultura e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
PH	1	0,9893E-02	0,9893E-02	74,477	0,0000
Meio	1	0,6722E-03	0,6722E-03	5,060	0,0287
Período	5	0,18880	0,3776E-01	284,259	0,0000
PH * meio	1	0,7220E-03	0,7220E-03	5,435	0,0236
PH * período	5	0,4152E-03	0,8305E-04	0,625	*****
Meio*período	5	0,8522E-03	0,1704E-03	1,283	0,2850
Resíduo	53	0,7040E-02	0,1328E-03		
TOTAL	71	0,384746			

Média geral = 0,059000 Coeficiente de variação = 19,53%

Apêndice XII: Análise de variância dos valores da concentração do verde malaquita nas soluções inoculadas com *P. sanguineus* em função do pH, meio de cultura e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
PH	1	0,2838	0,2838	296,315	0,0000
Meio	1	0,1425E-01	0,1425E-01	14,877	0,0003
Período	5	0,5064E-01	0,1012E-01	10,573	0,0000
PH*meio	1	0,3240E-02	0,3240E-02	3,382	0,0706
resíduo	63	0,6035E-01	0,9580E-03		
TOTAL	71	0,41228			

Média geral = 0,232764 Coeficiente de variação = 13,30%

Apêndice XIII: Análise de variância dos valores da concentração do verde malaquita nas soluções inoculadas com *T. versicolor* em função do pH, meio de cultura e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
PH	1	0,18798	0,18798	51,659	0,0000
Meio	1	0,5016E-02	0,5016E-02	1,379	0,2456
Período	5	0,41300	0,8260E-01	22,699	0,0000
PH*meio	1	0,1739E-01	0,1739E-01	4,779	0,0332
PH*período	5	0,9564E-02	0,1912E-02	0,526	*****
Meio*período	5	0,2544E-02	0,5088E-03	0,140	*****
resíduo	53	0,19286	0,36389		
TOTAL	71	0,873498			

Média geral = 0,127486 Coeficiente de variação = 47,32%

Apêndice XIV: Análise de variância dos valores do pH das soluções em função dos fungos, corantes e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Fungo	1	0,248645	0,248645	18,702	0,0124
Corante	1	0,218405	0,218405	16,428	0,0154
Período	4	1,146220	0,286555	21,554	0,0057
Fungo*corante	1	0,47045E-01	0,47045E-01	3,539	0,1331
Fungo*período	4	0,1591800	0,39795E-01	2,993	0,1567
Corante*perío	4	0,50420E-01	0,12605E-01	0,948	*****
Resíduo	4	0,53180E-01	0,13295E-01		
TOTAL	19	1,923095			

Média geral = 6,2005

Coefficiente de variação = 1,86%

Apêndice XV: Análise de variância dos valores do pH das soluções com pH 5,0 em função dos fungos, meios de cultura, corantes e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Fungo	1	0,267008	0,267008	5,098	0,0301
Corante	1	0,99008E-01	0,99008E-01	1,890	0,1777
Período	5	3,506025	0,7012050	13,387	0,0000
Meio	1	6,264075	6,264075	119,59	0,0000
Fungo*corante	1	0,40333E-02	0,40333E-02	0,077	*****
Fungo*meio	1	0,10800E-01	0,10800E-01	0,206	*****
Meio*Corante	1	0,1323000	0,1323000	2,526	0,1207
Resíduo	36	1,885650	0,52379E-01		
TOTAL	47	12,168899			

Média geral = 4,8725

Coefficiente de variação = 4,70%

Apêndice XVI: Análise de variância dos valores do pH das soluções com pH 6,0 em função dos fungos, meio de cultura, corantes e período de incubação.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.>F
Fungo	1	2,253333	2,253333	28,172	0,0000
Corante	1	0,163333E-02	0,163333E-02	0,020	*****
Período	5	4,006717	0,8013433	10,019	0,0000
Meio	1	7,145633	7,145633	89,337	0,0000
Fungo*corante	1	0,408333E-03	0,408333E-03	0,005	*****
Fungo*meio	1	1,353408	1,353408	16,921	0,0002
Meio*Corante	1	0,1474083	0,1474083	1,843	0,1831
Resíduo	36	2,879450	0,79984E-01		
TOTAL	47	17,787990			

Média geral = 5,590417 Coeficiente de variação = 5,06%

8. VITA

Pascual Isoldi Pinkoski, filho de Arnaldo Braga Pinkoski e Nahir Isoldi Pinkoski, nasceu em 28 de agosto de 1947 em Rio Grande, RS.

Estudou no Colégio São Francisco em Rio Grande, onde completou o curso primário. O ginásial e científico foram realizados no Colégio Júlio de Castilhos em Porto Alegre em 1966. Em 1967 ingressou no curso de engenharia química da UFRGS, concluindo o mesmo em 1971.

Foi bolsista do CNPq no período de 1970-71 no ICTA-UFRGS. Em 1972 ingressou na Fundação de Ciência e Tecnologia e em 1974 prestou concurso para Professor Auxiliar de Ensino na UFRGS, onde hoje é Professor Adjunto 3.

Na Fundação de Ciência e Tecnologia foi coordenador de laboratórios, coordenador de núcleos, coordenador de projetos e gerente de Departamento.

Ingressou no curso de Doutorado em Ciência do Solo, área de Microbiologia do Solo, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em março de 1993.