

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

**Uso de basidiomicetos comestíveis - *Pleurotus* spp.
para descoloração/degradação de corantes têxteis**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

Marcia Regina T. de Camargo Ranzani

Mestre em Ciências

Dra. Lúcia R. Durrant

Orientadora

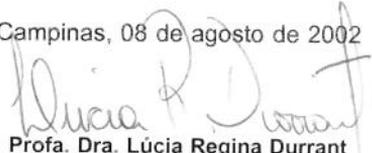
Campinas - SP

2002

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Márcia Regina Toledo de Camargo Ranzani**, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de agosto de 2002.

Campinas, 08 de agosto de 2002


Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

i

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R178u
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51095
PROC 16-837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/09/02
Nº CPD _____

CM00174454-0

BIB ID 259934

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R178u Ranzani, Marcia Regina Toledo de Camargo
Uso de basidiomicetos comestíveis – *Pleurotus* spp. para
descoloração/degradação de corantes têxteis / Marcia Regina
Toledo de Camargo Ranzani. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lodo. 2.Corantes. 3.*Pleurotus* spp. I.Durrant, Lúcia
Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Lúcia Regina Durrant
membro
Orientadora – FEA/UNICAMP



Dra. Doralice S. L. Balan
membro
FATEC/Americana



Dra. Marina Capelari
membro
IB/São Paulo



Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
membro
CPQBA/UNICAMP



Dra. Regina T. Rossin Monteiro
membro
CENA/USP

Dra. Maria da Graça S. Andrietta
membro suplente
CPQBA/UNICAMP

Dra. Telma Teixeira Franco
membro suplente
Engenharia Química/UNICAMP

810912002

Aos meus pais,
Rodolpho de Camargo (*in memorium*) e
Odélia Galvão Toledo de Camargo (Déa),
por tudo, pela minha vida e por todo o amor.

Dedico

Às minhas filhas,
Fábia e Rafaela e ao meu esposo Adriano,
Meus maiores amores,
Pelo carinho, compreensão e companheirismo

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Lúcia R. Durrant, pela orientação sempre presente, pela confiança, dedicação, amizade, paciência e ensinamentos.

À Professora Dra. Regina T. R. Monteiro pela amizade, incentivos e a valorosa contribuição na elaboração e execução deste trabalho.

À Dra. Doralice S. L. Balan pela contribuição e apoio na elaboração deste trabalho, ajudando na aquisição do material utilizado nesta pesquisa junto à Indústria Têxtil.

Aos Professores Dr. Waldemar L. Tornisiello e Dra. Regina T. R. Monteiro, dos Laboratórios de Ecotoxicologia e Microbiologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Campus de Piracicaba-SP, pela liberação das instalações onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro indispensável à realização desta pesquisa.

À Dra. Marina Capelari do Instituto de Botânica de São Paulo e ao Dr. Augusto da Eira da UNESP/Botucatu, pelo fornecimento das espécies/linhagens de *Pleurotus* utilizadas.

À Dra. Silvia M. G. Molina do departamento de Genética da ESALQ/USP, Campus de Piracicaba, pela orientação e revisão da análise estatística.

Às Dras. Maria Elisa E. de Paula Garavello e Gilma L. Sturion, do Projeto “Aproveitamento de Resíduos da Agroindústria da Banana da Região do Vale do Ribeira”, pelo fornecimento dos materiais lignocelulósicos.

Aos funcionários Rosângela Aparecida Degaspari e Carlos Alberto Dorelli, pela ajuda no ensaio de biodegradabilidade imediata.

Aos colegas Hélio Mitoshi Kamida, Eduardo Armas, Daniela Franco Carvalho Jacobucci, Andréa Roberta Clemente e Ana Maria Brockelmann, pela amizade e colaboração e, ao acadêmico Carlos Eduardo T. Petri, pelo auxílio no preparo de materiais.

À toda minha família, em especial ao Prof. Dr. Guido Ranzani e Mirna Lia T. de Camargo Corazza, pelo apoio incondicional.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
Resumo	xix
Summary	xxi
ÍNDICE	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Degradação de xenobióticos	4
3.2. A indústria têxtil e seus efluentes	8
3.3. O processo de biodegradação da lignina e de corantes	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Material	43
4.1.1. Espécies/linhagens de fungos	43
4.1.2. Corantes têxteis	44
4.1.3. Meios de cultura	44
4.1.4. Ensaio de biodegradabilidade	47
4.1.5. Degradação do lodo – resíduo acrescido de materiais lignocelulósicos	48
4.2. Métodos	49
4.2.1. Manutenção das culturas e preparo do inóculo	49
4.2.2. Seleção em meio sólido	50
4.2.3. Seleção em meio líquido	52
4.2.4. Determinação do potencial hidrogeniônico	55

4.2.5. Determinação do peso seco do micélio	55
4.2.6. Determinação da absorvância por espectrofotometria	55
4.2.7. Análise Estatística dos dados obtidos em meio líquido	56
4.2.8. Biodegradabilidade imediata em sistema aberto	56
4.2.9. Análise do carbono dos corantes testados e carbono e nitrogênio no substrato sólido contendo lodo	56
4.2.10. Avaliação em meio líquido e sólido quanto à produção de enzimas ligninolíticas	59
4.2.11. Análise dos corantes por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	61
4.2.12. Avaliação do percentual de descoloração por <i>Pleurotus</i> spp. em solução nutriente estéril e não estéril, empregado no estudo de biodegradabilidade imediata	61
4.2.13. Pré-teste com lodo acrescido de bagaço de cana de açúcar	62
4.2.14. Degradação do substrato – resíduo sólido – lodo acrescido de materiais lignocelulósicos	63
4.2.15. Avaliação da mutagenicidade – teste de Ames	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1. Seleção com o corante RBBR	72
5.2. Seleção com o corante índigo em meio de cultura sólido	79
5.3. Seleção com o corante preto enxofre em meio de cultura sólido	85
5.4. Discussão sobre descoloração dos corantes testados	91
5.5. Seleção em meio sólido contendo lodo	95
5.6. Avaliação do desenvolvimento do micélio, no lodo mais bagaço de cana colonizado por <i>P. sajor-caju</i> – PSC 94/03	101
5.7. Seleção do meio de cultura para realização do ensaio em meio líquido	101
5.8. Seleção das espécies/linhagens de <i>Pleurotus</i> capazes de descolorir os corantes índigo e preto enxofre em meio mínimo	102
5.9. Avaliação do crescimento e produção de enzimas ligninolíticas das espécie/linhagem CCB 394 em meio líquido com diferentes concentrações de nitrogênio, na presença dos corantes índigo e preto enxofre	111

5.10. Teste de biodegradabilidade imediata em sistema aberto	116
5.11. Avaliação dos resultados de biodegradabilidade imediata em cultivo. estático empregando-se meio estéril e não esterilizado	118
5.12. Degradação do substrato – lodo (resíduo sólido) acrescido de resíduos lignocelulósicos	121
5.13. Avaliação da mutagenicidade dos substratos colonizados pelas linhagens de <i>P. sajor-caju</i> – CCB 020 e PSC 94/03	137
6. CONCLUSÕES	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
APÊNDICE 1	158
APÊNDICE 2	162
APÊNDICE 3	184

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Taxas de crescimento e de descoloração (cm/dia) do RBBR por <i>Pleurotus</i> spp em meio mínimo.	73
Figura 2. Espécies/linhagens que descoloriram o corante RBBR no período de tempo ensaiado comparadas àquelas que não o fizeram.	77
Figura 3. Taxa de crescimento (cm/dia) de <i>Pleurotus</i> spp em meios de cultura com e sem o corante índigo.	81
Figura 4. Taxa de descoloração (cm/dia) por <i>Pleurotus</i> spp em meio de malte ágar acrescido de bagaço de cana e corante índigo (espécies/linhagens que não descoloriram apenas são citadas).	81
Figura 5. Exemplos de espécies/linhagens de <i>Pleurotus</i> que descoloriram o corante índigo.	83
Figura 6. Taxa de crescimento (cm/dia) de <i>Pleurotus</i> spp em meios de cultura com e sem corante preto enxofre.	87
Figura 7. Taxa de descoloração (cm/dia) por <i>Pleurotus</i> spp em meios de cultura com e sem corante preto enxofre	87
Figura 8. Exemplos de espécies/linhagens de <i>Pleurotus</i> que descoloriram o corante preto enxofre.	89
Figura 9. Percentual de descoloração dos corantes índigo e preto enxofre por <i>Pleurotus</i> spp em diferentes meios de cultura.	93

Figura 10. Taxa de crescimento (cm/dia) (média de duplicatas) de <i>Pleurotus</i> spp. em meio de malte ágar lodo, lodo bagaço de cana ágar e lodo bagaço de cana malte ágar.	97
Figura 11. Exemplos de espécies/linhagens de <i>Pleurotus</i> que descoloriram o lodo.	99
Figura 12. Peso do micélio e percentual de descoloração do corante índigo por <i>Pleurotus</i> spp, em meio líquido.	107
Figura 13. Peso do micélio e percentual de descoloração do corante preto enxofre por <i>Pleurotus</i> spp, em meio líquido.	109
Figura 14. Cultivo estático de CCB 394 em meio mínimo com 2 g de glicose e 6,0 g NaNO ₃ e com 2 g de glicose e 0,6 g Na NO ₃ com corante (CC) e sem corante (SC) - preto enxofre (PE) e índigo (IND.).	113
Figura 15. Percentual de descoloração do corante índigo e peso seco do micélio de <i>Pleurotus</i> spp.	119
Figura 16. Substratos colonizados pelas linhagens de <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 020 e PSC 94/03 e respectivos controles, no final do período de incubação.	125
Figura 17. Atividade de lignina peroxidase nos substratos colonizados pelas linhagens de <i>P. sajor-caju</i> CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação.	129
Figura 18. Atividade de lacase nos substratos colonizados pelas linhagens de <i>P. sajor-caju</i> CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação.	131

Figura 19. Atividade de manganês peroxidase nos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação. 133

Figura 20. Atividade de peroxidase nos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação. 135

LISTA DE TABELAS

	Página
Quadro 1. Linhagens que detectam mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de base.	67
Tabela 1. Potencial hidrogeniônico dos substratos colonizados e dos controles no início e final do período de incubação.	121
Tabela 2. Teor de carbono e nitrogênio e, respectivas relações (C/N), nos substratos e controles no início e no final do período de incubação (28-30 dias).	122
Tabela 3. Resultados analíticos da avaliação da DQO, fenóis, magnésio, fósforo e potássio dos substratos colonizados e controles, no final do período de incubação.	122
Tabela 4. Resultados analíticos da avaliação de açúcares totais, Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA) e umidade, no final do período de incubação.	122
Tabela 5. Percentual de redução dos parâmetros avaliados em relação ao controle.	123
Tabela 6. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra PSC 94/03, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de <i>Salmonella typhimurium</i> , na ausência de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior ou igual a 2,0).	140
Tabela 7. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra PSC 94/03, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de <i>Salmonella typhimurium</i> , na presença de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior ou igual a 2,0).	141

- Tabela 8. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra CCB 020, obtido para cepa TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior que 2). 142
- Tabela 9. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra CCB 020, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na presença de ativador metabólico. (para doses com razão de mutagenicidade maior que 2). 143

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de descoloração/degradação dos corantes índigo e preto enxofre (0,02%, p/v), em suas fórmulas técnicas, por espécies/linhagens de *Pleurotus* nativas e/ou comestíveis, em meio líquido e sólido, e a degradação do lodo residual da indústria têxtil acrescido de resíduos lignocelulósicos.

Uma seleção, com 14 espécies/linhagens de *Pleurotus*, foi realizada em meios líquido e sólido; em meio líquido os corantes foram empregados como única fonte de carbono e, em meio sólido foram empregados na presença e ausência de resíduo lignocelulósico. O corante RBBR também foi utilizado no processo de seleção inicial. Uma espécie/linhagem foi testada em meio líquido esterilizado variando-se a concentração de nitrogênio; sob condições naturais, sem esterilização, o teste de biodegradabilidade imediata foi aplicado empregando-se duas espécies/linhagens como inóculo. Em resíduo lignocelulósico misturado ao lodo (30%, peso úmido), após pasteurização, duas linhagens selecionadas de *P. sajor-caju* - CCB 020 e PSC 94/03, foram estudadas quanto à capacidade de colonização e degradação do substrato; as avaliações feitas a cada 7 dias foram: fenóis, DQO, umidade, fósforo, potássio, magnésio, fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA), açúcares totais, enzimas ligninolíticas e, após 30 dias, o substrato colonizado foi avaliado quanto ao potencial de mutagenicidade.

Os resultados obtidos com o RBBR na seleção das espécies/linhagens ligninolíticas correlacionaram-se com a descoloração observada com os corantes têxteis. Contudo, o processo de descoloração do corante índigo, em meio sólido, só ocorreu na presença do bagaço de cana de açúcar, o que não aconteceu para o corante preto enxofre porque houve descoloração também na ausência do bagaço de cana, dependendo da espécie/linhagem. Seis espécies/linhagens foram pré-selecionadas para testar o lodo, todas apresentaram descoloração total quando malte e bagaço de cana de açúcar estavam presentes. Em meio líquido, todas as espécies/linhagens apresentaram descoloração, entretanto não foi observada correlação entre peso do micélio e percentual de descoloração. Com relação à razão de descoloração, os resultados indicaram que esta se deu devido à adsorção do corante ao micélio. A

espécie/linhagem selecionada para estudo em meio líquido, mudando-se a concentração da fonte de nitrogênio, confirmou que o resultado da descoloração era decorrente de adsorção dos corantes ao micélio. A produção de enzimas ligninolíticas, na presença de ambos corantes, não foi detectada ou foi muito baixa. Não houve diferenças quanto à quantidade de nitrogênio presente no meio para a descoloração. No ensaio de biodegradabilidade imediata, os corantes também foram classificados como não facilmente biodegradáveis. Em resíduo lignocelulósico mais lodo, as linhagens estudadas - PSC 94/03 e CCB 020, mostraram capacidade de colonização e descoloração, expressa pela redução em 42,05% de FDN/FDA e, diminuição da DQO em 52,7%, comparada ao controle bem como com relação à diminuição de 61,4% dos fenóis. Pouca ou nenhuma alteração foi observada no conteúdo de minerais e açúcares totais. Houve produção de lacase, peroxidase e manganês peroxidase, principalmente nos primeiros 14 dias de incubação, sendo mais expressiva para a linhagem CCB 020. Os resultados de mutagenicidade mostraram que o substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03 tornou-se mutagênico.

Nas condições deste estudo, o meio líquido não se mostrou adequado para a expressão das enzimas responsáveis pela descoloração dos corantes têxteis avaliados, contudo a descoloração foi observada por adsorção ao micélio. Uma das espécies/linhagens de *Pleurotus* testada tem potencial para tratamento do lodo misturado a resíduos lignocelulósicos, resultando em novo substrato que poderá ser empregado como fertilizante, na produção de biomassa ou ainda na produção de enzimas como lacases e manganês peroxidases envolvidas no processo de descoloração/degradação de corantes.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the possibility of indigo and sulphur black dyes (0,02%, w/v) to be decolorized/degraded by native or edible or both species/strains of *Pleurotus*, in liquid and solid media, and the degradation of sludge from the textile industry together with lignocelulosic wastes. The screening of 14 species/strains of *Pleurotus* was conducted, in sterile liquid and solid media; in liquid media the dyes were used as the sole source of carbon and, in solid media they were used with and without lignocelulosic wastes. The RBBR dye was also utilized in the first screening. One species/strain was tested in sterilized liquid medium, varying the nitrogen concentration. Under natural conditions, without sterilization, the biodegradability assay was applied using two selected species/strains as inocula. In the lignocelulosic wastes mixed with the sludge (30%, wet weight), after pasteurization, two strains of *P. sajor-caju* - CCB 020 and PSC 94/03, were studied to determine their colonization and degradation capability of the substrate; evaluations made every 7 days were: phenols, COD, humidity, phosphorus, potassium, magnesium, fiber detergent neutral (FDN) and fiber detergent acid (FDA), total sugars, ligninolytic enzymes and, after 30 days, the colonized substrates were evaluated for their mutagenic potential.

The results obtained with the RRBR in the screening of the ligninolytic species/strains of *Pleurotus* correlated with the decolorization observed with the textile dyes. While the decolorization of indigo dye, in a solid media, occurred only in the presence of sugar cane bagasse, this did not happen with black sulphur dye, where the decolorization also occurred in the absence of sugar cane bagasse, depending on species/strain. Six species/strains were selected to test the sludge and all of them showed total decolorization when malt and sugar cane bagasse were present. In liquid media, all species/strains showed some decolorization, but no correlation was observed between weight and percentage decolorization. Regarding the decolorization rate, the results showed that the decolorization was due to dye adsorption by fungal mycelia. The selected species/strain selected for study in liquid media, under different nitrogen concentration, confirmed that decolorization is related to dye adsorption to fungal mycelia. For both dyes, production of ligninolytic enzymes was either not detected or extremely low. There was no difference in decolorization due to nitrogen concentrations in the medium. In the Ibama's ready biodegradability

assay, the dyes were also classified as not easily biodegradable. In lignocelulosic wastes added to the sludge, the studied strains - PSC 94/03 and CCB 020, showed the ability to colonize and decolorize the substrates, confirmed by a FDN/FDA reduction of 42,05% and a reduction in COD of 52,7%, when compared to controls. A 61,4% reduction of phenols was observed. No or little change was observed in minerals and total sugar contents. There was production of laccase, peroxidase and manganese peroxidase, mainly in the first 14 days of incubation, and being greater for the strain CCB 020. The results of the mutagenicity tests showed that the substrate colonized by PSC 94/03 became mutagenic.

Under the conditions used in this study, the liquid media were not suitable for the expression of the enzymes responsible for decolorization of the evaluated textile dyes, whenever the decolorization was observed due adsorption by mycelia. One of the selected strain of *Pleurotus sajor-caju* has potential for treatment of the sludge if mixed with lignocelulosic wastes, resulting in a new substrate that could be used as fertilizer, in biomass production or, in the production of enzymes such as laccase and manganese peroxidase responsible for dye decolorization/degradation process.

1. INTRODUÇÃO

O acúmulo no ambiente de materiais lignocelulósicos e xenobióticos, conseqüentes da ação do homem no processo de produção e transformação de diferentes materiais, vem sendo atualmente o tema de inúmeras pesquisas. Essas pesquisas têm buscado o melhor tratamento desses resíduos lignocelulósicos e/ou xenobióticos considerando os custos, o tempo e a eficiência dos processos existentes na reciclagem e eliminação e/ou destoxificação, respectivamente.

Um dos materiais mais recalcitrantes na natureza e de difícil e prolongada biodegradação no ambiente é a lignina. Esse polímero tridimensional, composto de anéis aromáticos ligados estavelmente, é degradado primariamente pelos fungos da podridão branca da madeira. Esse grupo, constituído por basidiomicetos, é assim chamado porque degradam a lignina expondo a celulose e hemicelulose prontamente utilizadas por inúmeros outros organismos.

A degradação da lignina tem sido extensivamente estudada empregando-se os *Phanerochaete chrysosporium*, um basidiomiceto altamente ligninolítico. A atividade ligninolítica decorre de um grupo de enzimas, genericamente chamadas de ligninases, entre as quais estão as lacases (fenoloxidasas), a manganês peroxidase e as ligninas peroxidases. Graças à grande diversidade das ligninas na natureza, esse sistema enzimático não é específico, tendo sido constatado a possibilidade de degradação de outros compostos aromáticos relacionados à poluição ambiental tais como de pesticidas, solventes, descoloração de efluentes aquosos da indústria de papel entre outros.

Paralelamente, o interesse, nas espécies de vários gêneros de basidiomicetos que podem ser cultivados como cogumelos comestíveis, vem crescendo em todo o mundo devido à possibilidade da transformação de resíduos lignocelulósicos em alimento de alto valor nutricional. Até o presente, os *Agaricus* são os cogumelos comestíveis mais cultivados. Outros gêneros vêm despertando o interesse dada à alta atividade lignocelulolítica que proporciona um valor de bioconversão daqueles

materiais em maior e menor tempo - entre eles destacam-se os *Pleurotus*.

A capacidade biodegradadora de lignina e xenobióticos de *P. chrysosporium* está relacionada à atividade de ligninas peroxidases e manganês peroxidases além de outras oxidases geradoras de peróxido de hidrogênio. *Pleurotus* spp. não produzem atividade de lignina peroxidases porém apresentam atividade de lacases, manganês peroxidases, oxidases e provavelmente uma peroxidase não dependente do manganês. Os *Pleurotus* estão amplamente difundidos na natureza e apresentam espécies bem adaptadas ao clima tropical e subtropical.

Os primeiros estudos da atividade ligninolítica empregavam ligninas específicas radiomarcadas. Posteriormente, os corantes poliméricos radiomarcados foram usados por serem mais baratos, mais solúveis, comercialmente disponíveis e de alta pureza. Vários corantes têm sido empregados e a capacidade dos fungos da podridão branca em descolori-los sugere que esses organismos possam ser empregados no tratamento dos efluentes das indústrias relacionadas a corantes.

As indústrias têxteis de tinturaria geram resíduos aquosos coloridos, mesmo quando há tratamento por lodo ativado, como é o caso de uma indústria têxtil de Americana – SP, que emprega os corantes índigo e preto enxofre no tingimento do algodão. O tratamento de efluentes com corantes por lodo ativado é eficiente na redução da DBO, mas não na redução da DQO, a qual está relacionada à predominância de produtos químicos como carga poluidora. Além do resíduo líquido colorido, um resíduo sólido – o lodo, é gerado. Na situação deste tratamento, são produzidos aproximadamente 12 toneladas/dia de lodo ou 8 toneladas prensadas, que são dispostas em aterros sanitários e lagoas de secagem, podendo levar à contaminação das águas e lençóis freáticos. Algumas pesquisas têm utilizado o lodo diretamente como fertilizante, porém algumas restrições quanto à quantidade e períodos de aplicação e descanso existem devido à sua composição (alta concentração de sais minerais), bem como com relação ao tipo de cultivo no terreno tratado, que acaba por não absorver a grande quantidade de lodo gerada por dia; restrições quanto ao potencial mutagênico do lodo da indústria têxtil, devido à

presença de corantes também existem.

Estudos preliminares empregando basidiomicetos constataram a degradação *in vitro* do corante indigotina (classe dos "vat") presente no resíduo líquido e no lodo residual do tratamento de efluentes por lodo ativado de uma indústria têxtil. O resíduo líquido é descartado nas águas e o lodo disposto em aterros sanitários.

A biorremediação desses efluentes sólidos e líquidos vem sendo estudada. Entre os microrganismos com potencial de uso encontram-se os basidiomicetos, especialmente aqueles denominados fungos causadores de podridão branca da madeira.

Embora a fermentação líquida seja a mais empregada em estudos com fungos degradadores da podridão branca, inclusive para a degradação de xenobióticos, o emprego de resíduos industriais e xenobióticos misturados aos resíduos lignocelulósicos foi proposto como um modo de reciclar tais materiais empregando-os como substrato para os fungos causadores de podridão branca, condição esta mais próxima do habitat natural destes fungos. Além disso, o substrato de crescimento após ação das enzimas ligninolíticas pode eventualmente ser reutilizado, tendo sido proposto seu emprego como adubo orgânico e para remediação de solos, entre outros.

Essas considerações vêm de encontro à tendência mundial – a reciclagem, utilizando-se resíduos para produção de energia e ou produção de biomassa e reutilização de subprodutos.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a capacidade de descoloração/degradação dos corantes índigo e preto enxofre por espécies/linhagens de *Pleurotus*, sob condições definidas, visando a seleção

daquelas possíveis de serem utilizadas em processo de biorremediação de resíduos da indústria têxtil, que utiliza sistema de lodo ativado para tratamento de seus efluentes (líquido e sólido) onde tais corantes estão presentes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Degradação de xenobióticos

Semple & Fermor (1995) descreveram, de forma esclarecedora, o mecanismo de biorremediação. As considerações a seguir fazem parte dessa descrição.

Os poluentes ambientais, independente de sua origem química, sintética ou natural, são liberados no ambiente em consequência das atividades agroindustriais. Esses compostos são conhecidos como xenobióticos. Quando os xenobióticos são liberados no ambiente, podem ser degradados nas mais variadas taxas dependendo das condições químicas e físicas e da natureza dos microrganismos presentes, ou podem tornar-se imobilizados no solo ou acumular-se na cadeia alimentar. Existem dois processos básicos envolvidos na remoção de poluentes: degradação química e transformação biológica (degradação microbiana).

Quando um composto orgânico é descrito como sendo biodegradável, entende-se que ele pode ser “quebrado” por microrganismos ou por outros mecanismos biológicos. Um processo de biodegradação ideal resulta em biotransformação do composto, com conseqüente perda ou mudanças nas suas características e propriedades químicas originais. Esse processo pode ocorrer em três níveis: o desejável é o último nível, ou seja, quando a biodegradação resulta em mineralização do composto a dióxido de carbono e água, removendo, portanto, o xenobiótico completamente; uma biodegradação aceitável implica na quebra do composto onde os produtos resultantes são de toxidez mínima ou estão abaixo das concentrações tóxicas; finalmente, a biodegradação primária pode envolver somente uma mudança estrutural mínima na molécula original podendo ou não causar

alterações nas suas propriedades físicas e químicas.

O processo biodegradativo pode ser conduzido empregando-se um único microrganismo em cultura pura ou, mais freqüentemente, pode, se necessário, empregar-se uma mistura diversa de organismos. Pode ocorrer tanto sob condições aeróbicas como anaeróbicas, dependendo das necessidades dos microrganismos degradadores, da estrutura dos compostos e da coexistência de consórcios metanogênicos. No entanto, a biodegradação de poluentes pode ser inibida devido às condições ambientais adversas onde os poluentes e os microrganismos ocorrem. Estas condições adversas podem ser temperatura, pH, salinidade, composição iônica, baixa dissolução de oxigênio, concentrações inadequadas de nutrientes, variabilidade dos suplementos orgânicos, presença de substâncias tóxicas e a presença de outros compostos recalcitrantes sintetizados pelo homem. Conseqüentemente têm-se a persistência e/ou o acúmulo desses compostos resultando em poluição.

Os processos físicos e químicos de tratamentos de poluentes ou resíduos agroindustriais, embora empregados, são processos caros que envolvem gasto de energia, no caso dos tratamentos físicos, ou podem resultar em novos problemas ambientais, como no caso dos tratamentos químicos. A biorremediação pode ser um tratamento ambiental com custo relativamente aceitável e a "US Environmental Protection Agency" - EPA, em 1992, compilou vários estudos onde a biorremediação foi empregada no tratamento de poluentes ambientais, tais como contaminantes relacionados ao petróleo, preservativos de madeira, solventes, agentes químicos agrícolas, resíduo do carvão e munição; outros citados incluem o benzeno, tolueno, diesel, creosoto/hidrocarbonos poliaromáticos, etilbenzeno, xilenos, gasolina, lodos residuais, lubrificantes e hidrocarbonetos pesados, pentaclorofenol, etc.

Até recentemente, a maioria dos estudos em biorremediação vem sendo conduzida com os microrganismos associados com a quebra de materiais lignocelulósicos e que estão envolvidos no processo de compostagem ou fermentação. Entre os microrganismos envolvidos estão os fungos denominados "fungos da podridão branca da madeira" que têm potencial para degradar vários

compostos aromáticos.

Os fungos causadores da podridão branca são basidiomicetos, assim chamados, por possuírem um sistema enzimático capaz de degradar eficientemente a lignina, bem como a celulose e a hemicelulose. Esses basidiomicetos foram divididos por Tuor et al. (1995) em cinco grupos de acordo com a atividade enzimática, sendo que o grupo mais estudado é aquele capaz de produzir lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. Entre esses fungos citam-se o *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* e *P. brevispora*, *Pleurotus sajor-caju* e *P. ostreatus* e, *Phanerochaete chrysosporium*.

A lignina é o nome comum de um grupo heterogêneo de polímeros fenólicos que junto com a hemicelulose e a pectina preenchem os espaços entre as fibrilas de celulose da madeira. Quimicamente, a lignina é um polímero aromático tridimensional composto basicamente de três diferentes tipos de *p*-hidroxicinamil álcool. A quantidade relativa desses álcoois é que determina o tipo de lignina e, conseqüentemente a rigidez do tecido vegetal. Na natureza esse polímero é uma macromolécula com infinitos pesos moleculares, e a polimerização dos radicais fenóxi dá-se especialmente por ligações estáveis carbono-carbono e ligações éter entre os núcleos aromáticos (Leisola & Fiechter, 1985).

Na natureza a lignina é recalcitrante e limita o acesso à celulose e hemicelulose. Sua completa degradação, no entanto, acredita-se, ser resultado da ação cooperativa de vários fungos e bactérias, sendo que as bactérias têm um papel secundário nessa degradação que está relacionado ao metabolismo de monômeros de compostos aromáticos (Leisola & Fiechter, 1985). Em laboratório este material orgânico pode ser degradado pelo emprego de ácidos fortes ou emprego de álcalis fortes ou solventes, e/ou ainda por tratamentos físicos tal como a moagem do material acompanhado de altas temperaturas, sendo processos dispendiosos e poluentes, como já observado anteriormente (Rajarathnam & Bano, 1989).

Segundo Leisola & Fiechter (1985), a aplicação mais provável dos organismos

ligninolíticos oxidativos relaciona-se ao tratamento de resíduos que contém ligninas ou outros compostos aromáticos recalcitrantes. Outras aplicações desses organismos ligninolíticos incluem melhora da digestibilidade e valor nutricional de materiais lignocelulósicos, e tratamento de materiais celulósicos para aplicação no processo de polpação da indústria de papel. Aplicações mais difíceis, incluem o emprego desses organismos em biotransformações da lignina e substâncias relacionadas a compostos químicos de valor.

Dentre os fungos da degradação branca o *Phanerochaete chrysosporium* tem sido o mais estudado na elucidação da degradação dos lignocelulósicos e outros compostos aromáticos recalcitrantes (Leisola & Fiechter, 1985). Entre a grande variedade de xenobióticos que este fungo é capaz de degradar citam-se o DDT, o 2,4,5-T, benzo(a)pireno, os bifenis policlorados e o lindane. O *P. chrysosporium* também é capaz de descolorir uma grande variedade de compostos altamente coloridos e suas misturas, tais como os resíduos do processo kraft da indústria de papel, corantes poliméricos, vários corantes trifenilmetano, incluindo o cristal violeta, bem como os corantes azo (Bumpus, 1995).

O sistema ligninolítico do *P. chrysosporium* assim como de outros fungos da degradação branca é não-específico e muitos diferentes tipos de ligninas, incluindo as ligninas de resíduos industriais, podem ser degradadas à taxas similares, resultando nos mesmos tipos e distribuição de produtos (60-70% CO₂, 40-30% de oligomêros solúveis). Conseqüente à não especificidade, alguns polímeros não relacionados à lignina como o poliguaiacol e os corantes poliméricos também podem ser degradados por fungos ligninolíticos (Leisola & Fiechter, 1985; Guthrie & Davis, 1985).

Os primeiros estudos sistemáticos da degradação da lignina pelo *P. chrysosporium* empregaram ligninas específicas radiomarcadas (¹⁴C-ligninas), posteriormente, os corantes poliméricos radiomarcados foram testados (Glenn & Gold, 1983). Estes revelaram algumas características sobre a fisiologia da degradação relacionada à atividade ligninolítica. Desde então, os corantes

poliméricos têm sido usados nesses estudos porque são menos dispendiosos, mais solúveis, comercialmente disponíveis e de alta pureza e oferecem menores riscos entre outras qualidades, que os primeiros.

O emprego dos corantes poliméricos radiomarcados para o estudo da fisiologia e genética de degradação da lignina em substituição aos substratos sintéticos radiomarcados revelou que a descoloração desses é conseqüente do metabolismo secundário do *P. chrysosporium* e ocorre paralelamente à degradação da lignina sugerindo que este sistema é responsável pela descoloração. Ocorre em meio limitante em nitrogênio após sua depleção e, assim como o sistema ligninolítico é dependente da presença de oxigênio; nesse estudo a presença de fenoloxidasas também esteve envolvida com a descoloração (Glenn & Gold, 1983).

Após essa constatação, vários corantes poliméricos têm sido empregados e a capacidade dos fungos da degradação branca em descolori-los tem sido estudada e, Glenn & Gold (1983) sugeriram a possibilidade de empregar estes organismos no tratamento de resíduos das indústrias relacionadas ao fabrico e utilização de corantes, entre elas a indústria têxtil.

3.2. A Indústria têxtil e seus efluentes

Na indústria têxtil, as águas residuais das seções de tingimento e acabamento contem uma grande variedade de produtos químicos que resulta numa ampla gama de problemas para o gerenciamento de efluentes. Com relação à presença dos corantes, a entrada potencial desses no meio ambiente se dá, segundo Boletim ETAD (1995), por quatro vias, a saber: pelas emissões ou descargas de efluentes nos processamentos rotineiros; através do descarte de sobras e resíduos do processo; através do descarte de embalagens usadas; através da eliminação acidental.

Analisando as emissões ou descargas de efluentes do processo, deve-se considerar os sistemas de tratamentos de águas residuais têxteis. De acordo com

Longo (1987), quando este existe na indústria têxtil, basicamente, o sistema de tratamento das águas residuais pode ser dividido em duas etapas: tratamento primário ou preliminar e tratamento secundário.

No tratamento primário, faz-se a remoção dos sólidos grosseiros flutuantes, os de sólidos pesados e a equalização, com ajuste de pH e o abaixamento da temperatura. No tratamento secundário ocorre a redução da carga poluidora de origem orgânica, que é determinada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e, a retirada de sólidos sedimentáveis. O processo de tratamento secundário, classicamente utilizado, é o tratamento biológico por lodos ativados onde não ocorre a remoção da cor (Longo, 1987). Nesse processo dois resíduos são gerados: o efluente líquido e o lodo em excesso no sistema. O líquido é descartado nos rios e o lodo é disposto em lagoas.

De acordo com Stanigher (1987), existem várias formas de processar o lodo a ser eliminado, porém os métodos são sempre custosos e quase sempre necessitam de grandes áreas. Entre as formas de tratamento está o leito de secagem (tanques onde se espalha o lodo para o mesmo secar naturalmente – chamadas lagoas, acima mencionado), filtro prensa ou centrifugação da água para remoção da água que é descartada nos rios. O resíduo semi-sólido é disposto após secagem em aterros sanitários. No entanto, a disposição em aterros traz os seguintes inconvenientes: não é um processo de tratamento e sim de imobilização; sacrifica a área e, exige monitoramento, pois há possibilidade de contaminação do lençol freático; além disso, o sistema pode gerar de 1 a 100 toneladas por dia de biosólidos (Conchon et al., 1997).

Recentemente Hornink (2001) informou que os países da comunidade européia decidiram que até o final do ano 2005 os aterros deverão deixar de receber resíduos, embora algum tipo de disposição vá existir, principalmente para os resíduos dos sistemas de incineração.

Groff (1993) discute os principais problemas associados com o tratamento de

resíduos aquosos das indústrias têxteis, dentre eles citam-se a temperatura, o pH, o teor de fósforo, a DQO, halogênios orgânicos adsorvíveis (AOX) e a cor. Os problemas ambientais com o emprego de corantes incluem os pós e a deposição dos resíduos aquosos durante a manufatura e aplicação.

Nos efluentes líquidos o efeito do corante é fácil à percepção visual, mesmo em pequenas concentrações e atrai a atenção do público e das autoridades ligadas à proteção ambiental. Os parâmetros relativos aos corantes para avaliação dos efluentes relacionam-se ao conteúdo de metais pesados, produtos contendo AOX, coloração, biodegradabilidade e toxidez para os organismos aquáticos (Salem, 1995).

No processamento, a indústria têxtil consome volumes substanciais de água e produtos químicos. Os produtos químicos variam dos inorgânicos aos orgânicos e elementos poliméricos. Existem mais de 8000 produtos químicos associados com o processo de tingimento e mais de 100.000 corantes comercialmente disponíveis. Esses corantes exibem uma grande variedade de estruturas químicas tais como ácida, reativa, básica, dispersa, azo, diazo, à base de antraquinona e aqueles complexados com metais. A única coisa que têm em comum é a habilidade de absorver luz na região do visível (Banat et al., 1996).

No tingimento, os corantes mais comumente empregados pertencem à classe dos corantes azo e "vat". Os primeiros são pigmentos insolúveis empregados na coloração de materiais celulósicos a um custo menor que os corantes "vat". Os corantes têm em comum um grupamento químico que são os anéis aromáticos. Entre os grupos químicos constituintes das classes de corantes acima citados estão o grupo azo que se constitui de anéis aromáticos ligados por $-N=N-$ e, os corantes "vat" constituídos dos cromóforos indigóides que podem ser derivados da indigotina ou tioindigo ou cromóforos derivados basicamente da antraquinona (Trotman, 1964).

Os corantes que têm por estrutura básica a antraquinona são os mais resistentes à degradação devido à suas estruturas aromáticas fundidas, que permanecem coloridas por longos períodos de tempo. Corantes básicos têm alto

brilho e, portanto, alta intensidade de cor, tornando-os mais difíceis de descolorir, enquanto que corantes complexados com metais, tais como aqueles à base de cromo, podem liberar esse metal, que é carcinogênico, nos suprimentos de água naturais. Alguns corantes dispersivos têm mostrado também tendência de bioacumulação e íons de metais pesados oriundos de efluentes de indústrias têxteis têm sido detectados em altas concentrações em algas e plantas superiores expostas a tais efluentes (Banat et al., 1996).

No presente estudo, os corantes que estão sendo considerados são o índigo e o preto enxofre, empregados no processo de tingimento de fibras celulósicas. O índigo, derivado da indigotina, foi considerado um dos corantes vat mais importantes e quimicamente é classificado como corante carbonila.

O índigo é praticamente insolúvel em solução ácida aquosa e em solução alcalina aquosa, mas dissolve-se bem em ácido sulfúrico concentrado. No processo de tingimento, para que ocorra a solubilização há necessidade de uma redução química alcalina que dá origem à forma leucosolúvel e, sob condições ácidas são convertidas para forma vat ácida insolúvel ou pouco solúvel, onde acontece o desenvolvimento da cor no tingimento (Balan, 1998).

Os corantes a base de enxofre, na sua forma final, após aplicação, são insolúveis em água e constituem os compostos caracterizados por ligações di- e polisulfitos ($-S_{n-}$) entre resíduos aromáticos. Eles podem ser divididos em três grupos. Primeiro, os corantes a base de enxofre propriamente ditos que são poliméricos e insolúveis em água; o segundo grupo consiste dos corantes C.I. leuco enxofre, prontos para uso, que estão disponíveis em soluções altamente concentradas pré-reduzidas. O terceiro grupo (C.I. corantes enxofres solubilizados) compreendem os corantes solúveis contendo grupos tiosulfato. Informações técnicas dos corantes a base de enxofre do grupo prontos para uso ("ready to use") ressaltam, entre suas qualidades ao meio ambiente, a menor contaminação das águas residuárias com redução da cor, em estação de tratamento por lodo ativado, em 97,5%. No entanto, Zollinger (1988) discute sobre a problemática da liberação dos mesmos no meio

ambiente e, enfatiza que quantidade significativa da perda da cor do efluente líquido dá-se, principalmente, pelo processo de adsorção e, que, portanto permanece no resíduo sólido.

A cor é o primeiro contaminante a ser reconhecido em resíduos aquosos e tem que ser removida antes de sua descarga em corpos d'água ou na terra. A presença de quantidades muito pequenas de corantes na água (menos que 1 ppm para alguns corantes) é altamente visível e afeta o mérito estético, a transparência da água e a solubilidade dos gases em lagos, rios e outros corpos de água. Os métodos para a remoção da DBO da maioria dos efluentes estão bem estabelecidos; os corantes, entretanto, são mais difíceis de serem tratados por causa de sua origem sintética e principalmente por serem estruturas moleculares aromáticas complexas. Tais estruturas são freqüentemente construídas para resistirem ao desbotamento quando expostas ao sabão, água, luz ou agentes oxidantes. Essas qualidades embora desejadas, tornam os corantes mais estáveis e menos disponíveis a biodegradação (Banat et al., 1996).

O interesse na poluição potencial por corantes têxteis esteve, a princípio, relacionado à possibilidade de serem carcinogênicos e toxigênicos. Preocupação esta relacionada principalmente ao fato de que muitos corantes são feitos de carcinógenos conhecidos tais como a benzidina e outros compostos aromáticos, todos os quais sofrem reestruturação resultante do metabolismo microbiano. Por exemplo, demonstrou-se que os compostos azo e nitro são reduzidos nos sedimentos e no ambiente intestinal, resultando na regeneração de aminas tóxicas correlacionadas (Banat et al., 1996). O corante índigo também apresentou caráter genotóxico para *Salmonella typhimurium* (TA 98) com ativação metabólica no teste de Ames (Sharat, 1999).

Segundo Bumpus (1995), os corantes azo são o maior grupo de corantes sintéticos liberados no ambiente e não são prontamente degradados nos sistemas de tratamento biológico o que os torna um problema ambiental significativo nos locais onde são fabricados e usados, contaminando, com seus efluentes e lodos residuais,

os rios e terrenos onde os lodos são dispostos, causando, por exemplo, inibição da fotossíntese superficial nos rios e coloração e contaminação dos lençóis freáticos.

De acordo com o Boletim ETAD (1995), sob condições anaeróbias os corantes da classe azo podem desintegrar-se (quebra redutiva) em metabólitos que podem se degradar posteriormente sob condições aeróbias. Contudo, estudos demonstram que muitos dos corantes azo são decompostos, sob condições anaeróbias, em aminas potencialmente carcinogênicas, após descarga no ambiente (Bumpus, 1995; Knapp *et al.*, 1995; Young & Yu, 1997).

De acordo com Banat *et al.* (1996), a identificação das características físico-químicas nas propriedades de muitos dos corantes empregados tem sido o principal problema para a classificação dos mesmos. A classificação acima mencionada como ácido, direto, disperso, etc. baseia-se no modo dos corantes colorirem ou em suas estruturas químicas principais, ambos os quais são inadequados para propósitos de avaliação ambiental. Embora os corantes constituam somente uma pequena parte do volume total de resíduo no processamento têxtil, esses compostos não são prontamente removidos por processos de tratamentos microbiológicos dos resíduos aquosos. Além disso, os corantes podem ser maléficos à população microbiana presente em tais tratamentos e podem levar à diminuição da eficiência ou falha no tratamento em tais plantas. Efeitos similares adversos têm sido também detectados nas populações microbianas aquáticas em geral ou em culturas de laboratório expostas a tais corantes.

Em muitos países desenvolvidos a legislação governamental está se tornando mais exigente com relação à remoção dos corantes dos efluentes industriais, o que por sua vez vem se tornando um problema crescente para as indústrias têxteis. Na Europa, as agências de proteção ambiental vêm promovendo a prevenção da transferência de problemas de poluição de um ambiente para outro, implicando para a maioria das indústrias têxteis, no desenvolvimento de técnicas para o tratamento de seus próprios efluentes *in loco* antes de descartá-los. Recentemente, agências federais e estaduais nos Estados Unidos requisitaram menores limites de cor nos

efluentes (< 200 unidades da "American Dye Manufactures Institute, ADMI") (Banat et al., 1996).

Na Comunidade Européia a remoção de corantes poluentes vem ganhando importância, particularmente, à medida que as regulamentações para descarga de efluentes industriais estão sendo reforçadas. Nesse caso onde muitas plantas têxteis têm locação rural e os tratamentos municipais vêm seus custos mais elevados, tanto as indústrias como os cientistas têm convergido suas pesquisas na busca de novos tratamentos e tecnologias particularmente aquelas visando à descoloração de corantes nos efluentes (Banat et al., 1996).

O Boletim ETAD (1995) sugere que níveis ou concentrações abaixo de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ normalmente não dão motivo a nenhum problema, enquanto que valores acima de 1 mg.L^{-1} são críticos, levando à poluição visual. De acordo com Salem (1995), baseando-se em experiências publicadas na literatura, é necessária uma descoloração sempre que a concentração do corante no curso d'água exceder 5 mg.L^{-1} . A coloração do efluente está relacionada a DQO, que representa a grandeza decisiva do resíduo orgânico nas águas servidas e, a coloração é causada por parte desse resíduo. Segundo Banat et al. (1996), os corantes usualmente têm baixa taxa na razão de remoção da DBO/DQO ($\text{DBO/DQO} < 0.1$). Os valores altos da DQO sobre a DBO demonstram uma predominância da carga poluidora por produtos químicos sobre a carga poluidora de origem orgânica (Longo, 1987).

Atenção especial deve ainda ser dada quando uma indústria têxtil descarrega seus resíduos aquosos na rede municipal de esgotos, sendo necessária uma avaliação desses especificamente quanto ao conteúdo de corantes no efluente que podem afetar a planta municipal de tratamento de esgoto (Boletim ETAD, 1995). Entre os efeitos danosos citam-se: possível efeito no tratamento de esgotos aeróbicos pois, certos tipos de corantes podem afetar, em princípio os microrganismos do tratamento de esgoto aeróbio, impedindo-os de biodegradar os componentes normais existentes no esgoto; possível efeito no tratamento do lodo do esgoto; possível efeito no descarte do lodo do esgoto a ser utilizado como fertilizante; e possível efeito sob

águas correntes onde o impacto da presença de corantes suscita efeitos danosos visuais, efeitos sobre os microrganismos aquáticos e adequabilidade da água como potável ou para outras finalidades (Boletim ETAD, 1995).

A poluição visual já foi discutida acima. Quanto aos efeitos sobre organismos aquáticos embora existam vários relatos que corantes sintéticos, em geral, e pigmentos solúveis não bioacumulem, faltam dados conclusivos e, em águas potáveis naturais parece improvável que os corantes presentes apresentem um problema de saúde pública (Boletim ETAD, 1995).

De acordo com Banat et al. (1996), no passado, os sistemas de tratamento municipais visavam principalmente à purificação dos resíduos aquosos das indústrias têxteis. Esses sistemas, entretanto, dependiam principalmente da atividade biológica e foram na sua maioria taxados de ineficientes na remoção dos corantes mais resistentes; conseqüentemente técnicas menos sensíveis, porém mais efetivas, foram desenvolvidos e testadas para a remoção de corantes. Esses métodos dependiam de tratamentos físicos ou químicos, ocasionalmente em conjunção com tratamento biológico. As técnicas físicas e químicas são numerosas e incluem floculação físico-química combinada com flotação, eletro flotação, floculação com Fe(II)/Ca(OH)_2 , filtração com membrana, coagulação eletrocinética, destruição eletroquímica, troca iônica, irradiação, precipitação, ozonização, adsorção e método de tratamento Katox envolvendo o uso de misturas de carbono ativado e ar. Algumas dessas técnicas demonstraram ser efetivas, embora com alguns problemas. Entre esses foram relacionados: o excesso de quantidade de agentes químicos ou geração de lodo com problemas de disposição óbvios; falta de redução efetiva da cor, particularmente para os corantes azo sulfonados; e sensibilidade à variação na constituição do resíduo aquoso. Certos esquemas de tratamentos podem ser aplicados em algumas indústrias têxteis que empregam um ou dois tipos de corantes, mas não para todas ou para aquelas que apresentam em seus efluentes uma mistura de corantes (Banat et al., 1996).

Outras técnicas envolvem oxidação química usando hipoclorito de sódio para

remoção da cor. Elas, entretanto, liberam grandes quantidades de aminas aromáticas que são carcinogênicas, ou outros compostos tóxicos o que conseqüentemente agrava o problema. Outras pesquisas têm sugerido que os corantes recalcitrantes, devido a sua afinidade em aderir a superfícies, possam ser removidos por adsorção sem o envolvimento da biodegradação e a liberação de produtos intermediários. No entanto, segundo Banat et al. (1996), nenhum processo parece ser capaz de efetivamente descolorir os resíduos aquosos das indústrias têxteis e geralmente preconiza-se a aplicação de métodos combinados.

De acordo com Salem (1995), a resistência à biodegradabilidade aeróbica, contudo, tem a vantagem de que a molécula de corante, devido as suas pronunciadas propriedades de adsorção, permaneça intacta durante o processo de tratamento biológico, conservando assim a capacidade de ser eliminada por adsorção. Devido à alta afinidade para com os substratos, muitos corantes são adsorvidos pelas lamas bioativadas durante o tratamento do esgoto, sendo assim eliminados do efluente final tratado. O grau de adsorção varia conforme a estrutura dos corantes, às condições de tratamento, processo biológico, tempo de exposição e outros valores do efluente, tais como pH e temperatura.

Esta propriedade de adsorção é empregada no tratamento físico-químico por flotação e biológico e é eficiente na remoção de corantes, pigmentos, detergentes e material residual orgânico, com reduções médias em torno de 65%. Esse método ainda elimina a necessidade de tratamento terciário para remoção de cor, feito normalmente com técnicas caras como o uso de carvão ativado, da ozonização e de cloração, tendo sido este último proibido pelos órgãos de controle de poluição ambiental, pela formação nos corpos receptores de compostos organoclorados (Longo, 1987). No entanto, não se menciona o que é feito do material adsorvido nesse sistema físico-químico por flotação onde os corantes são concentrados.

Pouca ou nenhuma alusão quanto à contaminação dos rios e lençóis freáticos têm sido encontrada na literatura relacionada à disposição dos lodos residuais, onde os corantes estão adsorvidos. Devido às suas características físico-químicas tais

lodos residuais têm sido estudados para atuarem como adubo orgânico (Boletim ETAD, 1995; Wanucha, 1997). Dados relativos à cor não são mencionados por Wanucha (1997) que discute a possibilidade dos lodos residuais semi-sólidos serem empregados como fertilizante devido à alta concentração em nitrogênio.

De acordo com Wanucha (1997), um dos problemas do uso ou da limitação de do uso do lodo relaciona-se à alta concentração de sais de sódio, potássio e cloro que podem limitar a absorção adequada de nutrientes na rizosfera. Entre as formas de contornar esse problema sugere-se a aplicação concomitante de cálcio. Esses estudos vêm sendo conduzidos na Carolina do Norte, Estados Unidos, porque a legislação nesse estado proíbe a disposição de biosólidos e resíduos da indústria têxtil em aterros sanitários municipais.

Com relação ao descarte do lodo do esgoto (para serviços de tratamento de água municipais que recebem os resíduos da indústria têxtil sem tratamento prévio) o Boletim ETAD (1995) cita que a ECETOC "Ecological & Toxicology Centre" concluiu que níveis de substâncias orgânicas em solo abaixo de 1 mg/kg não são passíveis de afetar adversamente o crescimento de plantas. Um estudo apresentado pelo Boletim ETAD (1995) com quatro corantes diferentes não demonstrou nenhum nível de efeito contra inúmeras plantas até 100 mg/kg ou acima e, concluiu, segundo um cálculo teórico da concentração de um corante no lodo do esgoto, que estes suscitem qualquer dúvida quanto à aplicação do lodo como adubo agrícola.

O emprego do lodo residual resultante dos tratamentos biológicos de despejos líquidos sanitários ou industriais em áreas agrícolas é previsto pela legislação do estado de São Paulo. A CETESB (1999) estabeleceu procedimentos, critérios e requisitos para elaboração de projetos, implantação e operação de sistemas de aplicação desses lodos. Vários são os critérios a serem pesquisados e observados para incorporação desses ao solo, entre eles destaca-se a necessidade da caracterização físico-química e microbiológica dos mesmos; no caso de indústrias que manuseiam substâncias consideradas tóxicas – como os lodos das indústrias têxteis, exige-se a apresentação dos resultados de genotoxicidade – avaliados pelo

teste de mutação gênica reversa em bactérias, conhecido como teste de Ames.

Como anteriormente mencionado, atualmente, são os sistemas biológicos os mais utilizados e, embora tenham a capacidade de reduzir a DBO e até mesmo a DQO, têm problemas na redução da cor nos efluentes aquosos. Desta forma, a literatura sugere que há um grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de descoloração microbiológico, visando a total remoção da cor (Banat et al., 1996).

De acordo com Banat et al. (1996), tais processos biológicos podem ser adotados como um pré-tratamento ou pós-tratamento na descoloração, combinado com sistemas de tratamento convencionais (lodo ativado) como uma alternativa efetiva para uso pelas indústrias têxteis de tingimento. Uma das maneiras possíveis é o desenvolvimento de sistemas de pré-tratamentos envolvendo o emprego de microrganismos termotolerantes ou termofílicos pois os resíduos corados são liberados a temperatura de 50- 60°C.

Um outro aspecto a ser considerado relaciona-se ao tratamento do lodo residual onde existe a presença de corantes adsorvidos, alta quantidade de nitrogênio (devido à presença de microrganismos) e sais minerais oriundos da adição de produtos químicos durante o processamento e tingimento de artigos têxteis.

A ocorrência de compostos tais como fenólicos, anisóis, aril-o-diéters e bifenilas, comuns tanto nas ligninas como nos poluentes orgânicos, levou às pesquisas com os fungos da degradação branca visando a degradação de xenobióticos. Estudos com compostos poluentes radiomarcados (^{14}C) demonstraram que o sistema ligninolítico do *Phanerochaete chrysosporium* é capaz de clivar o anel aromático de inúmeros compostos. Até o momento, os fungos da degradação branca são os únicos eucariotos conhecidos capazes de clivar anéis aromáticos fundidos dos hidrocarbonetos. Conseqüentemente, têm-se proposto que sistemas de biotratamento inoculados com esses fungos possam ser um modo de promover a destoxificação de resíduos químicos poluentes. Obviamente considerando seu emprego em tratamentos aeróbios de efluentes residuais contaminados, lodos, sedimentos, e aterros onde os

procedimentos de tratamento incluem processo de lodo ativado, lagoas aeradas, digestão aeróbica, compostos aeróbicos, filtros e bioreatores. Além disso, existem cerca de 1600 espécies de basidiomicetos envolvidos com a reciclagem do carbono da lignina, uma propriedade promissora a ser investigada na biodegradação de poluentes ambientais orgânicos e aromáticos (Rajaratnam et al., 1992).

3.3. O processo de biodegradação da lignina e de corantes

Vários são os processos biológicos que vêm sendo estudados para o tratamento dos resíduos da indústria têxtil visando a descoloração.

Entre os microrganismos implicados com a descoloração de corantes têxteis estão as bactérias, fungos, algas e mais recentemente consórcios de culturas de bactérias (Banat et al., 1996). Muitas bactérias foram capazes de descolorir os corantes têxteis. Os problemas encontrados relacionam-se ao isolamento e ao período de adaptação desses microrganismos ao meio contendo o poluente, e à capacidade de descolorir do microrganismo que não é verdadeira para todos os corantes. Trabalhando-se com consórcios de bactérias essa condição pode ser melhorada uma vez que os resíduos contêm normalmente mais de um corante, além de outros produtos químicos, no entanto, nessa situação as condições do meio devem, freqüentemente, ser alternadas por condições de anaerobiose e/ou aerobiose para alcançar-se completa degradação (Banat et al., 1996). Recentemente, uma mistura de bactérias, chamadas de PDW e PDC mostraram-se capazes de descolorir alguns dos vários corantes têxteis testados (Banat et al., 1996). O consórcio microbiano chamado de PDW foi capaz de descolorir os corantes sob condições anaeróbicas e a média de remoção da cor de um efluente têxtil foi de 76%. Os testes preliminares com isolados dessa mistura mostraram que nenhum dos isolados era capaz de descolorir qualquer um dos corantes testados (Nigam et al., 1996). Os actinomicetos também podem solubilizar a lignina, mas a mineralização a CO₂ ocorre em menor extensão do que a apresentada pelos fungos da degradação branca e, segundo Ghosh & Singh (1993), tanto os actinomicetos quanto às bactérias capazes

de metabolizar a lignina o fazem a uma taxa menor que os fungos da degradação branca.

De acordo com Banat et al. (1996), até o momento apenas uma pesquisa envolvendo algas para a descoloração de corantes azo obteve resultados positivos. Várias espécies de *Chorella* e *Oscillatoria* foram capazes de degradar os corantes azo a aminas aromáticas e, posteriormente metabolizar as aminas aromáticas a compostos orgânicos simples ou a CO₂.

Portanto, ainda, os biodegradadores considerados mais efetivos são os fungos da podridão branca e da podridão marrom que degradam os materiais lignocelulósicos naturais de duas maneiras distintas, respectivamente: (1) degradação simultânea da celulose, hemicelulose e lignina; e, (2) degradação seletiva da lignina e hemicelulose (Ghosh & Singh, 1993).

O *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*, estágio imperfeito) é um dos mais potentes organismos ligninolíticos disponíveis, sendo o mais estudado. Possuem características tais como crescimento rápido, degrada extensivamente a lignina à alta temperatura, apresenta formação de conídios na fase assexual em abundância, e seu ciclo à fase sexual é rápido. Para o metabolismo da lignina esse fungo produz um sistema ligninolítico constitutivo, que se expressa somente durante a fase secundária e é induzido pela limitação de carbono, sulfato e nitrogênio, sendo altamente oxidativo (Leisola & Feitcher, 1985; Ghosh & Singh, 1993).

Aparentemente os fungos da degradação branca biodegradam a lignina através de diferentes combinações de peroxidases e oxidases chamadas genericamente de ligninases (Leisola & Feitcher, 1985). Compreende-se por ligninases várias isoenzimas: lignina peroxidases (LiPs), peroxidases dependentes do manganês (MnP) bem como fenoloxidasas e oxidases capazes de produzir H₂O₂ (Tuor et al., 1995).

As enzimas extracelulares associadas com a degradação da lignina por *Phanerochaete chrysosporium* incluem as LiPs, as MnPs e a oxidase glioxal geradora de H₂O₂ (Rajarithnam et al., 1992).

Estudos sobre a dinâmica de produção das enzimas revelam vários padrões. Estas podem ser excretadas paralelamente à produção da biomassa ou como um evento secundário, acompanhado por uma perda de peso significativa; outro fator responsável por diferenças na atividade enzimática pode estar relacionado à perda potencial para a produção de enzimas quando uma cultura é armazenada por longos períodos (Szklarz et al., 1989). No caso do *Pleurotus flabellatus* o meio de batata dextrose ágar levou à deterioração da capacidade de degradação do substrato palha de arroz, provavelmente devido ao envenenamento pela glicose, por consequência o meio de malte ágar é indicado na manutenção de culturas de *Pleurotus* (Rajarithnam & Bano, 1987).

A LiP descoberta em 1982, por Glenn e colaboradores (Haapala & Linko, 1993), em filtrados de cultura de *P. chrysosporium*, foi inicialmente chamada por diferentes nomes tais como oxigenase dependente de H₂O₂, ligninase e diarilpropano oxigenase, até que se descobriu serem estas peroxidases (Leisola & Waldner, 1988).

A LiP é capaz de oxidar substratos de lignina não fenólicos, contrário à lacase. O *P. chrysosporium* também produz um outro tipo de peroxidase dependente da presença de Mn(II), chamada manganês peroxidase (MnP) que oxida Mn(II) a Mn(III) e é capaz de oxidar vários substratos. Este fungo mostra atividade ligninolítica somente durante o metabolismo secundário sob limitação de nitrogênio e carbono. O papel do fósforo permanece incerto e outros elementos minerais tais como Cu(II), Zn(I) e Mn(II) parecem exercer uma influência na produção da LiP (Haapala & Linko, 1993).

As ligninas peroxidases e as peroxidases dependentes de manganês são glicoproteínas. Cerca de quinze peroxidases diferentes e MnP foram isoladas e purificadas considerando seu ponto isoelétrico. Todas as peroxidases contem um

grupo heme porfirina-ferro por molécula. O ferro é oxidado por H_2O_2 a um estado de oxidação maior o que torna a enzima capaz de oxidar a lignina e outros compostos relacionados (Leisola & Waldner, 1988).

As LiPs na presença de peróxido de hidrogênio catalisam a oxidação de um elétron de uma grande variedade de compostos aromáticos, dando como produtos iniciais, radicais aril catiônicos que subsequenteemente interagem em reações dependentes-substituintes tanto de radicais livres e de natureza iônica. As LiPs são oxidantes mais fortes que a "horse radish peroxidase" (HRP). Os radicais catiônicos reagem não enzimaticamente levando à quebra nas cadeias laterais alifáticas e núcleos aromáticos (Rajarithnam et al., 1992).

A lignina peroxidase tem uma atividade ótima a pH de aproximadamente 2,0 a temperatura ambiente e é facilmente superoxidada pelo excesso de H_2O_2 à forma inativa. A inativação também pode ocorrer pela perda do grupo heme sob agitação forte (Leisola & Waldner, 1988).

A manganês peroxidase (MnP), ou peroxidase corante, tem máxima atividade a pH 4,5 e, demonstrou dependência absoluta de Mn^{2+} e lactato. A enzima é estimulada pelo aumento da concentração protéica nas reações e inibida completamente por $NaNO_3$, KCN e EDTA a 1mM. A MnP oxida uma grande variedade de corantes, incluindo o vermelho fenol, o-dianisidina e "poly R" (Kuwahara et al., 1984). Demonstrou-se que o Mn^{2+} tem função na mineralização da lignina sintética por fungos da degradação/podridão branca, tanto como mediador ativo para MnP como regulador da sua produção, bem como da produção da LiP e lacase (Kerem & Hadar, 1993). A MnP realciona-se a LiP pois, esta última, oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , o Mn^{3+} pode oxidar unidades fenólicas da lignina e, pode estar envolvido na fragmentação da lignina (Rajarithnam et al., 1992).

Em meio líquido, a produção de enzimas ligninolíticas pode ser dividida em duas fases. A primeira fase, de crescimento do fungo quando a velocidade de agitação não é crítica. Durante a segunda fase, de produção da enzima, a velocidade

de agitação tem um papel chave. Nesta fase as culturas limitantes em nitrogênio podem ser agitadas acima de 150 rpm e as limitantes em carbono até 30-40 rpm, para manter a atividade ligninolítica (Leisola & Waldner, 1988; Moyson & Verachtert, 1993).

Um outro fator crítico é a tensão de oxigênio - o crescimento procede rapidamente quando as culturas, em meio líquido, são aeradas e, a atividade ligninolítica ocorre entretanto mais rápido, alcançando maiores teores quando a atmosfera é de 100% de O₂ (Leisola & Waldner, 1988). No entanto, em meio sólido o oxigênio não é fator limitante para a taxa de degradação da lignina, nem a taxa de respiração do fungo foi afetada pelo enriquecimento com O₂ (Kerem et al., 1992).

A temperatura de crescimento para o *P. chrysosporium* tem um papel importante na produção e na máxima atividade da MnP e LiP. Em temperaturas altas (39°, 33° e 28°C) houve produção da MnP e LiP, mas a 23°C houve maiores quantidades de MnP e, a 18°C somente a atividade de MnP foi detectada (Vyas et al., 1994). Esse fungo é termotolerante com uma temperatura ótima para crescimento entre 39-40°C. Sua taxa de crescimento diminui com o abaixamento da temperatura, determina um atraso na produção de MnP e LiP mas, melhora a atividade dessas e diminui a atividade proteolítica.

O álcool veratril aparece como metabólito secundário nas culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium* e é conhecido como indutor das LiPs. O álcool veratril também pode funcionar como um mediador na transferência de um elétron. Desta forma, compostos que não são diretamente acessíveis à enzima podem ser oxidados pela via do álcool veratril. Outra função é estabilizar a LiP pela remoção de excesso de H₂O₂ (Leisola & Waldner, 1988).

O álcool veratril é oxidado pelas LiPs sob condições aeróbicas a veratrildeído e é o único produto da oxidação. Entretanto, sob condições anaeróbicas outros produtos são formados, incluindo duas quinonas e um produto da clivagem do anel aromático. Portanto, na presença de oxigênio as LiPs podem mediar a abertura do

anel aromático (Leisola & Waldner, 1988).

De acordo com Shin et al. (1997), embora ainda hoje não se conheça com precisão quais as enzimas que são capazes de degradar a lignina *in vivo*, dois grupos de peroxidases, a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), parecem estar associadas com a atividade ligninolítica. Essas enzimas têm sido extensivamente estudadas em *Phanerochaete chrysosporium* e outros fungos da podridão branca, tais como *Panus tigrinus*, *Panus brevispora*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera adusta* e *Phlebia ochraceofulva*.

Uma outra enzima, a lacase tem recebido considerável atenção nesses últimos 10 anos devido ao seu papel na degradação da lignina e aplicações potenciais na destoxificação de poluentes fenólicos (Kumaran et al., 1997). A lacase é uma polifenoloxidase e é produzida pelos fungos da podridão branca com exceção do *Phanerochaete chrysosporium* que produz pouca (Tuor et al., 1995) ou nenhuma atividade (Wood et al., 1988). O pH ótimo e temperatura para lacase bruta de *Pleurotus sajor-caju* foi de 6,0 e 50°C (Kumaran et al., 1997).

A lacase tem ampla especificidade para com o substrato. Esta enzima emprega o O₂ molecular como redutor e também oxida anéis fenólicos para radicais fenóxi. A lacase oxida compostos fenólicos por abstração de um elétron, com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar à despolimerização. A especificidade da enzima ao substrato depende da origem da lacase. Sua função fisiológica ainda não é clara e seu papel na biodegradação da lignina é incerto (Gold & Alic, 1993), contudo a lacase e a MnP devem agir complementarmente ou sinergisticamente.

A lacase é uma enzima de natureza glicoproteíca. A lacase de *Pleurotus ostreatus* é uma oxidase *o*-difenil que utiliza o guaiacol e o pirocatecol, sendo inativada por hidroquinona, resorcinol e tirosina; seu ponto isoelétrico é de 2,9 (Sannia et al., 1986). O pH ótimo para sua atividade depende do substrato; na presença de guaiacol e siringaldazina varia entre 5,0 – 6,0 e 6,0 – 7,0,

respectivamente. É uma enzima estável à várias temperaturas, mas a partir de 55°C sua atividade diminui (Palmieri et al., 1993).

Dentre os fungos da podridão branca produtores de lacases e outras ligninases encontram-se as espécies/linhagens de *Pleurotus*. Alguns estudos conduzidos com *Pleurotus ostreatus*, compilados por Rajarathnam & Bano (1988), mostram que os principais parâmetros culturais afetando a degradação da lignina por estes basidiomicetos são o substrato de crescimento, a fonte e a concentração de nitrogênio e as condições culturais. De um modo geral a carência de uma fonte externa de nitrogênio, temperatura de 25-30°C, disponibilidade de oxigênio e cultivo estático de *Pleurotus* spp, favorecem a degradação de lignina.

Agosin et al. (1985) estudaram vários fungos da podridão branca quanto à capacidade ligninolítica empregando a lignina radiomarcada (^{14}C -) de palha de trigo. *Pleurotus ostreatus* mostrou-se um degradador altamente específico da lignina. A produção de $^{14}\text{CO}_2$ foi maior quando a relação C/N foi de aproximadamente 80, o pH e a temperatura também mostraram ter influência. O pH ao redor de 5,6 e a temperatura entre 23-29°C foram os melhores para o crescimento deste fungo.

Commanday & Macy (1985) observaram que a degradação da lignina por *Pleurotus ostreatus* ocorreu em meio limitante em nitrogênio e foi três vezes maior que em meio contendo excesso. A fermentação em meio limitante em nitrogênio suplementado com glicose (0,3%) aumentou a atividade ligninolítica; a descoloração do corante polimérico aromático Poly R-481, em meio sólido foi também maior sob condições limitantes em nitrogênio. Estes efeitos também foram observados na atividade ligninolítica do *Phanerochaete chrysosporium*.

Kaal et al. (1995) estudaram cinco fungos da degradação branca, entre eles *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*, quanto a atividade ligninolítica, em meios não limitantes em nitrogênio e observaram alta atividade ligninolítica com exceção para a atividade de LiP de *P. chrysosporium*. A lacase presente em *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* bem como a MnP presente em todos os

fungos testados foram estimuladas na presença de meio suficiente em nitrogênio (peptona), inclusive nas culturas de *P. chrysosporium*. A atividade ligninolítica de *Pleurotus ostreatus* não foi suprimida quando pH do meio foi 6,5.

Waldner et al. (1988), comparando o sistema ligninolítico de vários basidiomicetos, demonstraram que são diferentes. *Phanerochaete chrysosporium* demonstrou a maior atividade de LiP e esta não foi detectada em *P. ostreatus*, embora a MnP estivesse sempre presente em ambos. O álcool veratril adicionado ao meio foi oxidado a veratrildeído por oxidases extracelulares.

Estudo conduzido por Kerem et al. (1992), com *Phanerochaete chrysosporium*, mostrou que a degradação da lignina por esse fungo está relacionada com a excreção de uma enzima chave, a LiP. No caso do *Pleurotus ostreatus* onde nenhuma atividade de LiP foi encontrada, a lacase foi a responsável. Uma alta atividade de lacase foi observada no início do período de degradação da lignina, observado também por Akhmedova (1994). De acordo com Kerem et al. (1992), a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como uma enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Outras enzimas de natureza oxidativa tal como as álcool veratril oxidases podem ter um papel importante na degradação da lignina.

Guillén et al. (1994) também não detectaram atividade de lignina peroxidase em *Pleurotus eryngii* cultivado sob condições idênticas ao *P. chrysosporium*. No entanto, uma oxidase – aril álcool oxidase, catalizando a reação do álcool veratril a veratrildeído foi encontrada.

A MnP foi implicada na degradação de lignocelulósicos tanto na fermentação sólida quando líquida. *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* produziram maior atividade ligninolítica quando Mn(II) foi adicionado ao meio (Kerem & Hadar, 1995; Camarero et al., 1996). Segundo Kerem & Hadar (1995), a maior degradação da lignina pode ser conseqüente tanto do aumento da atividade de enzimas ligninolíticas

quanto da produção Mn(III) que deve degradar preferencialmente as estruturas lignocelulósicas complexas. No caso do *P. pulmonarius* foi detectado uma alta atividade AAO (aril álcool oxidase) junto com a biosíntese de compostos anisil que atuaram como substratos para o sistema produtor de H₂O₂ necessário para a ação da MnP; de acordo com Camarero et al. (1996) essa enzima produz Mn(III) que (na forma de quelatos) pode participar no ataque de compostos fenólicos e não fenólicos.

A atividade de MnP e lacase de *Pleurotus* sp. crescido em meio líquido e em meio sólido (palha de trigo) foi estudado por Lang et al. (1996). Ambas as enzimas apresentaram alta atividade em meio líquido enriquecido com xarope de glicose; em meio sólido a atividade de lacase apresentou-se dez vezes menor e a maior atividade de MnP coincidiu com a mineralização do pireno. A lacase desempenhou um papel importante no início da degradação; o papel chave da LiP de *Phanerochaete chrysosporium* na biodegradação é executado pela MnP de *Pleurotus* sp. onde a atividade de LiPs não está presente (Lang et al., 1996).

Diferentes linhagens/espécies de *Pleurotus* mostram vários níveis de atividade de lacase. De quinze espécies investigadas quatro produziram a lacase mas a não tirosinase (Rajarathnam et al., 1992). A necessidade de oxigênio não está clara, pois é diferente dependendo da fermentação utilizada, se sólida ou líquida. Em geral na fermentação sólida as necessidades de ar não são limitantes (Kerem & Hadar, 1993); na fermentação líquida *Pleurotus ostreatus* degradou a lignina sob pressão atmosférica, a 100% de oxigênio a degradação foi limitada, e *P. cornicopiae* não cresceu (Agosin & Odier, 1985).

Dhaliwal et al. (1992) também observaram esse fenômeno em *Pleurotus florida*. A atividade de lacase foi afetada nas culturas em meio líquido sob agitação, promovendo distúrbios na formação de "pellets" levando a uma diminuição no crescimento e secreção da enzima; a palha de trigo (1% em meio líquido) aumentou a atividade de lacase, porém também a adição de glicose e lignina conduziram ao mesmo resultado.

Segundo Rajarathnam & Bano (1989), várias pesquisas descrevem a degradação de compostos modelos de lignina específicos radiomarcados (^{14}C -lignina) por diferentes espécies de *Pleurotus*. Entre o gênero *Pleurotus*, parece existir duas vias de degradação: (1) a via na qual a abertura do anel aromático ocorre em primeira instância e, (2) a via onde a demetilação ocorre antes da abertura do anel.

A atividade de degradação da lignina é aumentada pela presença da lignina ou algum composto de baixo peso molecular derivado da lignina. A ativação inclui um aumento na oxidação e na taxa de produção de H_2O_2 (Leisola & Fletcher, 1985). Akhmedova (1994) observou em meio líquido que a biossíntese de celulases, hemicelulases e ligninases (peroxidases, lacase) de *Pleurotus ostreatus* dependem da composição e da estrutura do material vegetal empregado como substrato no meio nutriente, e também do tempo de cultivo. Em geral, alta atividade enzimática de lacase e peroxidases foi observada quando o meio continha 1% de bagaço de torta de algodão. A lacase é detectada antes da peroxidase, mas há formação de ambas enzimas na fase exponencial e estacionária (Ardon et al., 1996).

Pleurotus flabellatus produz intensa reação de cor com a maioria dos compostos fenólicos mas não com a tirosina, relacionada ao sistema de enzimas oxidativas do tipo lacase responsável também pela descoloração de corantes poliméricos (Rajarathnam & Bano, 1989).

Segundo Banat et al. (1996), desde que a biodescoloração de resíduos líquidos e da polpa de papel, por *Phanerochaete chrysosporium* e *Tinctoria* sp, foi relatada no início dos anos 80, vários estudos têm sido conduzidos na remoção de corantes e, tem-se atribuído, até então, descoloração de corantes poliméricos, por fungos da podridão branca, pelas enzimas lignina peroxidases (LiPs), as peroxidases dependente de manganês (MnPs) e lacases.

A descoloração de três corantes poliméricos Polymeric B-411, Polymeric R-481 e Polymeric Y-606 por *P. chrysosporium* foi confirmada por Glenn & Gold (1983). Seus resultados sugerem que a descoloração foi resultado de atividade do

metabolismo secundário ligado à atividade de degradação ligninolítica do fungo. O processo, entretanto, foi lento e a descoloração ótima precisou de mais de 8 dias; assim como na degradação da lignina a descoloração foi suprimida nas culturas crescidas a altas concentrações de nitrogênio e mostrou-se dependente da concentração de oxigênio no meio; à atmosfera de 100% de oxigênio o sistema degradador dos corantes foi de 2 a 3 vezes maior que nas culturas aeradas. A concentração dos corantes empregada em meio líquido (pH 4,5) foi de 0,02%.

Platt et al. (1985) estudaram a descoloração do corante "poly-blue" (polivinalanina antraquinona sulfonada) por vários fungos degradadores da lignina. Entre eles o *Pleurotus* sp. "florida" demonstrou capacidade de descolorir o corante, na concentração de 0,02%, tanto em meio líquido quanto em meio sólido. A capacidade de descoloração desenvolveu-se na ausência do corante mas, somente quando o fungo foi previamente cultivado em substrato contendo lignina (palha de algodão). Os resultados obtidos sugerem que a capacidade de descolorir não está relacionada diretamente à produção da lacase embora possa estar ligado a outros processos conectados com a produção dessa enzima. Nas condições desse estudo mudanças na concentração de glicose e nitrogênio no meio não exerceram efeito sobre a capacidade de descoloração. Em meio sólido e líquido a descoloração por esse *Pleurotus* ocorreu de imediato, enquanto que com o *Phanerochaete chrysosporium* somente após crescimento até as bordas da placa; fato relacionado pelos pesquisadores ao efeito repressivo dos teores de nitrogênio (20 mM) no meio para este último fungo.

P. chrysosporium também biodegradou os corantes azo e os corantes heterocíclicos Orange II, Tropaeolin O, Congo Red e Azure B (Cripps et al., 1990). A extensão de remoção da cor variou dependendo da complexidade do corante, disponibilidade de nitrogênio no meio e atividade ligninolítica da cultura e, esteve relacionada ao metabolismo secundário. A baixas concentrações de nitrogênio (1,2 mM) 90% da cor foi removida nas primeiras 6 h, enquanto que com excesso de nitrogênio (12mM) foram necessários mais de 5 dias para alcançar 63-93% de descoloração dos corantes acima mencionados. A capacidade de descoloração

também dependeu da concentração de oxigênio no meio líquido e foi suprimida por inibidores da atividade ligninolítica tais como KCN, tiouréia e azida, e não ocorreu na ausência de atividade de lignina peroxidase. Nas culturas não ligninolíticas, onde houve falta da veratril álcool oxidase, a descoloração não ocorreu e houve adsorção dos corantes ao micélio. A depleção de carbono (glicose), conhecida como indutora do metabolismo secundário e da produção de lignina peroxidase, mostrou-se responsável pelo processo de descoloração. No entanto, os corantes na presença de ligninas peroxidases purificadas sofreram um processo de descoloração, em alguns casos, de menor extensão que quando na presença do fungo e apresentaram outros metabólitos secundários. Os autores concluíram que embora as ligninas peroxidases estejam envolvidas na degradação desses corantes azo e heterocíclicos, inúmeras outras enzimas ou sistemas enzimáticos além das ligninas peroxidases, expressos no metabolismo secundário, estão envolvidos com a quebra desses corantes.

Outros estudos realizados com *P. chrysosporium* sugerem que a mineralização do corante parece estar ligada à classe dos mesmos. Os corantes reativos, dispersos, sulfonados e os "vat" (que inclui "indigo blue"), foram descoloridos enquanto que os corantes da classe "naphtol" e ácidos não. Também a capacidade biodegradativa deste fungo é devida, pelo menos em parte, a um sistema de degradação da lignina não-específica desse fungo. A observação que outros fungos da degradação branca (*Myrothecium* spp. e *Ganoderma* spp.) degradam os corantes azo sugerem que essa capacidade pode estar amplamente difundida entre esse grupo de fungos (Bumpus, 1995).

Os corantes azo, são a classe de corantes mais usadas comercialmente e não são prontamente degradados pelos microrganismos. Os azo ácidos são caracterizados pela presença de um grupo azo ligado ao anel aromático que em adição carregam um grupamento do ácido sulfônico. Esses compostos são empregados para colorir e estampar fibras têxteis naturais e sintéticas, couro, forrações, papel, etc. Os grupo sulfo e azo não ocorrem naturalmente, portanto os corantes azo sulfonados são considerados recalcitrantes (Paszczynski et al., 1992).

Paszczynski et al. (1992) estudaram a mineralização de corantes radiomarcados no anel aromático contendo grupos sulfônicos e grupos sulfo e azo por *Streptomyces chromofuscus* e *P. chrysosporium*. Ambos promoveram a descoloração dos corantes, porém o fungo demonstrou maior capacidade mineralizando os corantes. O sistema enzimático observado na bactéria parece ser mais seletivo às estruturas e ligações do sistema enzimático do fungo. O fungo mineralizou todos os corantes azo sulfonados mas houve variação na taxa de mineralização dependendo da complexidade da molécula. As peroxidases foram responsáveis pelas transformações iniciais dos corantes azo. Foi observado também um efeito do álcool veratril na oxidação dos corantes pelas ligninases fúngicas. Outros estudos, compilados por Bumpus (1995), mostraram que a degradação dos corantes azo ocorre devido a uma reação de oxidação mediada por ligninas peroxidases e/ou manganês peroxidases que são secretadas pelos fungos da degradação branca durante o metabolismo secundário.

A substituição com grupos sulfonados nos componentes aromáticos de alguns corantes azo pareceram não afetar a biodegradabilidade dos corantes azo pelos fungos da podridão branca (Paszczynski et al., 1992; Pasti-Grigsby et al., 1992). Em contraste, mostrou-se que anéis aromáticos de corantes substituídos por funções hidroxil, amino, acetomido ou nitro, sofrem uma maior mineralização do que os corantes sem anéis substituídos (Banat et al., 1996).

Uma série de outros corantes também foi testada a várias concentrações e estes foram descoloridos pelo *P. chrysosporium*, particularmente quando o álcool veratril estava presente no meio. Acredita-se que o álcool veratril estimula a atividade das ligninases, que aparentemente estão ligadas à descoloração. A degradação de dezoito corantes azo usando *P. chrysosporium* e somente oito foram degradados, com 40-70% de remoção da cor. Essa degradação foi, principalmente, devido ao sistema enzimático degradador da lignina ou por adsorção desses à massa celular (Banat et al., 1996).

A descoloração do Poly R-478, um corante polimérico indicador da atividade

de fenoloxidasas, foi estudada como método potencial para separar os fungos degradadores da lignina dos não aptos. Em meio sólido, a descoloração ocorreu mais lentamente que o crescimento radial, indicando que as enzimas de descoloração estão associadas às hifas em crescimento e às desenvolvidas. As linhagens de uma mesma espécie diferiram na sua capacidade de descolorir mas, se alcançada, não houve diferenças entre os monocariotos e os dicariotos de uma mesma espécie. Uma elevação da temperatura de 20°C para 40°C aumentou a taxa de descoloração porém em menor proporção que a taxa de crescimento. Os estudos em meio líquido sugerem que os sistemas enzimáticos, presentes nos diferentes fungos estudados, envolvidos com a descoloração deste corante específico, não estão relacionados somente a uma interação simples entre a MnP ou LiP, outras fenoloxidasas não específicas bem como a lacase parecem estar envolvidas (Freitag & Morrell, 1992).

Dey et al. (1994) compararam a produção de enzimas extracelulares de um fungo da podridão marrom da madeira *Polyporus ostreiformis* em relação à de *P. chrysosporium* e concluíram que as enzimas LiP e MnP estavam implicadas na descoloração do corante Congo red. As concentrações empregadas com o corante azo Congo red e tiazina azul de metileno foram de 0,003% e 0,005%, respectivamente, em meio líquido e sólido. Embora o *P. chrysosporium* tenha sido cerca de três vezes mais eficiente que o *P. ostreiformis* na remoção da lignina, o *P. ostreiformis* foi mais eficiente na descoloração do Congo red que, segundo os autores, foi devido a alta atividade de MnP do fungo.

Kirby et al. (1995) estudaram a descoloração de um efluente têxtil artificial por *P. chrysosporium*. O papel da lignina peroxidase também não ficou claro, pois somente pouca atividade da enzima foi detectada no processo de descoloração dos vários corantes sintéticos estudados separadamente e misturados (efluente artificial). Nesse estudo a concentração dos corantes foi de 0,5g.L⁻¹; na presença de glicose (10g.L⁻¹) seis dos corantes testados foram descoloridos enquanto que na ausência apenas três. Os resultados sugerem que uma fonte primária de carbono, tal como a glicose, é essencial para uma descoloração extensiva do corante, no entanto alguns corantes puderam ser metabolizados como única fonte de carbono e energia por

P. chrysosporium.

Knapp et al. (1995), ao estudarem a descoloração de corantes por basidiomicetos causadores da podridão da madeira, concluíram que todos os isolados descoloriram alguns corantes, e todos os corantes foram descoloridos em alguma extensão. A eficiência de remoção da cor variou de 100% a 50%. Algumas descolorações foram extremamente rápidas. Nenhum isolado mostrou-se eficiente para todos os corantes, e alguns foram ineficientes na maioria dos testes. *Phanerochaete chrysosporium* esteve entre os menos efetivos dos isolados. O sistema de "screening", que não foi otimizado, empregou micélio pré-crescido em extrato de malte suplementado com uma fonte de energia (glicose, 15g.L^{-1}), acrescido do corante. Estudou-se a capacidade de sete isolados em descolorir 14 corantes das mais variadas estruturas. Os resultados da máxima descoloração foram apresentados como o percentual de diminuição na absorvância do pico principal de absorvância da luz visível. Quando a adsorção ocorreu o exame do espectro de absorção da luz revelou que todos os picos tinham diminuindo proporcionalmente em igualdade entre si. Entretanto, quando a degradação ocorreu houve a completa remoção do pico principal ou mudança significativa no espectro (isto é, uma mudança na absorbância relativa a dois picos ou desenvolvimento de um novo pico). A adsorção do corante também foi evidente a partir da inspeção da massa micelial; aqueles fungos que adsorveram os corantes apresentaram massa micelial densamente colorida, enquanto que aqueles que causaram degradação apresentaram massa micelial branca. Todos os fungos testados acidificaram o meio, com pH normalmente declinando para 4-5, no entanto, o pH não teve efeito nos corantes ou em seu espectro de adsorção.

Alguns corantes foram altamente resistentes à descoloração, enquanto outros, como o índigo carmina, foram rapidamente descoloridos pela maioria dos isolados. Crisofenina foi o corante mais resistente, seguido do amarelo clorazol, porém este foi degradado (96%) apenas por *Pleurotus ostreatus* contra 46% por *P. chrysosporium*; ambos são azo corantes com base estilbena (Knapp et al., 1995).

Pasti-Grigsby et al. (1992) mostraram que a natureza e a posição de substituintes em um dos anéis aromáticos de corantes azo podem influenciar a descoloração. Eles também demonstraram que as enzimas ligninase e manganês peroxidase diferem em termos de sua capacidade em degradar diferentes corantes. No estudo realizado por Knapp et al. (1995), *Pleurotus ostreatus* foi capaz de descolorir em 100% o indigo carmina, o vermelho reativo 4, o laranja II, o verde brilhante contra somente 21% de crisofenina. A correlação entre a descoloração com a atividade de lignina peroxidase não foi possível ser estabelecida, no entanto, os autores concluem que o sistema ligninolítico está envolvido.

Culturas ligninolíticas de inúmeros fungos causadores da podridão branca da madeira têm sido documentadas pela sua capacidade de degradar e descolorir vários corantes. O envolvimento de MnP e LiP foi demonstrado na via de degradação de alguns dos corantes. Entretanto, espera-se que os fungos da degradação branca sejam diferentes na sua habilidade e capacidade de degradar corantes com base nas suas diferenças qualitativas e quantitativas na produção dessas enzimas. Tais corantes também podem oferecer formas para diferenciação entre atividades enzimáticas de peroxidases específicas lignolíticas (Vyas & Molitoris, 1995).

O corante "Remazol Brilliant Blue R" (RBBR) é um corante industrial importante e é usado frequentemente como um material iniciador na síntese de produção de corantes poliméricos. O RBBR, um derivado do antraceno, representa uma classe importante de organopoluentes recalcitrantes e tóxicos. Estruturalmente parece-se com certos compostos aromáticos policíclicos que são substratos de peroxidases ligninolíticas (Vyas & Molitoris, 1995).

Thorne (1993) propôs o emprego do complexo celulose-RBBR para detectar tanto a atividade ligninolítica quanto celulolítica de microrganismos com base na quebra e descoloração do RBBR. A descoloração do RBBR também foi atribuída à atividade de LiP produzida por *Phanerochaete chrysosporium*. No entanto, da seleção de basidiomicetos, onde foi testada a atividade ligninolítica desses, espécies de *Pleurotus* descoloriram o RBBR mesmo sem produzir LiP (Vyas & Molitoris, 1995).

Conseqüentemente, Vyas & Molitoris (1995), investigaram a atividade ligninolítica do *Pleurotus ostreatus* implicado na descoloração do RBBR, na presença e ausência do corante, em palha de trigo. Durante a fermentação sólida em palha de trigo, *P. ostreatus* produziu atividades de MnP, MIP (peroxidase independente do manganês) e lacase. Produziu também uma enzima extracelular que necessita de peróxido de hidrogênio para descolorir o RBBR. Atividades de LiP e VAO (veratril álcool oxidase) não foram detectadas. Esta atividade enzimática que foi desenvolvida na ausência do corante, descoloriu completamente o corante *in vitro* (meio líquido contendo o extrato das enzimas da fermentação sólida). A atividade enzimática foi máxima nos valores de pH entre 3.5 a 4.0. Essa atividade foi independente do manganês e o álcool veratril não teve influência. A manganês peroxidase de *P. ostreatus* não descoloriu o RBBR. Este sistema enzimático de descoloração do RBBR dependente de peróxido de hidrogênio comportou-se como uma oxigenase possuindo um centro metálico catalítico, talvez heme, porque foi inibido por $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, NaCN, NaN_3 , e depleção de oxigênio dissolvido e cisteína. Concentrações de peróxido de hidrogênio mais altas que 154 mM foram observadas serem inibitórias. A descoloração do RBBR por *P. ostreatus* segundo Vyas & Molitoris (1995), é um processo oxidativo. Desta forma, concluíram que o fungo da podridão branca *P. ostreatus* tem uma atividade enzimática extracelular descolorante do RBBR que necessita da presença de H_2O_2 , juntamente com MnP, peroxidase independente de manganês, e atividades de fenol oxidases durante a fermentação sólida de palha de trigo. Eles sugeriram que a atividade enzimática descolorante do RBBR pareceu ser uma atividade ligninolítica não descrita e que pode ter um papel importante na degradação da lignina e xenobióticos.

Recentemente, Shin et al. (1997) observaram atividade enzimática de descoloração do RBBR dependente da presença de H_2O_2 em filtrados de cultura de *P. ostreatus* em meio quimicamente definido e sugeriram que uma outra peroxidase está envolvida na descoloração do RBBR.

Na descoloração do RBBR por *Pycnoporus cinnabarianus* as fenoloxidasas

(lacases) catalizaram o processo. Esta atividade ocorreu paralelamente à depleção de nitrogênio e carbono, e sucessivas adições de glicose levaram a um segundo pico de atividade da lacase durante a incubação. A extensão da mineralização não foi determinada (Schliephake & Lonergan, 1996).

De acordo com Shin et al. (1997), *Pleurotus* produz um outro tipo de peroxidase extracelular (PoP) e glicose oxidase bem como um sistema gerador de H_2O_2 . A especificidade de PoP ao substrato parece ser similar àquela da MnP que não pode oxidar compostos não fenólicos, mas não é dependente da atividade catalítica do manganês. A correlação entre a degradação da lignina e a descoloração do RBBR foi demonstrada.

Shin et al. (1997) estudaram em meio líquido quimicamente definido a presença e caracterização desta peroxidase extracelular (Pop). Verificou-se que essa enzima extracelular dependente de H_2O_2 está implicada na descoloração do RBBR. A atividade enzimática foi máxima na idiofase, e a relação C/N foi de 24. Altas concentrações de C/N reprimiram a atividade enzimática, e a adição de álcool veratril não teve nenhum efeito na produção da enzima. A atividade ótima da enzima foi a pH 3.0 a 3.5 e 25°C. A enzima mostrou afinidade com vários compostos fenólicos e corantes artificiais, e foi inibida por $Na_2S_2O_5$, NaN_3 , e cisteína. O espectro de absorção da enzima foi máximo a 407,510 e 640 nm. A adição de H_2O_2 ao meio contendo a enzima resultou em uma diminuição na absorbância a 407 e 510 nm. Essa peroxidase tem alta afinidade com compostos fenólicos contendo grupos dimetoxil e *p*-hidroxil diretamente ligados ao anel benzênico, tais como ácido sinapínico e siringico. Entretanto, a enzima não oxida o álcool veratril, que é um substrato bem conhecido da LiP. Também, essa peroxidase não mostra afinidade por compostos não fenólicos, os quais estão diretamente relacionados com a LiP. Entre os corantes testados, a enzima mostrou maior afinidade ao corante cristal violeta trifenilmetano.

Young & Yu (1997) examinaram e compararam oito corantes incluindo índigo, outros complexados com metal, antraquinona e azo por *P. chrysosporium* e *Trametes*

versicolor. Inúmeros fatores que podem afetar a degradabilidade do corante nos sistemas fúngicos também foram investigados, comparando-se com enzimas puras. Os autores concluíram que o fungo *P. chrysosporium* é um degradador versátil de corantes sintéticos de várias estruturas químicas e que a descoloração da cor é catalisada, principalmente, por ligninases e não por peroxidases dependente de manganês; tais corantes foram descoloridos mais eficientemente sob condições ácidas (pH 3.5-5), com 1mM de álcool veratril e alta concentração de peróxido de hidrogênio (0.2 ou 0.8 mM), dependendo da estrutura do corante. Embora uma alta concentração de álcool veratril não cause danos à remoção da cor, uma alta concentração de peróxido de hidrogênio reduz consideravelmente a eficiência de remoção da cor em alguns corantes; corantes com diferentes estruturas são descoloridos à diferentes taxas intrínsecas enzimáticas e altas concentrações de corante resultam em menores taxas de descoloração, em geral. A concentração de corante acima da qual efeitos negativos foram observados variou de 10 a 125 mg.L⁻¹, dependendo da estrutura do corante.

Os resultados indicaram que um bioprocessamento eficiente empregando-se basidiomicetos para remoção da cor de efluentes industriais devem produzir ligninases, H₂O₂, álcool veratril continuamente e coordenadamente sob condições ácidas e controladas. Informações sobre a importância da co-produção de peroxidases, peróxido de hidrogênio e álcool veratril pelas células destes fungos são essenciais para delinear-se um bioprocessamento na descoloração de corantes sintéticos (Young & Yu, 1997).

Rodrigues et al. (1999) estudaram vários fungos da degradação branca na descoloração de 23 corantes industriais. Todas as linhagens de *Pleurotus ostreatus* exibiram alta atividade de lacase e manganês peroxidase. As culturas cultivadas em grãos integrais de aveia mostraram maiores produções de lacase e MnP quando comparadas ao crescimento em meio líquido e, somente a atividade de lacase correlacionou-se com a descoloração dos extratos brutos.

Outros estudos com lacases de vários basidiomicetos têm demonstrado que o

processo de descoloração de corantes industriais é decorrente da presença dessa enzima, no entanto para descoloração do corante índigo e corantes azo há necessidade da presença de metabólitos tais como 2,2'-azino-bis(3-etiazolina-6-sulfonato) ou ABTS e o corante antraquinona que podem mediar a descoloração daqueles corantes (Wong & Yu, 1999) assim como hidroxibenzotriazol como radical mediador livre (Reyes et al., 1999).

Swamy & Ramsay (1999a) estudaram cinco espécies de fungos da podridão branca na descoloração do amaranço, remazol black B, remazol orange, remazol brilliant blue, reactive blue e treopeolin O em placas. *Bjerkandera* sp BO55, *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor* foram os melhores na descoloração. Em meio de cultura aquoso, as três culturas formaram massa micelial que descoloriram, porém, pelo menos em parte, com adsorção ao micélio. No caso da descoloração do amaranço por *Trametes versicolor* a descoloração se deu devido à presença de lacase e MnP e, a limitação em nitrogênio favoreceu a expressão da atividade ligninolítica.

Estudos preliminares, realizados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA (Campus da USP, em Piracicaba), empregando basidiomicetos, entre os quais uma espécie de *Pleurotus*, puderam constatar a descoloração do corante índigo empregado no tingimento do "blue jeans" (Balan, 1998). Esse corante permanece presente no resíduo líquido e no lodo residual após tratamento pelo processo de lodo ativado de efluentes de uma indústria têxtil da região de Americana-SP. Nesses resíduos além da presença do corante índigo tem-se a presença do corante preto enxofre, microrganismos e sais minerais. O lodo residual é disposto em aterros sanitários controlados, ou incinerados (Boletim ETAD, 1995), e em alguns casos são dispostos em lagoas até secagem.

Embora a capacidade de degradação e produção de enzimas pelos fungos da degradação branca venha sendo extensivamente estudada em meio líquido, poucos autores têm estudado a produção e atividade de enzimas durante a fermentação sólida, um processo natural de crescimento de tais fungos (Lang et al., 1996). Alguns

estudos demonstraram que os fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus* são capazes de metabolizar a atrazina, o pentaclorofenol e o antraceno, em meio de cultura líquido.

A fermentação sólida é um processo onde o substrato insolúvel é fermentado com umidade suficiente mas sem água livre. A fermentação no estado líquido, por outro lado, é um processo onde o substrato está solubilizado ou em suspensão num certo volume de água. No processo de fermentação sólida o microrganismo não somente cresce na superfície do substrato mas também tem a capacidade de penetrar no substrato e até mesmo nas células do lúmen (resíduos agroindustriais, tais como palhas e bagaços). A produção de cogumelo na fermentação sólida é um dos processos microbiológicos mais antigos conhecidos pelo homem; por esse processo pode-se citar algumas vantagens na biotransformação de lignocelulósicos tais como melhora na quantidade de proteína e digestibilidade além da produção de outros compostos úteis para indústria (Chahal, 1991).

A fermentação sólida necessita de menos gasto de energia do que na líquida, tornando seu potencial de aplicação de maior interesse. Além disso a degradação da lignina é afetada por condições culturais, entre as quais a aeração que é de grande importância (Kerem et al., 1992).

Entre outras vantagens que a fermentação sólida oferece em relação à fermentação submersa estão: menores volumes para fermentação onde não há excesso de água, baixos custos de energia para esterilização, fácil aeração, além de ser um ambiente natural para os fungos da degradação da lignina e um ambiente menos favorável para muitas bactérias (Rajarithnam et al., 1992). Por outro lado a fermentação em meio líquido tem uma vantagem em relação à fermentação em meio sólido quando se pretende caracterizar o efeito dos substratos na atividade exocelular, pois as enzimas são mais facilmente detectadas (Masaphy & Levanon, 1992).

Os fatores que influenciam a degradação e sua variabilidade entre espécies

idênticas ou não se relacionam às diferentes capacidades que uma espécie/linhagem de *Pleurotus* tem, sendo em último caso atribuído à interação entre genoma (material genético hereditário) e fatores ambientais - físicos, químicos e biológicos (Rajarithnam et al., 1992).

Atualmente, as espécies comestíveis de *Pleurotus* têm sido largamente estudadas devido à capacidade destas em crescerem numa ampla variedade de materiais agroindustriais lignocelulósicos, com produção de cogumelos sem a necessidade de fermentação prévia do substrato como ocorre no caso do *Agaricus bisporus* e *A. bitorquis*, cogumelos comestíveis mais cultivados. Em comparação ao *Lentinula edodes*, outro cogumelo comestível bastante cultivado, a capacidade da taxa de bioconversão das espécies de *Pleurotus* é maior (Rajarithnam & Bano, 1989).

Sendo o cultivo de cogumelos comestíveis um dos processos de bioconversão mais economicamente viáveis na bioconversão de resíduos lignocelulósicos Buswell et al. (1996) estudaram três tipos de cogumelos, mais cultivados comercialmente, *Lentinula edodes*, *Volvarellia volvacea* e *Pleurotus sajor-caju*, os quais exibem habilidades variadas na utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato de crescimento. Uma avaliação das principais enzimas lignocelulolíticas envolvidas mostrou uma diversidade qualitativa entre esses cogumelos. *P. sajor-caju* mostrou-se, das três espécies, a mais adaptada, podendo crescer numa grande variedade de resíduos agrícolas de diferentes composições em termos da razão entre polissacarídeo/lignina. Nas condições adotadas nesse estudo a MnP não se mostrou tão importante na degradação dos materiais quanto a lacase para o *P. sajor-caju*; nenhuma atividade de LiP foi detectada, no entanto, duas veratril oxidases parecem ter um papel importante na degradação da lignina entre as principais enzimas.

Diferenças entre as quantidades de enzimas produzidas e atividade das mesmas foram observadas quando espécies de *Pleurotus* foram crescidas em meio líquido e sólido (Lang et al., 1996). A degradação da lignina de talos de algodão foi mais seletiva em culturas de *Pleurotus ostreatus* do que em culturas de

Phanerochaete chrysosporium (Kerem et al., 1992). Kerem & Hadar (1993) observaram que a necessidade de oxigênio na fermentação sólida não é essencial, para *Pleurotus ostreatus* a presença de CO₂ manifestou-se importante para o crescimento. Essa condição é observada durante o cultivo de cogumelos comestíveis no período correspondente à colonização do substrato e a alta atividade ligninolítica (Rajarathnam et al., 1992).

Segundo Lang et al. (1996), há poucas publicações sobre a degradação de xenobióticos misturados com material lignocelulósico, o substrato natural dos fungos degradadores da madeira. No entanto, esses pesquisadores observaram a mineralização de pireno radiomarcado incorporado à palha de trigo inoculada com *Pleurotus* sp., fato considerado significativo para estudos de remediação de solos.

Exemplos do emprego de resíduos industriais utilizados tanto na fermentação líquida quanto sólida têm sido mostrados na literatura científica.

A possibilidade do emprego de resíduos industriais para o cultivo de *Pleurotus* spp. foi exemplificada por Tautorius (1985) e Rajarathnam et al. (1992). A polpa e os resíduos da fabricação do papel são exemplos de resíduos celulósicos que são dispostos no ambiente ocasionando problemas ambientais e poluição das terras. A produção do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* foi observada empregando-se como substrato de cultivo uma mistura do lodo da polpa de celulose (obtida termoquimicamente bem como pelo processo kraft) com os resíduos da indústria da maçã.

Sanjust et al. (1991) estudaram três espécies de *Pleurotus* na degradação de resíduos aquosos da indústria de azeitonas. Esse resíduo é particularmente rico em compostos fenólicos relacionados à lignina os quais são também substratos para atuação da lacase. As três espécies estudadas cresceram satisfatoriamente nesse resíduo, particularmente *P. ostreatus* e *P. floridae*, que produziram grandes quantidades de lacase extracelular com concomitante destruição dos compostos fenólicos presentes. Os autores notaram também que o odor desagradável inicial do

resíduo foi substituído por um odor agradável no final da fermentação.

Outros resíduos industriais potenciais são citados por Rajarathnam et al. (1992), tais como bagaço de citronela (utilizada para extração de óleos essenciais), restos da extração do linho, casca de laranja e resíduos da destilaria de uvas.

Um outro aspecto que vêm sendo pesquisado é o emprego dos substratos residuais do cultivo desses cogumelos. Em geral, os resíduos lignocelulósicos tornam-se mais solúveis, contendo altas quantidades de açúcares livres, menor quantidade de lignina, uma estrutura celulósica com menor polimerização, aumento no teor de cinzas e presença de várias enzimas. Entre as pesquisas realizadas sugere-se que este substrato residual possa ser empregado na alimentação animal, geração de biogás e diretamente como adubo orgânico para produção de vegetais (Agosin & Odier, 1985; Rajarathnam & Bano, 1989) e remediação de solos (Lang et al., 1996).

Além dos resíduos agroindustriais normalmente pesquisados (palha de trigo e resíduos do algodão) e que tem potencial ou vêm sendo utilizados comercialmente na produção de cogumelos citam-se: as palhas de cereais outras além do trigo, resíduos de leguminosas e de sementes de oleaginosas, outros incluem resíduos agroindustriais como a polpa de café, o bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho (Rajarathnam et al., 1992; Ragunathan et al., 1996).

A possibilidade de utilização de vários resíduos evidenciando o caráter ecológico na melhora ambiental com um ciclo de vida na produção de cogumelos menor e com maior potencial de bioconversão têm ocasionado a maior difusão do cultivo de *Pleurotus* spp., bem como o aumento de seu consumo em todo o mundo. No Brasil esse cogumelo vem sendo cultivado em bagaço de cana oriundo das usinas, não necessitando de fermentação prévia, devido a baixa concentração em açúcares (Bononi et al., 1995). Outro material lignocelulósico empregado para o cultivo de *Pleurotus* spp. com sucesso foi a folha da bananeira seca senescente (Sturion, 1994).

Das considerações acima descritas pode-se, com a descoloração do resíduo líquido de efluentes das indústrias têxteis por ação das enzimas de *Pleurotus* spp., melhorar a descarga poluente referente à presença dos corantes. O emprego desse gênero de fungo da podridão branca justifica-se pela sua capacidade biodegradativa com a produção de várias enzimas hidrolíticas e oxidativas além de apresentar inúmeras espécies (a maioria comestíveis) largamente difundidas em todo o planeta, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Rajarathnam & Bano, 1989; Rajarathnam et al., 1992).

Ainda o emprego do lodo residual como substrato misturado ou não a resíduos lignocelulósicos pode conduzir a mineralização dos corantes e, pelo processo biodegradativo obter-se um material com potencial de aplicação para remediação de solos e/ou fertilizante. Ainda se misturados a resíduos lignocelulósicos, produzidos em grande quantidade, pode-se contribuir também com o aproveitamento desses que já vem sendo proposto e utilizado na produção de cogumelos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Espécies/linhagens de fungos:

Foram empregadas 14 espécies/linhagens de fungos do gênero *Pleurotus*, a saber: *Pleurotus ostreatus* (POS 98/33, origem São Roque), *P. ostreatus* (POS 98/37, origem São Paulo), *P. ostreatus* (POS 98/36, origem Brasília) e *P. sajor-caju* (PSC 94/03) doadas pela Área de Biotecnologia e Microbiologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu - SP; *P. ostreatoroseus* Sing. (CCB 016, origem São Paulo), *Pleurotus* sp (CCB 068, origem Mogi das Cruzes), *Pleurotus flabellatus* (CCB 394, origem Ribeirão Grande), *P. cf flabellatus* (CCB 396, origem Ribeirão Grande), *Pleurotus* sp (CCB 507, origem Ribeirão Pires), *Pleurotus* sp (CCB 517, origem

Ilha do Cardoso), *P. sajor-caju* (CCB 020), *P. sp* "Florida" (CCB 001) e *P. ostreatoroseus* (CCB 440) doadas pela Coleção de Culturas de Basidiomicetos da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica; e, *Pleurotus sp* (origem Tailândia) doada pelo Departamento de Fitopatologia da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - Campus Piracicaba - SP.

4.1.2. Corantes têxteis

Foram empregados os corantes *índigo* (*Índigo* BAN 30) em solução aquosa 30% e preto enxofre (Preto Enxofre "ready to use" - SODYESUL ECO IV) em solução aquosa 30%, cedidos pela indústria têxtil na forma em que esta os adquire. A concentração empregada, em ambos os casos, foi de 0,02%, (p/v). O corante polimérico Remazol Brilliant Blue R - RBBR (C.I. 61200; Reactive Blue 19, Sigma R-8001) foi empregado na mesma concentração, em meio sólido.

4.1.3. Meios de cultura

Todos os meios de cultura foram empregados após esterilização à 121°C por 15 minutos.

4.1.3.1. MEA (malte extrato de levedura ágar)

extrato de Malte	20,0 g
extrato de levedura	2,0 g
ágar.....	20,0 g
água destilada q.s.p.	1 L

4.1.3.2. Meio mínimo para fungos (Pontecorvo et al. , 1953)

NaNO ₃	6,0000 g
KH ₂ PO ₄	1,5000 g
KCL	0,5000 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5000 g
FeSO ₄	0,0001 g
ZnSO ₄	0,0001 g
glicose	10,0000 g
água destilada q.s.p.	1 L
pH	6,8

Este meio foi empregado como base para o teste com o corante RBBR em meio sólido acrescido de ágar (15 g.L⁻¹). Também foi usado como meio de cultura líquido, acrescido dos corantes presentes na mesma proporção que em meio sólido (0,02%, p/v), como única fonte de carbono. Variações na concentração de nitrogênio - 6 g e 0,6 g de NaNO₃ foram estudadas, em meio líquido, para uma das melhores espécies/linhagens.

4.1.3.3. Malte 0,5%

extrato de malte.....	0,50 g
ágar	20,0 g
água destilada q.s.p.....	1 L

Quando empregado em meio líquido esse foi preparado sem o acréscimo de ágar.

4.1.3.4. Malte 0,5% acrescido de bagaço de cana

extrato de malte.....	0,50 g
bagaço de cana	10,0 g (p.s.)

ágar 20,0 g
água destilada q.s.p..... 1 L

4.1.3.5. Meio líquido basal (Commanday & Macy, 1985)

glicose.....0,3 g
KH₂PO₄.....5,0 g
CaCl₂.2H₂O.....0,2 g
MgSO₄.....0,5 g
minerais traço.....20 mL/L
vitaminas.....20
água destilada.....1 L

- minerais traço: preparou-se uma solução contendo os seguintes minerais em 1 litro de água destilada: CuSO₄.5H₂O - 0,2g; ZnSO₄.7H₂O - 0,1 g; MnCl₂.H₂O - 0,1 g; molibdato de sódio - 0,05 g; EDTA Na - 0,6 g; FeSO₄.7H₂O - 1,0 g.
- vitaminas: preparou-se uma solução contendo as seguintes vitaminas em 100 mL de água destilada: HCl piridoxina - 10 mg; riboflavina - 10 mg; tiamina.HCl - 10 mg; nicotinamida - 10 mg; pantotenato -D-cálcio - 10 mg; ácido para-aminobenzóico PABA - 0,5 mg; ácido fólico - 0,25 mg; biotina - 0,26 mg; B12 - 0,025 mg.

Este meio foi empregado para testar, em cultivo estático, a descoloração na presença de corante índigo como única fonte de carbono na concentração de 0,02% (p/v).

4.1.4. Ensaio de biodegradabilidade imediata

Realizado com base na metodologia descrita pelo IBAMA (1990).

4.1.4.1. Solução nutriente:

A solução nutriente foi preparada adicionando-se para cada litro, 1 mL de cada uma das soluções estoque descritas a seguir:

- solução de fosfato de amônio: K_2HPO_4 (21,74 g); KH_2PO_4 (8,5 g); $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (33,4 g); NH_4Cl (20 g); dissolvidos em água completando-se o volume para 1 litro e pH ajustado a 7,2.
- sulfato de magnésio: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a $22,5 \text{ g} \cdot L^{-1}$, em água.
- cloreto de cálcio: $CaCl_2$ a $27,5 \text{ g} \cdot L^{-1}$, em água.
- cloreto férrico: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ a $2,5 \text{ g} \cdot L^{-1}$, em água.
- solução de elementos traço: $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ (39,9 mg); H_3BO_3 (57,2 mg); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (42,8 mg); $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (34,7 mg); $FeCl_3 \cdot EDTA$ (100 mg); dissolvidos em água completando-se o volume para 1 litro, sendo esterilizado a $120^\circ C/20$ minutos.
- solução fonte de vitaminas: solução de extrato de levedura a 150 mg/L, em água.

4.1.4.2. Solução padrão biodegradável: glicose $C_6H_{12}O_6$, peso molecular de 180; 0,400 g C; $CO_2 - t$ de 1,466 mg/mg. Preparou-se 1 g C/L ou 3,666 g $CO_2 - t/L$, em solução nutriente para proporcionar concentrações de 20 mg C/L ou 72,32 mg $CO_2 - t/L$.

4.1.4.3. Solução das substâncias teste: a partir da solução de corante a 3% pipetou-se uma alíquota necessária para obter-se uma concentração de 20 mg C/L ou 73,32 mg $CO_2 - t/L$.

4.1.4.4. Hidróxido de bário a 0,025 N: dissolveu-se 4,0 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot \text{L}^{-1}$ de água, filtrou-se de forma a livrar a solução de precipitados. Para cada teste foram preparados cerca de 5 L de solução, estocados com vedação apropriada para evitar a absorção de CO_2 .

4.1.4.5. Hidróxido de sódio a 10 N: para purificação do ar comprimido preparou-se a solução de $\text{NaOH} - 400 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.1.4.6. Ácido clorídrico a 0,05 N

4.1.4.7. Fenolftaleína a 0,04% em etanol (70%).

4.1.5. Degradação do lodo – resíduo sólido acrescido de materiais lignocelulósicos

4.1.5.1. Espécies/linhagens de *Pleurotus* spp.: foram empregadas duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* - CCB 020 e PSC 94/03, ambas destacarem-se como degradadoras dos corantes preto enxofre e índigo na seleção em meio sólido.

4.1.5.2. Materiais lignocelulósicos empregados como substrato: foram empregados bagaço de cana umedecido por maceração (12 horas em água) mais folha de bananeira seca e picada (6% do peso do bagaço de cana) acrescido de 30% de lodo (em peso úmido). O substrato foi misturado e, a ele, adicionou-se 1% (em peso úmido) de carbonato de cálcio mais sulfato de cálcio (1:4). O substrato foi acondicionado em saquinhos de tecido de algodão de malha grossa e levado à pasteurização por vapor fluente (aproximadamente 80-90°C) por uma hora. Após esse período o substrato tratado foi retirado e levado ao resfriamento em temperatura ambiente.

4.2. Métodos

4.2.1. Manutenção das culturas e preparo do inóculo

4.2.1.1. Manutenção do estoque de culturas em MEA inclinado:

Os fungos foram mantidos em tubos de extrato de malte-extrato de levedura-ágar (MEA) inclinados e mantidos sob refrigeração; condição permitida por um período de 2 anos. O método Castellani (Smith & Onions, 1983) foi empregado para manutenção do primeiro repique a partir das culturas originais.

4.2.1.2. Manutenção das culturas em grãos de trigo:

Também foram preparados grãos de trigo previamente hidratados por 24 horas, escorridos e acrescidos de carbonato de cálcio/sulfato de cálcio a 1% na proporção 1:4, em peso úmido do grão. Estes foram distribuídos em sacos plásticos de poliestireno (6x12 cm), cerca de 20 g de grãos/saco preenchendo em 2/3 do seu volume, fechados com espuma e, autoclavados à 121°C por 20 minutos. Após esterilização estes foram inoculados com 1 disco de cada uma das culturas testadas previamente crescidas em placas de MEA, de 1 cm de diâmetro. Os sacos contendo os grãos inoculados foram incubados em BOD por aproximadamente 20 dias à 28±2°C ; uma vez crescido o micélio, estes foram armazenados sob refrigeração à 4 ±2°C . Foram feitos sacos em duplicata para cada cultura e, a cada 6 meses fez-se a renovação. Este modo de manutenção foi escolhido para ativação imediata das culturas quando necessário aos testes.

4.2.1.3. Preparo do inóculo:

Quando necessário, as culturas crescidas em tubos de MEA inclinado foram reativadas em MEA previamente esterilizado, vertido em placas de Petri e, empregados como inóculo após 7 dias de crescimento em BOD a 28±2°C, assim

como os grãos colonizados que também foram empregados como inóculo direto sobre o meio (um grão colonizado).

4.2.1.4. Preparo do inóculo para seleção em meio sólido e líquido:

Testou-se a habilidade dos fungos em crescer em meios sólidos e líquidos na ausência e presença dos corantes. Em meio sólido, placas não inoculadas contendo os corantes foram preparadas como controle para comparação visual da cor e observação da descoloração. Em meio líquido foram preparados frascos contendo glicose como única fonte de carbono, empregados como controle.

4.2.2. Seleção em meio sólido

4.2.2.1. Meio mínimo para fungos (PonteCorvo et al. , 1953) acrescido do corante RBBR:

O meio mínimo foi elaborado com 2 g de glicose/L (0,2%, no lugar de 2% como originalmente indicado) acrescido do corante RBBR na concentração de 0,02% (p/v) para testar as espécies/linhagens de *Pleurotus* quanto à habilidade ligninolítica (Glenn & Gold, 1983; Freitag & Morell, 1992). O meio acrescido do corante foi preparado e esterilizado à 121°C/15 minutos e vertido em placas de Petri (90mm), cerca de 20 mL de meio/placa. Foram preparadas placas em duplicata para cada espécie/linhagem testada. As placas em RBBR foram inoculadas com discos de 1 cm de diâmetro retirados das bordas das culturas ativadas em MEA com micélio de 7 dias, para cada fungo testado. Os discos foram colocados no centro das placas com RBBR com o micélio tocando o meio. Após a inoculação, as placas inoculadas foram incubadas à 28±2°C em BOD por 12 dias. Placas controle, não inoculadas, foram incubadas simultaneamente.

Observações diárias foram feitas para detectar o início da descoloração. Medidas do crescimento radial (cm) e do halo de descoloração (cm) no reverso da placa foram feitas a cada 2 a 3 dias até o final do período de incubação (12 dias).

4.2.2.2. Meio de Malte Ágar 0,5%

O meio de malte ágar foi elaborado com 0,5% de malte e 2% de ágar, com e sem corante identificados como – MCA (malte corante ágar) e MA (malte ágar), respectivamente; meio de malte ágar acrescido de bagaço de cana de açúcar (1% em peso seco) (BC) em partículas obtidas por moagem do bagaço após passar por sistema de peneiras, sendo a menor malha de 0,50 mm (ABNT 35, Tyler 32 - GRANUTEST), empregado com corante e sem corante, identificados como – MBCCA (malte bagaço de cana corante ágar) e MBCA (malte bagaço de cana ágar), respectivamente. Os meios foram preparados e esterilizados à 121°C/15 minutos. Os corantes foram acrescidos aos meios na forma de solução aquosa a 3%, previamente esterilizados também à 121°C/15 minutos; para cada 300 mL de meio, 2 mL da solução de corante foram gastos, correspondendo à concentração de 0,02% (p/v).

Foram preparadas placas em duplicata para cada espécie/linhagem testada. Estas foram inoculadas da mesma forma descrita acima para o teste com o RBBR, assim como foram respeitadas as mesmas condições de incubação e leituras do crescimento radial e halo de descoloração. Estas medidas foram tomadas a cada 2 a 3 dias, até o final do período de 12 dias de incubação.

4.2.2.3. Meio sólido contendo lodo

A estes meios foram acrescidas quantidades pré-definidas de lodo, previamente coletado na estação de tratamento da indústria têxtil, sendo conduzido ao laboratório sob refrigeração e assim mantido por até 24 horas antes do uso. Havendo necessidade de mais horas para o preparo, o lodo foi congelado (-18°C) até ser utilizado. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 6,0 pois, o lodo apresenta caráter básico com pH ao redor de 12 a 13.

4.2.2.3.1. Lodo na proporção de 10% em peso úmido

Como base empregou-se o meio mínimo para fungos com 0,2% de glicose e bagaço de cana (1%); meio de malte a 0,5% acrescido de bagaço de cana (1%); e, meio contendo apenas bagaço de cana e lodo, nas proporções acima indicadas. A quantidade de ágar utilizada foi de 2,0%. Estes foram esterilizados à 121°C/20 minutos.

4.2.2.3.2. Meios contendo lodo na proporção de 5% em peso úmido

Como base empregou-se meio de malte a 0,5% acrescido de bagaço de cana (1%), meio de bagaço de cana lodo ágar e, meio contendo apenas lodo e ágar. A quantidade de ágar empregada foi de 1,5%. Estes foram esterilizados à 121°C/20 minutos.

4.2.2.3.3. Meios contendo lodo na proporção de 2% em peso úmido

Como base empregou-se meio de malte a 0,5% acrescido de bagaço de cana (1%), meio de bagaço de cana acrescido de lodo ágar e, meio contendo apenas lodo e ágar. A quantidade de ágar empregada foi de 1,5%. Estes foram esterilizados à 121°C/20 minutos.

Este experimento foi repetido, tendo o lodo sido homogeneizado para adição, antes da esterilização.

4.2.3. Seleção em meio líquido

Empregou-se, a princípio, três meios líquidos, para seleção de um deles nos estudos posteriores, a saber: meio de malte 0,5%, meio mínimo para fungos e, meio basal.

Estes foram testados para o corante índigo com as seguintes espécies/linhagens: *Pleurotus* sp (origem Tailândia), CCB 517, CCB 016 e PSC 94/03. Os meios foram empregados na ausência e presença do corante (0,02%). Na ausência do corante, os meios mínimo e basal foram acrescidos de glicose (testemunhas) na proporção originalmente indicada – 1,0 e 0,3%, respectivamente. Estes foram inoculados com micélio crescido em MEA (discos de 1 cm de diâmetro), e incubados em cultivo estático por 12 dias à 28±2°C, após o que se fez as leituras conforme item 4.2.6.

4.2.3.1. Meio mínimo para fungos com os corantes como única fonte de carbono

Empregou-se meio mínimo para fungos como originalmente indicado (10g glicose/L ou 4g de C/L) como controle, e o mesmo meio sem glicose, onde os corantes foram usados como única fonte de carbono (cerca de 0,02g de C/L). A ambos corantes adicionou-se detergente não-iônico (Tween 80) na proporção de 0,1%. Este procedimento mostrou-se necessário, principalmente, quando se empregou o corante preto enxofre, afetado na sua solubilização no pH indicado para o meio em questão.

Foram preparados Erlenmeyer de 125 mL, em triplicata, contendo 25 mL de meio, para cada corante e cultura testada.

Após autoclavagem à 121°C/15 minutos, os frascos foram inoculados com discos de 1 cm de diâmetro das culturas testadas previamente crescidas em MEA por 7 dias (1 disco/frasco). Frascos não inoculados foram preparados como controles - meio mínimo sem glicose e sem corante e meio mínimo sem glicose e com corante, empregados na calibração e construção da curva de absorvância de cada um dos corantes.

Cada corante foi adicionado ao frasco com meio mínimo sem glicose da mesma forma descrita para o meio sólido, após autoclavagem dos mesmos. Para

cada frasco contendo 25 mL de meio, adicionou-se 167 μ L da solução de corante a 3% (0,02%, p/v).

Os frascos inoculados com corante e sem corante, e os controle foram incubados (cultivo estático) em BOD à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 dias. Foram feitas as seguintes avaliações no 12^o dia de incubação: peso seco do micélio (frascos inoculados), pH (frascos inoculados e controles) e obteve-se o percentual de descoloração medindo-se por espectrofotometria, na região do visível, a absorbância nos tratamentos inoculados com corante.

4.2.3.2. Avaliação da degradação/descoloração dos corantes em meio mínimo líquido com duas concentrações de nitrogênio

Empregou-se meio mínimo para fungos (PonteCorvo et al. , 1953) com 2g glicose/L com duas concentrações diferentes de nitrogênio - 0,6 g e 6,0 g de nitrato de sódio. A ambos os corantes adicionou-se detergente não-iônico (Tween 80) na proporção de 0,1%. Este procedimento mostrou-se necessário principalmente quando se empregou o corante preto enxofre, afetado na sua solubilidade no pH indicado para o meio em questão.

Foram preparados Erlenmeyer de 125 mL, em duplicata, contendo 25 mL de meio, para cada corante e cultura testada. Cada tratamento, com corante e sem corante foi feito em duplicata e frascos adicionais foram preparados para que se pudesse fazer leituras nos tempos 3, 6, 9 e 12 dias de incubação à 28°C em BOD. A cada leitura os frascos eram retirados e alíquotas de 10 mL de cada duplicata, após filtração sob pressão em papel de filtro Whatman nº 1, foram reunidas e acondicionadas em frascos âmbar e congeladas à -18°C para determinação da descoloração por cromatografia de alta resolução e, produção e atividade das enzimas ligninolíticas do fungo *P. flabellatus* CCB 394: lignina peroxidase, lacase e mangânes peroxidase. As medidas de peso seco do micélio e pH foram obtidas conforme descrito abaixo.

4.2.4. Determinação do potencial hidrogeniônico

Empregou-se na determinação do pH do meio líquido, tiras plásticas indicadoras de pH de 0 - 14 (MERCK). Em meio sólido o pH foi determinado retirando-se uma alíquota do mesmo de 10g, que foi homogeneizada em água destilada fervida e resfriada a 25°C. Após 30 minutos mediu-se o pH pelo emprego de potenciômetro calibrado com tampão a pH 4,0 e 7,0. O potenciômetro foi empregado em outras situações, como na determinação do extrato obtido de meio sólido.

4.2.5. Determinação do peso seco do micélio

Trou-se, em balança analítica, os discos de papel de filtro WHATMAM nº 1 após secagem destes em estufa à 100±5°C por 1 hora. Estes foram empregados para filtrar o meio contendo o micélio das culturas testadas após 12 dias de incubação. O micélio retido no disco foi seco em estufa à 100±5°C por 2 horas. O peso seco do micélio foi obtido pela diferença entre o disco de papel antes e após a filtração e secagem. Esse procedimento foi executado para cada frasco inoculado.

4.2.6. Determinação da absorbância por espectrofotometria

Em primeiro lugar, determinou-se a absorbância máxima e mínima para cada corante após a obtenção do espectro de absorção de cada um dos corantes. Para tanto, empregou-se um espectrofotômetro de varredura na região do visível (HP-DIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER) tomando-se uma alíquota de 1 mL de cada um dos corantes (no caso do corante *índigo* a alíquota foi diluída em 10 vezes a concentração empregada, 0,02%, p/v).

No final do período de incubação, empregou-se, para construção das curvas de calibração de cada corante e leitura dos frascos inoculados com

corante, o espectrofotômetro da Marca Fento, modelo 432, nos comprimentos indicados para cada corante correspondentes ao máximo e mínimo de absorvância. Para o corante índigo foram empregados os seguintes comprimentos de onda: 596 a 694 e 686 nm (dependendo do meio líquido) e para o corante preto enxofre 380 e 454 nm.

A leitura em dois comprimentos de onda foi feita segundo recomendação de Glenn & Gold (1983). De acordo com esses pesquisadores, a adsorção assim como a transformação do corante pela ação fúngica são responsáveis pela diminuição na intensidade de cor em solução. Desta forma, se a razão entre abs máx/ abs mín permanece constante ou modifica-se muito pouco indica que houve adsorção do corante ao micélio e, se há modificação na razão entre abs máx/abs mín significa que o corante está sendo degradado pela cultura fúngica.

4.2.7. Análise estatística dos dados obtidos em meio líquido

Empregou-se o sistema de cálculo estatístico SANEST. Foram feitas análises de variância para peso do micélio e percentual de descoloração, considerando-se o experimento inteiramente casualizado com dois fatores. O teste de Tukey foi aplicado para diferenciação das médias quando a diferença estatística foi significativa.

4.2.8. Biodegradabilidade imediata em sistema aberto

Duas espécies/linhagens foram escolhidas para o teste de biodegradabilidade imediata cuja metodologia descrita por IBAMA(1990) foi adaptada aos fungos em questão.

Este teste teve por objetivo avaliar a biodegradabilidade imediata, que deve ocorrer em no máximo 28 dias, dos corantes em meio de cultura líquido onde esses foram empregados como única fonte de carbono. As substâncias em teste são classificadas, quanto a biodegradabilidade, de acordo com a quantidade de CO₂

liberada. Se o produto teste apresentar um mínimo de 70% de degradação, é classificado como facilmente biodegradável. Do contrário são classificados como não facilmente biodegradáveis, no caso por esses microrganismos em estudo.

Foram empregados frascos contendo 3 L de solução nutriente, em duplicata, aos quais foram adicionadas as seguintes substâncias: padrão biodegradável (glicose); substâncias em teste (corante *índigo* e preto enxofre); paralelamente fez-se o branco (sem adição de inóculo, substância teste ou glicose). O ensaio de inibição (substâncias em teste mais glicose) foi eliminado uma vez que conhecidamente os fungos crescem na presença dos corantes. Um total de 30 L de meio foi preparado para cada teste.

A quantidade de padrão biodegradável e substâncias teste empregadas que foram adicionadas ao meio foi calculada de modo a obter-se uma concentração igual a 20 mg de carbono/L.

Os frascos preparados com a solução nutriente, acrescidos do inóculo, foram aerados por 24 horas, após o que fez-se a adição do padrão biodegradável e das substâncias teste (corantes). A aeração foi contínua durante todo o período de 28 dias de incubação.

Um sistema de aeração, livre de CO_2 , foi montado da seguinte forma: na saída do ar colocou-se uma coluna cheia de cal sodada e lã de vidro, a esta foram acoplados em série 5 frascos plásticos com capacidade 1 L com 700 mL de NaOH a 10 N (4 frascos) sendo o último de água. O ar filtrado foi distribuído por mangueiras de silicone para cada um dos frascos de três litros e, a estes foi acoplado um sistema de 4 frascos de 250 mL/frasco teste de 3L ensaiado, em série, com 100 mL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 0,025 N, para captura do CO_2 liberado.

Nos primeiros 10 dias de incubação, a temperatura ambiente, foram feitas retiradas diárias do frasco (250 mL) contíguo ao frasco teste, trocando-se o segundo frasco para a posição do retirado, de maneira que o segundo passou a ser o primeiro

e o terceiro o segundo, assim sucessivamente. No lugar do quarto frasco foi colocado um novo frasco de $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Transcorridos os 10 dias, o frasco absorvedor de CO_2 contíguo ao frasco em teste foi retirado a cada 5 dias, até o final dos 28 dias de incubação. Imediatamente à retirada do frasco absorvedor de CO_2 , seu conteúdo foi titulado com HCl a 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

O volume gasto de HCl entre as titulações foi anotado e a diferença entre os volumes do branco com os outros tratamentos foi calculada. Os cálculos foram feitos considerando-se que 1 mg de carbono orgânico oxidado durante o ensaio produz 3,666 mg de CO_2 (correspondendo a 0,08333 mmoles de CO_2); considerando-se que 1 mmole desse gás reage com 2 mmoles de OH^- do bário utilizado para absorção, 0,0833 mmoles de CO_2 consomem 0,1666 mmoles de HCl, na titulação. Desta forma multiplicando-se a diferença de volume de HCl gasto na titulação por 1,1 obtém-se o CO_2 desprendido ou liberado.

Os resultados em mg de CO_2 foram somados de modo a obter-se o CO_2 acumulado durante o período de incubação. Uma vez conhecida a quantidade de CO_2 desprendida calculou-se a quantidade teoricamente esperada pela fórmula: $\% \text{CO}_2-t = (\text{Cd}/\text{Ct}) \times 100$ (onde: $\% \text{CO}_2-t$ = percentual de degradação ensaiada em um período de tempo; Cd = quantidade de CO_2 total em mg liberado no período de tempo; Ct = quantidade de CO_2 em mg esperado para completa oxidação da substância).

4.2.8.1. Ensaio com a espécie/linhagem *Pleurotus flabellatus* – CCB 394

Para este teste o inóculo foi preparado com sementes de grãos de trigo contendo micélio do fungo com 20 dias de crescimento. Foram adicionados aos frascos cerca de cinco grãos para cada 3 L de meio. Os tratamentos empregados foram: padrão biodegradável, substância teste (6 L para preto enxofre, 6 L para índigo), branco e, branco acrescido de inóculo cuja finalidade foi observar se parte do CO_2 liberado era proveniente dos compostos orgânicos restantes no grão de trigo tal como amido.

4.2.8.2. Ensaio com a espécie/linhagem *Pleurotus sajor-caju* – PSC 94/03

Para esse teste o inóculo empregado foi preparado em solução nutriente estéril inoculada com discos de 1 cm de diâmetro com micélio do fungo previamente crescido em malte 0,5% mais bagaço de cana. A cultura crescida por 7 dias/28°C nesse meio líquido foi separada do disco e, o micélio presente no meio triturado por 30 segundos em liquidificador. Para cada 3 L de solução nutriente foram empregados 10 mL do inóculo. Os tratamentos empregados foram: padrão biodegradável, substância teste (6L para preto enxofre, 6L para índigo e 6L para uma mistura dos dois corantes) e branco. Nesse caso eliminou-se o branco com inóculo uma vez que esse não tinha fonte de carbono.

4.2.9. Análise de carbono dos corantes testados e carbono e nitrogênio nos substrato sólido contendo lodo

Foi executada pelo método da combustão via seca, com a utilização do analisador CARMOGRAPH –12 A – “WOSTHOF”.

4.2.10. Avaliação em meio líquido e sólido quanto à produção das enzimas ligninolíticas

A quantificação das atividades enzimáticas foi realizada empregando-se a seguinte equação:

$$[(A/E)/(Rxt)] \times 10^6 = U/L; \text{ onde:}$$

A = absorvância

E = coeficiente de absorção molar

R = quantidade de caldo enzimático

t = tempo de reação (min)

4.2.10.1. Lignina peroxidase (Tien & Kirk, 1984): esta atividade foi determinada mediante oxidação do álcool veratrílico ($E_{310} = 9300 \text{ mol/cm}$). O meio de reação de

oxidação foi composto de 0,6 mL do sobrenadante, 0,2 mL de H_2O_2 2,0 mM, 0,2 mL de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tatarato de sódio a 0,4 M (pH 3,0). A reação é iniciada pela adição de H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico é determinado fazendo-se a leitura da absorbância a 310 nm. A atividade é expressa em U/L.

4.2.10.2. Mânganes peroxidase (KUWAHARA et al., 1984): esta atividade foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol ($E_{610} = 4460 \text{ mol/cm}$) na presença de manganês e H_2O_2 . A reação é obtida mediante a mistura de 0,5 mL de sobrenadante, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,05 mL de MnSO_4 , 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,05 mL de H_2O_2 em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5).

A mistura é incubada a 30°C por 5 minutos e a reação é interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. A absorbância é lida a 610 nm e a atividade é expressa em U/L.

4.2.10.3. Lacase (Szklarz et al., 1989, modificado): a determinação da atividade de lacase foi feita empregando-se a siringaldazina como substrato enzimático. A mistura da reação é composta de 0,6 mL de sobrenadante, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol), 0,1 mL de água destilada.

A oxidação da siringaldazina ($E_{525} = 65000 \text{ mol/cm}$) até quinona foi acompanhada durante 10 minutos à 525 nm. Esta atividade é expressa em U/L.

4.2.10.4. Peroxidase (Szklarz et al., 1989, modificado): a determinação da atividade de peroxidase foi feita empregando-se a siringaldazina como substrato enzimático. A mistura da reação é composta de 0,6 mL de sobrenadante, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol), 0,1 mL de água oxigenada 2,0 mM.

A oxidação da siringaldazina ($E_{460} = 29400 \text{ mol/cm}$) até quinona foi acompanhada durante 10 minutos à 460 nm. Esta atividade é expressa em U/L.

4.2.11. Análise dos corantes degradados por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

A degradação/descoloração dos corantes presentes foi feita por comparação a uma curva de calibração para cada corante nas concentrações iniciais de cada um dos experimentos mencionados (item 3.2.3.2). A extensão de degradação/descoloração foi avaliada no terceiro e último dia de incubação, mediante avaliação do extrato das culturas em meio líquido.

A extração, limpeza do meio líquido, foi feita por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos à 5°C. O extrato foi injetado em cromatógrafo - CLAE. O equipamento empregado na detecção foi UV-VIS espectrofotômetro UV-1201 Shimadzu; a coluna cromatográfica utilizada foi uma C18 de 25 cm.

Estudos preliminares foram feitos variando-se a fase móvel, vazão e comprimento de onda visando a resolução dos picos e separação dos mesmos. Para o corante *índigo*: vazão 0,2 mL/min, fase móvel acetonitrila:água (50:50) e comprimento de onda 210 nm ou 253 nm ou 300 nm; para corante preto enxofre: vazão 0,8 mL/min ou 0,4 mL/min a 210 e 250 nm e, fase móvel acetonitrila:água (50:50); o meio com corante na razão de 1:10 foi avaliado também empregando-se como fase móvel somente a acetonitrila; estes mesmos parâmetros foram empregados também empregando-se como fase móvel a acetonitrila:água na proporção de 70:30.

4.2.12. Avaliação do percentual de descoloração por *Pleurotus* spp. em solução nutriente estéril e não estéril, empregado no estudo de biodegradabilidade imediata

As espécies/linhagens escolhidas para o teste simulando a biodegradabilidade imediata (item 3.2.8), empregando-se a mesma solução nutriente e proporções de

glicose e corante, foram: CCB 394, *Pleurotus* sp (origem Tailândia), CCB 001, CCB 396, POS 98/37, CCB 020 e PSC 94/03.

Este teste teve por objetivo avaliar o desempenho dos microrganismos em meio mineral esterilizado e não esterilizado, sem agitação (aeração). Foram preparados frascos, em triplicata, com 30 mL de solução mineral, adicionados do corante *índigo* na concentração de 20 mg C/L, frascos controles foram adicionados de 20 mg de C/L de glicose. Esses foram inoculados empregando-se suspensão de micélio previamente crescido em malte 0,5%. Após inoculação os frascos foram incubados por 28 dias a 28°C. Avaliou-se o peso seco do micélio e o percentual de descoloração.

Esse teste foi executado apenas com o corante *índigo*, devido aos resultados obtidos no estudo de biodegradabilidade imediata.

4.2.13. Pré-teste com lodo acrescido de bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana foi umedecido com água, aquecendo-se o frasco em microondas por cerca de 15 minutos em potência alta para lavar possíveis substâncias inibidoras ao crescimento dos fungos. A proporção empregada foi de 1:1.

O lodo da indústria foi empregado como ele é descartado pela indústria, ou seja, úmido.

Empregou-se como inóculo a linhagem PSC 94/03. Foram testadas as seguintes proporções, em duplicata:

- somente bagaço de cana + mistura cal e gesso (1:4) 3% em peso úmido
- bagaço de cana + 10% de lodo + mistura cal e gesso 4%
- bagaço de cana + 20% de lodo + mistura cal e gesso 5%
- bagaço de cana + 30% de lodo + mistura cal e gesso 6%

- bagaço de cana + 50% de lodo + mistura cal e gesso 7%

4.2.14. Degradação do substrato - resíduo sólido - lodo acrescido de materiais lignocelulósicos

Empregou-se o lodo residual misturado a resíduos lignocelulósicos - bagaço de cana e palha da folha de bananeira como substrato para duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* (CCB 020 e PSC 94/03). Concomitante à capacidade das linhagens descolorirem o lodo, avaliou-se as características químicas, a produção e atividade enzimática e a mutagenicidade dos extratos obtidos dos resíduos descoloridos, comparando-se com controle não inoculado.

4.2.14.1. Preparo do inóculo: o inóculo foi elaborado em sementes de grão de trigo previamente maceradas (uma noite em água), escorridas e acrescidas de 1% de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio (1:4), distribuídas em frascos de vidro (2/3 do volume total) que foram esterilizados à 121 °C por uma hora. Após o resfriamento os frascos foram inoculados com pedaços do micélio (1 cm²) dos basidiomicetos estudados previamente crescidos em MEA (7 dias à 28°C) e, incubados em BOD à 28°C por 15 dias.

4.2.14.2. Inoculação do substrato: o substrato, após resfriamento nos saquinhos de tecido, foi transferido para sacos de polipropileno juntamente com a semente colonizada pelo micélio do fungo, cerca de 10% em peso úmido de semente foi empregada. Foram preparadas quintuplicatas para cada tempo de avaliação, para cada basidiomiceto testado. Os sacos de polipropileno continham cerca de 300 g de substrato inoculado que foram levados à incubação em BOD a 28°C por 30 dias. As avaliações foram feitas no início (tempo zero) e a cada 7-8 dias. Foram preparados para cada tempo sacos não inoculados, como controle. A cada amostragem os saquinhos foram congelados a -18°C para aguardar as avaliações. Ao final de 30 dias foram realizados testes químicos e toxicológico.

4.2.14.3. Avaliações: avaliou-se o valor do pH, a umidade, a concentração de carbono e nitrogênio total, material lignocelulósico (por fibra detergente neutro e fibra detergente ácido), demanda química de oxigênio (DQO), fenóis, fósforo, potássio e magnésio. Foram avaliadas quantitativamente, em cada período de incubação, as seguintes enzimas: manganês peroxidase, peroxidase, lignina peroxidase e lacase. No final dos 30 dias também se avaliou a mutagenicidade dos substratos colonizados e do controle.

4.2.14.3.1. Umidade e potencial hidrogeniônico (pH): calculada pela perda de água após secagem à $105^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 4 horas, de acordo com Helrich (1990). O pH foi determinado em uma alíquota de 10 g do substrato combinado (das repetições) misturado a 90 mL de água destilada, após descanso de 30 minutos com medidor de pH ajustado com tampões à pH 4,0 e pH 7,0.

4.2.14.3.2. Fibra detergente neutro (FDN): analisada segundo método para determinação dos constituintes da parede celular (celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada) descrito por Van Soest & Winer (1967).

4.2.14.3.3. Fibra detergente ácida (FDA): analisada segundo método para determinação da fração lignocelulósica da AOAC 973.18 apresentada por Helrich (1990). Conhecendo-se o percentual dos constituintes da parede celular (FDN e FDA), determinou-se, apenas por diferença entre as frações, o teor de hemicelulose.

4.2.14.3.4. Demanda química de oxigênio (DQO): avaliado pelo método titrimétrico em refluxo fechado, de acordo com procedimentos descritos Clesceri et al. (1998).

4.2.14.3.5. Fenóis: avaliado por extração com clorofórmio, de acordo com metodologia descrita por Clesceri et al. (1998).

4.2.14.3.6. Fósforo, magnésio e potássio: potássio e magnésio foram avaliados por absorção atômica e, potássio por método colorimétrico (ácido vanadomolidofosfórico, de acordo com metodologias descritas por Clesceri et al. (1998).

4.2.14.4. Extração do meio sólido para as avaliações enzimáticas

Todo o substrato (três repetições), após descongelamento, foi homogeneizado e uma alíquota de 100 g foi retirada e lavada 2 vezes com frações de 200 mL de água destilada. O extrato foi filtrado em tecido de algodão de malha grossa e centrifugado por 5 minutos à 5000 rpm. O extrato foi então filtrado sob vácuo em filtro de papel e, congelado à - 18°C para determinação das enzimas. No dia das determinações o extrato foi descongelado e centrifugado por mais 10 minutos à 5000 rpm.

4.2.14.5. Quantificação das enzimas presentes:

Avaliação da produção das enzimas ligninolíticas foi feita no extrato e empregou-se os mesmos, fervidos por 10 minutos, como controle. Os métodos estão descritos no item 4.2.10.

4.2.15. Avaliação da Mutagenicidade - Teste de Ames

O teste tem por objetivo avaliar o potencial de certos compostos químicos, extratos de resíduos sólidos ou líquidos em induzir mutações no genoma de linhagens de *Salmonella typhimurium* através da reversão da mutação *his⁻* para *his⁺*, com e sem um sistema de ativação metabólica.

O Teste de Ames foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames (Ames et al. , 1975) e revisado por Maron & Ames (1983). Claxton et al. (1987) contribuíram com as principais orientações e recomendações na condução desse ensaio assim como, na

interpretação dos resultados. Gatehouse et al. (1994) resumem as principais recomendações de consenso internacional na realização deste ensaio.

O teste emprega um conjunto de linhagens de *Salmonella typhimurium*, derivadas da linhagem parental LT2 auxotrófica para histidina (*his⁻*). Cada linhagem padrão contém um tipo diferente de mutação no operon da histidina. Além da mutação quanto à histidina, as linhagens padrões têm outras mutações que aumentam grandemente sua habilidade em detectar mutagênicos. A mutação do tipo *rfa* torna a célula mais permeável a moléculas grandes; a mutação por *uvrB* confere maior sensibilidade das células à luz ultravioleta; as linhagens com plasmídeo pKM101 - Fator R são mais sensíveis aos diferentes mutágenos e têm maior resistência a ampicilina. Essas linhagens são revertidas por diferentes mecanismos e a resposta aos mutágenos depende do modo de interação da substância em teste com o ADN bacteriano. As reversões ocorrem especialmente por mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura (frameshift) e/ou por substituição de pares de base no ADN (Maron & Ames, 1983).

As linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura sem histidina a não ser que mutações estabeleçam reversões que restaurem a síntese da histidina. A frequência de reversão é medida pela contagem de unidades formadoras de colônias de uma população de células que foi exposta a uma substância mutagênica. Além dos controles negativos (solvente empregado na solubilização da substância em teste) e positivos (substâncias mutagênicas específicas para as mutações presentes em cada linhagem padrão), inclui-se neste teste um sistema de ativação metabólica (mistura S9) para detecção de promutágenos ou mutágenos indiretos (Maron & Ames, 1983). Esses ativadores adicionais, tal como a mistura S9, são preparados de uma mistura de enzimas de mamíferos, necessárias na detecção de certas substâncias que se tornam mutagênicas somente após metabolização por determinadas vias não comuns às bactérias (Eaton et al., 1995).

O número de revertentes por dose da substância em teste é calculado, para cada linhagem, por métodos estatísticos.

O sistema teste constituiu-se de duas linhagens de *S. typhimurium* denominadas TA 98 e TA 100, recomendadas por Houk (1992) em estudos com resíduos da indústria têxtil. A linhagem TA 98 detecta mutágenos que causa deslocamento do quadro de leitura e a linhagem TA 100 detecta mutágenos que causa substituição por pares de base.

O Quadro 1 resume o alvo de mutação de cada linhagem e genótipo característico.

Quadro 1. Linhagens que detectam mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura (TA 98) e por substituição por pares de base (TA 100) do ADN.

Linhagem	Alvo de Mutação	Genótipo
TA 98	CG	<i>His D3052, rfa, Δ uvrB, bio -, pKM101 (Ap^R)His</i>
TA 100	CG	<i>His G46, rfa, Δ uvrB, bio -, pKM101 (Ap^R)</i>

Legenda: *His* = mutação do gene responsável pela síntese de histidina; *rfa* = permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos; $\Delta uvrB$ = deleção do gene *uvrB*; *bio -* = mutação para biotina; Ap^R = ampicilina resistente; *pkm 101* = plasmídeo.

As substâncias de referência, ou seja, mutagênicos empregados como controles positivos para comprovar a capacidade de reversão das linhagens usadas foram:

- azida sódica (Merck): Lote nº 609048; a concentração utilizada foi de 0,5 mg/placa e a linhagem padrão foi a TA 100 (sem ativador metabólico)

-2-nitrofluoreno (Aldrich Chem. Co.): Lote nº ES 02408LR / N1,675-4; a concentração utilizada foi de 0,5 mg/placa e, a linhagem padrão foi a TA 98 (sem ativador metabólico).

- 2-aminoantraceno (Sigma): Lote nº 77H1867; a concentração utilizada foi de 0,5 mg/placa. A linhagens padrão foram a TA 98 e TA 100 na presença de ativador metabólico.

As amostras avaliadas foram os substratos colonizados, após 30 dias de incubação. As amostras foram identificadas como se segue:

- controle: substrato composto dos resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana mais folha de bananeira e lodo da indústria têxtil, sem inoculação);
- PSC 94/03: substrato composto dos resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana mais folha de bananeira e lodo da indústria têxtil, colonizado pelo micélio do fungo PSC 94/03);
- CCB 020: substrato composto dos resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana mais folha de bananeira e lodo da indústria têxtil, colonizado pelo fungo CCB 020).

4.2.15.1. Condições do teste

As linhagens foram fornecidas em discos de papel onde estão adsorvidas, contidas em sacos plásticos com pequena quantidade de meio de cultura. No recebimento foram reativadas e em seguida foram preparados os estoques permanentes adicionados de 5% de DMSO (dimetilsulfóxido) como crioprotetor, onde foram mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido (-196°C). A partir do estoque permanente, as placas com as linhagens ativadas foram preparadas para uso rotineiro.

Os genótipos de cada linhagem foram sistematicamente confirmados após o preparo da cultura a partir do estoque permanente.

A verificação das características genéticas de cada linhagem foi testada a partir das culturas (culturas de 12 horas) que deram origem às linhagens ativadas, quanto ao número de revertentes espontâneos, dependência para histidina, presença de mutação *rfa* através da sensibilidade ao cristal violeta, presença de deleção *uvrB* verificando-se a sensibilidade à luz ultra violeta, presença do plasmídeo pKM101 em meio contendo ampicilina que confere sua resistência à droga, conforme Maron & Ames (1983).

4.2.15.2. Preparo dos inóculos das culturas de *Salmonella typhimurium*

Uma alçada de massa celular de cada cultura ativada foi inoculada em 30 mL de caldo nutriente. Os frascos inoculados foram incubados à 35-37°C por 10 - 12 horas, sob agitação (150 - 170 rpm), de modo a obter-se uma densidade de 10^8 - 10^9 células viáveis/mL.

O controle da viabilidade de cada linhagem foi feito através da contagem do número de unidades formadoras de colônias.

4.2.15.3. Preparo do Ativador Metabólico - mistura S9

A mistura de S9 - liofilizado da fração microssomal de fígado de rato ativado com Aroclor 1254 (Moltox - Molecular Toxicology Inc., Annapolis, MD, U.S.A) adicionada de cofatores (NADP e soluções de cloreto de potássio, cloreto de magnésio hexahidratado, tampão fosfato e glicose-6-fosfato) foi preparada de acordo com Maron & Ames (1983), imediatamente antes do início do teste. O preparado foi mantido em banho de gelo por não mais que cinco horas. Todos os cuidados de assepsia durante a preparação e manipulação da mistura S9 foram tomados. Em paralelo conduziu-se teste de esterilidade da fração S9 utilizada.

4.2.15.4. Preparo das Amostras

As amostras foram preparadas de acordo com CETESB (1999), da seguinte forma:

- amostra controle: uma alíquota de 15,498 g do substrato, previamente seco à 60°C, foi extraída com 100 mL de metanol, submetido a ultrassonificação por 20 minutos. Do extrato, após filtração em membrana de 0,45 µm (por duas vezes) e evaporação à 40°C, avaliou-se o material orgânico extraído (MOE) por gravimetria. O MOE obtido de 15,498 g da amostra controle, na base seca, foi de 0,1239 g. Este MOE foi ressuspenso em 14 mL de DMSO (densidade = 1,11). Em seguida, homogeneizou-se, obtendo-se a solução estoque. A partir da solução estoque, alíquotas foram retiradas de modo a obter as concentrações finais, empregadas em placa, de: 6,64; 11,07; 63,10; 127,31 e 630,99 mg equivalente de amostra na base seca/placa.
- amostra PSC 94/03: uma alíquota de 30,005 g da substância teste, previamente seca à 60°C, foi extraída com 100 mL de metanol, submetida a ultrassonificação por 20 minutos. Do extrato, após filtração em membrana de 0,45 µm e evaporação à 40°C, avaliou-se o material orgânico extraído (MOE) por gravimetria. O MOE obtido de 30,005 g da amostra PSC 94/03, na base seca, foi de 0,3763 g. Este MOE foi ressuspenso em 27 mL de DMSO (densidade = 1,11) e filtrado novamente. Em seguida, homogeneizou-se, obtendo-se a solução estoque. A partir da solução estoque, alíquotas foram retiradas de modo a obter as concentrações finais, empregadas em placa, de: 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 e 500,0 mg equivalente de amostra na base seca/placa.
- amostra CCB 020: uma alíquota de 29,425 g da substância teste, previamente seca à 60°C, foi extraída com 100 mL de diclorometano:metanol (2:1), submetida a ultrassonificação por 20 minutos. Do extrato, após filtração em membrana de 0,45 µm e evaporação à 40°C, avaliou-se o material orgânico extraído (MOE) por

gravimetria. O MOE obtido de 29,425 g da amostra CCB 020, na base seca, foi de 0,2737 g. Este MOE foi ressuspenso em 27 mL de DMSO (densidade = 1,11). Em seguida, homogeneizou-se e filtrou-se novamente, obtendo-se a solução estoque. A partir da solução estoque, alíquotas foram retiradas de modo a obter as concentrações finais, empregadas em placa, de: 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 e 500,0 mg equivalente de amostra na base seca/placa.

4.2.15.5. Procedimento Experimental

O método adotado no procedimento experimental foi o de incorporação em placas. Alíquotas apropriadas (em μL) das soluções estoque do extrato das amostras, dependendo da concentração, foram adicionados juntamente com 0,1 mL da suspensão de células (cultura de 12 horas) em tubo de ensaio estéril contendo 2 mL de "top agar" com traços de histidina e biotina. Essa mistura foi homogeneizada em vortex por 2-3 segundos e vertida sobre a superfície de uma placa de Petri contendo meio de ágar mínimo seletivo a 2% de glicose para as todas as linhagens testadas.

O mesmo procedimento foi adotado para os testes com ativador metabólico, realizado segundo Maron & Ames (1983), utilizando-se 0,5 mL/placa do preparado da mistura de S9 recém preparada.

Para todos os tratamentos, controles e amostras, foram inoculadas placas em triplicata. Após 72 horas de incubação à 37°C, o número de colônias revertentes foi contado.

Os tratamentos controle usados foram:

Bactéria

Bactéria + solvente (DMSO)

Bactéria + Substância de Referência

Bactéria + Mistura S9 (ativador metabólico)

Bactéria + Solvente (DMSO) + Mistura S9

4.2.15.6. Método Estatístico

Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Salmonel (Myers et al., 1991).

A substância teste é considerada potencialmente mutagênica se atender os seguintes critérios:

- 1) Aumento no número de revertentes dose-relacionado ($p=0,05$) entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos;
- 2) E, em pelo menos uma dose, a razão de mutagenicidade [RM= número de revertentes na placa teste (número de revertentes espontâneos mais induzidos)/ número de revertentes na placa controle (número de revertentes espontâneos)] for maior ou igual a 2 para TA 100 e TA 98;
- 3) No caso de efluentes e resíduos industriais, os resultados positivos para mutagenicidade são avaliados pelo número de revertentes/matéria orgânica extraída comparados à tabela de classificação dada por Houk (1992).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção com o corante RBBR

O meio mínimo acrescido do corante RBBR mostrou-se adequado para crescimento das espécies/linhagens de *Pleurotus* estudadas.

Considerando-se a taxa de crescimento, as linhagens de crescimento mais rápido (1,00 a 0,84) foram: POS 98/37, CCB 020, CCB 068. As linhagens de

crescimento intermediário foram: CCB 016, CCB 001, CCB 394, CCB 507, POS 98/33, POS 98/36, *Pleurotus* sp (origem Tailândia) e PSC 94/03; as linhagens que menos cresceram foram CCB 517, CCB 396 e CCB 440.

Com relação à taxa de descoloração e percentual, todas as linhagens que descoloriram, o fizeram numa proporção semelhante à taxa de crescimento porém, maior se considerarmos que o inóculo no tempo zero já tinha 1 cm de diâmetro. Portanto o percentual de descoloração foi igual ou maior que 100 % para todas as 11 espécies/linhagens que descoloriram o RBBR no período de 12 dias de incubação (Figura 1). Exemplos de espécies/linhagens que descoloriram o corante podem ser observadas na Figura 2.

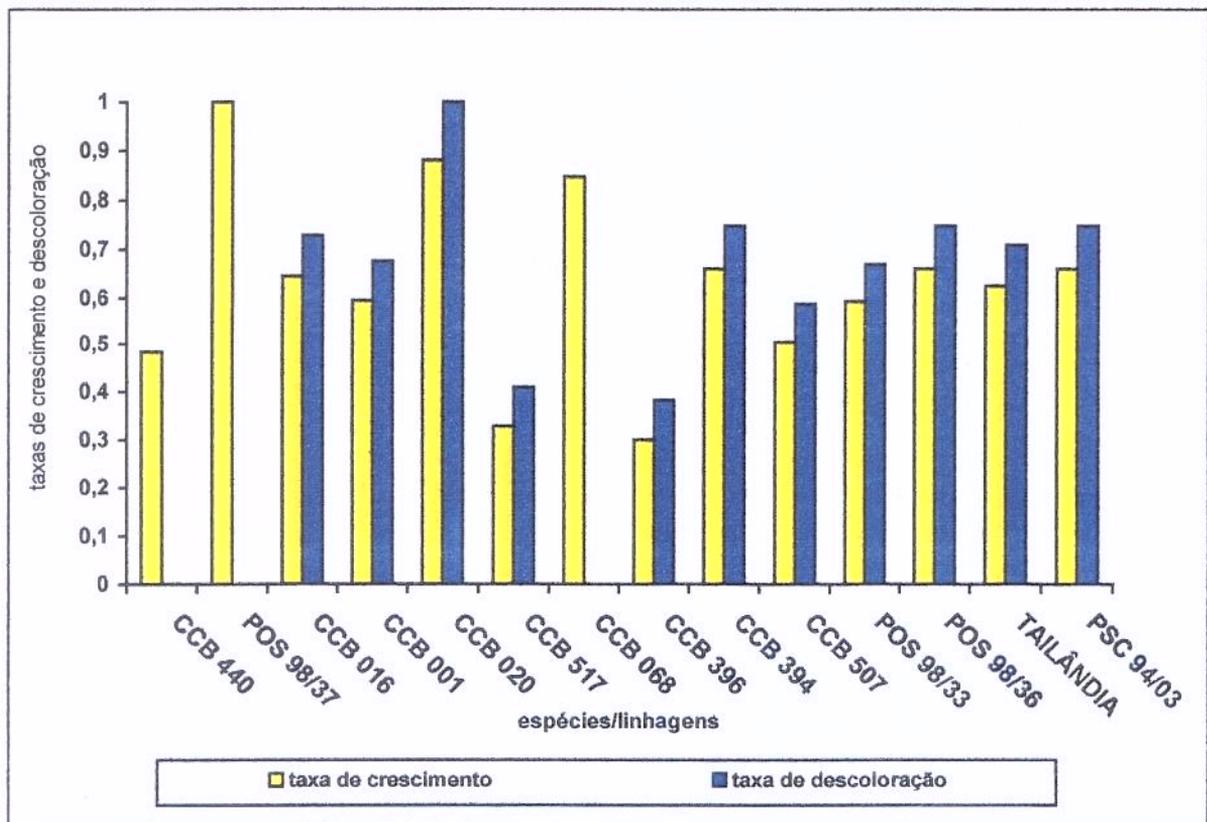


Figura 1. Taxas de crescimento e de descoloração (cm/dia) do RBBR por *Pleurotus* spp em meio mínimo.

Neste estudo o corante RBBR foi empregado para avaliação da atividade ligninolítica das espécies/linhagens de *Pleurotus*, conforme proposto por Thorne (1993). Embora haja variações químicas estruturais entre as várias classes de corantes, considera-se o RBBR adequado para uma avaliação prévia de microrganismos ligninolíticos com base na sua quebra e descoloração, pois é um derivado do antraceno iniciador na produção de corantes poliméricos e estruturalmente parecido com certos compostos aromáticos policíclicos, substratos da lignina.

A formação do halo de descoloração foi observada em todas as linhagens testadas, exceto para CCB 440, POS 98/37 e CCB 068, no período ensaiado (Tabela 1, apêndice 1). A formação do halo ocorreu a partir do 3º dia de incubação.

Os dados obtidos confirmam que há diferenças genéticas entre as espécies/linhagens de *Pleurotus* quanto à produção das enzimas ligninolíticas extracelulares envolvidas no processo de descoloração do RBBR, pois embora tenha havido crescimento das espécies CCB 440, CCB 068 e POS 98/37 estas não descoloriram o corante nas condições deste experimento. Dessa forma pode-se inferir que as espécies/linhagens não produzem tais enzimas ou não as produziram nas condições adotadas.

Estudos sobre a dinâmica da produção de enzimas revelam vários padrões, podendo ser produzidas paralelamente à produção da biomassa ou como evento do metabolismo secundário (Skzlarz et al., 1989). Em meio líquido, as enzimas ligninolíticas parecem ser produzidas na fase estacionária (Kim et al., 1996) e, em meio sólido observou-se que a descoloração ocorre mais lentamente que o crescimento radial, indicando que as enzimas estão associadas às hifas em crescimento e às desenvolvidas (Freitag & Morell, 1992). Os resultados obtidos confirmam esse padrão.

O crescimento prévio em material lignocelulolítico poderia induzir o sistema enzimático das espécies/linhagens que não descoloriram o RBBR, conforme relatado por Platt et al. (1985). Essa condição prévia não foi verificada com esse corante e meio mínimo.

Por essa razão a seleção com os corantes indigo e preto enxofre foi realizado empregando-se o meio de malte e o meio de malte acrescido de material lignocelulósico. Estas variações foram implementadas devido a resultados positivos obtidos por vários pesquisadores (Knapp et al., 1995; Vyas & Molitoris, 1995; Platt et al., 1985; Akhemedova, 1994), que optaram pelo crescimento prévio do inóculo a ser empregado na descoloração em material lignocelulósico.

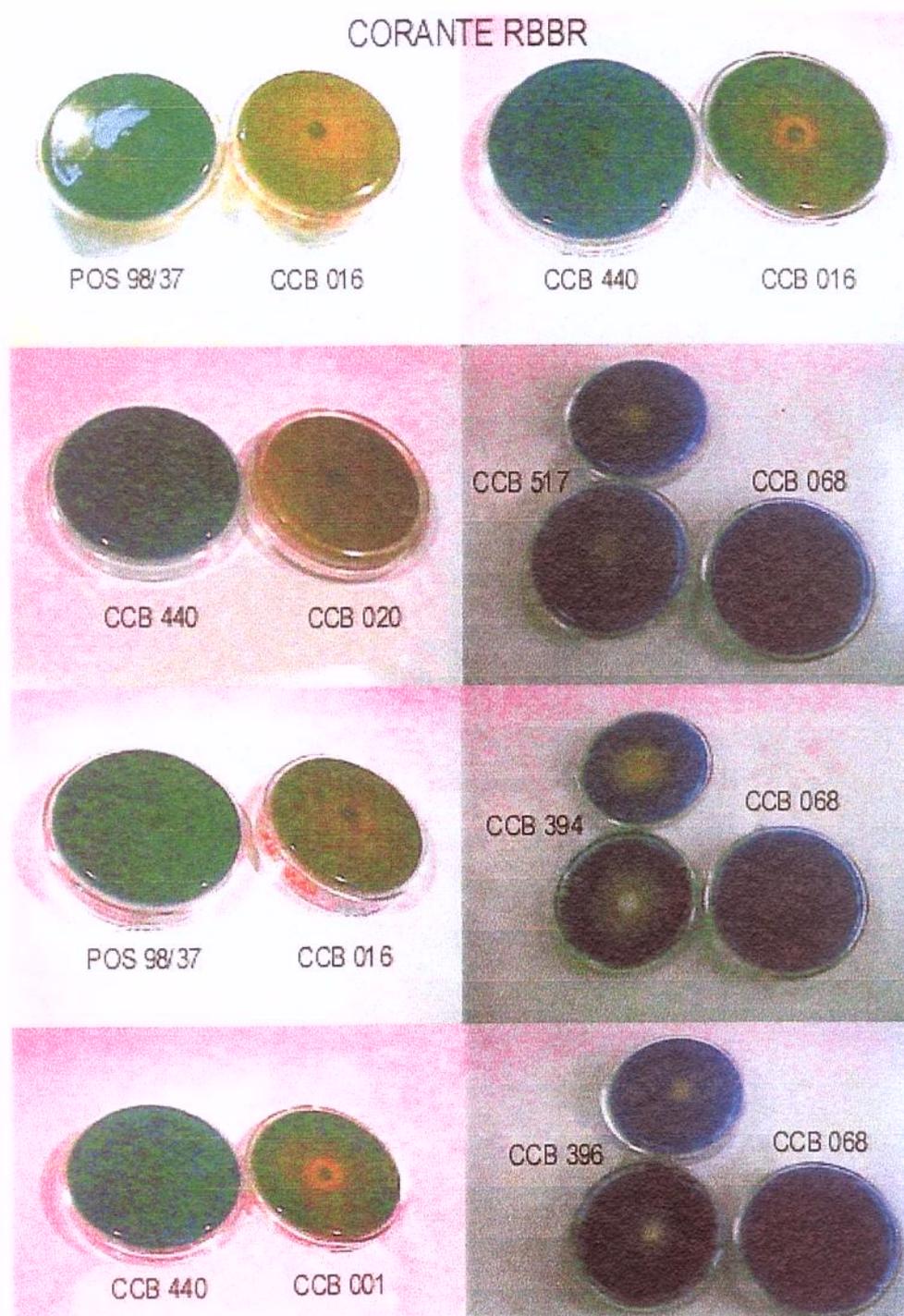


Figura 2. Espécies/linhagens que descoloriram o corante RBBR no período de tempo ensaiado comparadas àquelas que não o fizeram.

5.2. Seleção com o corante índigo em meio de cultura sólido

Todas as espécies/linhagens que cresceram na presença do corante em malte 0,5%, no geral, foram melhores ou iguais que na ausência do corante, tais como CCB 001, *Pleurotus* sp (origem Tailândia), CCB 440, CCB 016, PSC 94/03, POS 98/33, CCB 020, CCB 068 e CCB 507. As linhagens que apresentaram crescimento menor em malte 0,5% mais corante foram: POS 98/36, CCB 394, CCB 517 e CCB 396 (Tabela 2, apêndice 1).

Na presença de bagaço de cana observou-se, na maioria dos casos, que o crescimento foi maior ou igual ao crescimento observado somente em malte ou malte corante, fato esperado uma vez que esses fungos são lignocelulolíticos. Em geral, o meio com bagaço de cana acrescido do corante não alterou a taxa de crescimento quando comparado ao meio apenas com bagaço de cana, permanecendo igual ou menor (Figura 3).

Quanto à taxa de descoloração, observou-se que os fungos testados na presença do corante índigo só foram capazes de descolori-lo quando crescidos em meio de malte contendo bagaço de cana. Na Figura 4 estão representados apenas as espécies/linhagens que descoloriram o corante (ver Tabela 2, apêndice1).

As espécies/linhagens, com maior taxa de descoloração ($> 0,60$), foram: *Pleurotus* sp (origem Tailândia), POS 98/33, POS 98/37, CCB 394, CCB 020; as linhagens com menor taxa ($< 0,40$) foram: CCB 001, CBB 016, PSC 94/03, POS 98/36 e CCB 396.

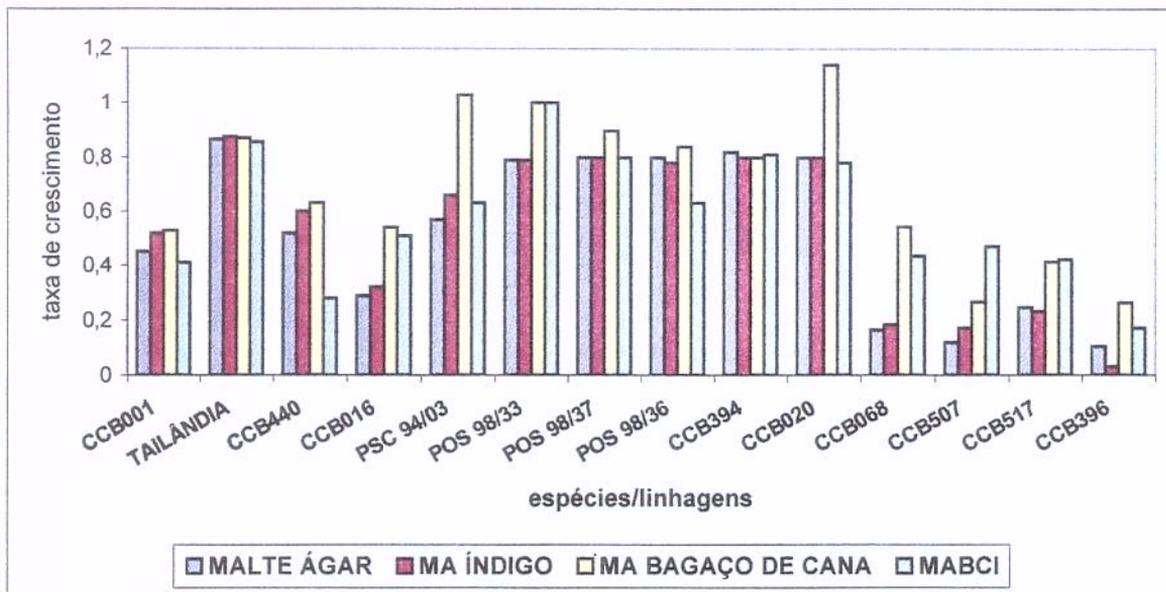


Figura 3. Taxa de crescimento (cm/dia) de *Pleurotus* spp em meios de cultura com e sem o corante índigo.

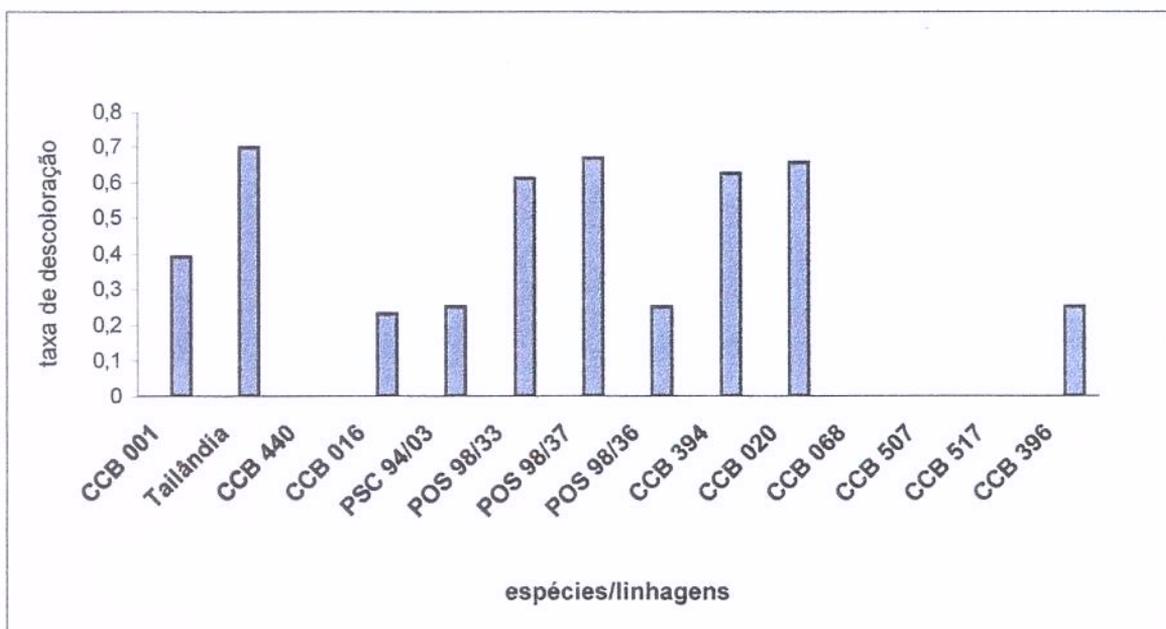


Figura 4. Taxa de descoloração (cm/dia) por *Pleurotus* spp em meio de malte ágar acrescido de bagaço de cana e corante índigo (espécies/linhagens que não descoloriram apenas estão citadas).

As espécies/linhagens que não descoloriram o corante índigo, em nenhuma das condições testadas, no período ensaiado foram: CCB 440, CCB 068, CCB 507 e CCB 517.

Considerando-se o percentual de descoloração [(taxa de descoloração/taxa de crescimento) x 100], CCB 001, *Pleurotus* sp (origem Tailândia), POS 98/37, CCB 020 e CCB 396 apresentaram-se com mais de 80% e CCB 016, PSC 94/03, POS 98/33, POS 98/36, CCB 394 e CCB 507 menos do que 80% de descoloração.

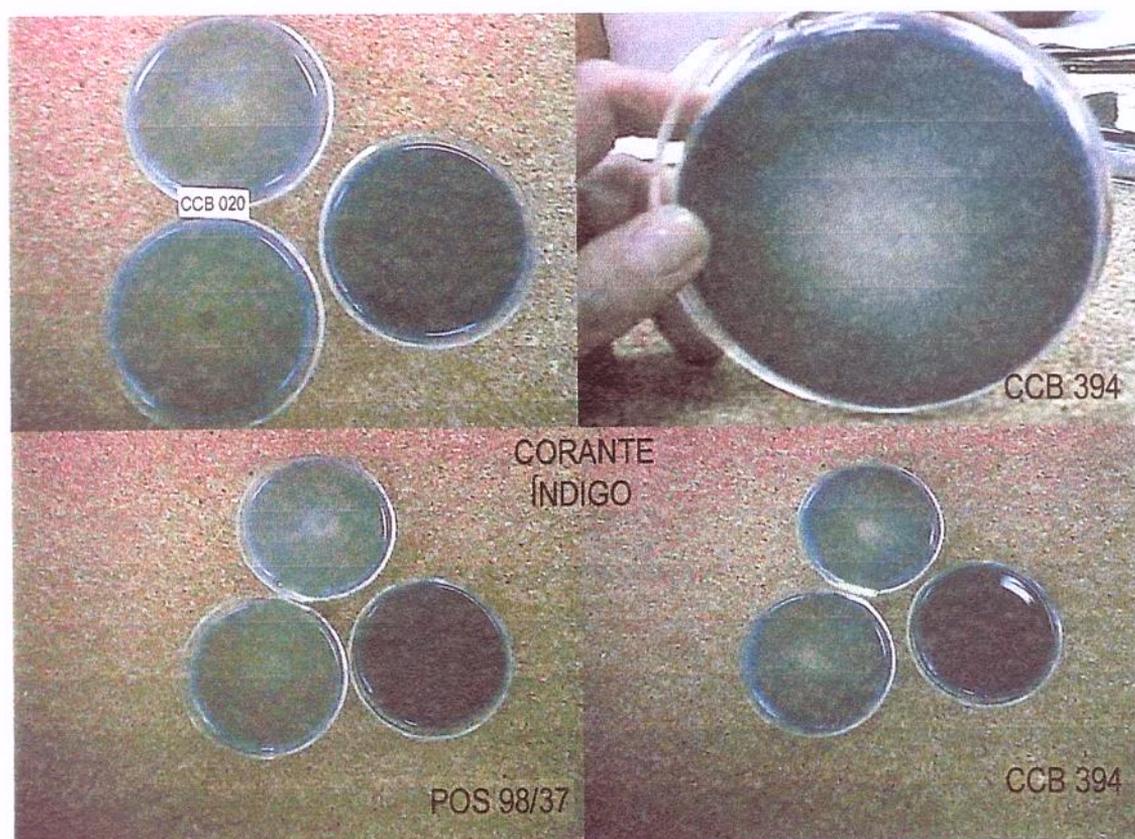


Figura 5. Exemplos de espécies/linhagens de *Pleurotus* que descoloriram o corante índigo. (placas mais claras foram inoculadas com os respectivos fungos, placas escuras são os controles – meio de cultura com corante não inoculado).

5.3. Seleção do corante preto enxofre em meio de cultura sólido

Na Tabela 3 (apêndice 1) estão os dados referentes ao comportamento das espécies/linhagens de *Pleurotus* estudadas, frente ao corante preto enxofre. Quanto à taxa de crescimento observou-se que esta foi igual ou maior, para maioria das espécies/linhagens testadas, em meio de malte mais corante que quando apenas em malte 0,5%; as espécies/linhagens que apresentaram crescimento menor em malte corante foram: CCB 016, CCB 394 e CCB 507 (Figura 6).

Na presença de bagaço de cana, observou-se que, no geral, o crescimento foi maior ou igual quando apenas em malte 0,5%, exceto para as espécies/linhagens: CCB 394 e CCB 507. No meio acrescido de bagaço de cana mais o corante o crescimento foi igual ou maior para todos os *Pleurotus* spp testados.

Quanto à taxa de descoloração observou-se que o corante preto enxofre pôde ser descolorido também em meio de malte corante sem a presença de bagaço de cana pelas espécies/linhagens: CCB 001, *Pleurotus* sp (origem Tailândia), PSC 94/03, POS 98/37, POS 98/36, CCB 394, CCB 020 e CCB 517, embora uma descoloração maior ou igual tenha ocorrido na presença de bagaço de cana, exceto para a espécie/linhagem CCB 001, que foi menor. As espécies/linhagens que descoloriram somente na presença de bagaço de cana foram: CCB 016, POS 98/33, CCB 507 e CCB 396. Duas espécies/linhagens que não descoloriram em nenhuma das situações foram CCB 068 e CCB 440 (Figura 7).

Considerando-se o percentual de descoloração, as espécies/linhagens com mais de 80% (em ambos os meios, com e sem bagaço de cana) foram: CCB 001 e CCB 020; menos que 80%: *Pleurotus* sp (origem Tailândia), POS 98/37, POS 98/36 e CCB 517. As espécies/linhagens com mais de 80%, em um dos meios foram: PSC 94/03 (sem bagaço de cana) e CCB 394 (com bagaço de cana).

Na Figura 8 estão apresentados alguns exemplos da descoloração do corante preto enxofre.

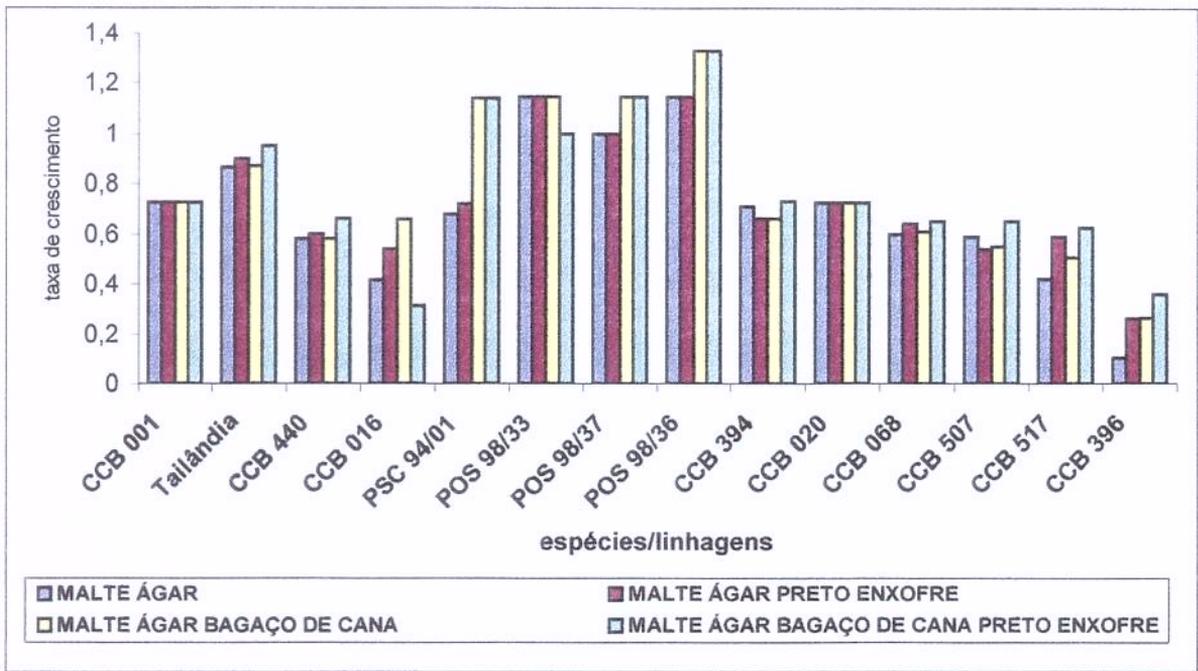


Figura 6. Taxa de crescimento (cm/dia) de *Pleurotus* spp em meios de cultura com e sem corante preto enxofre.

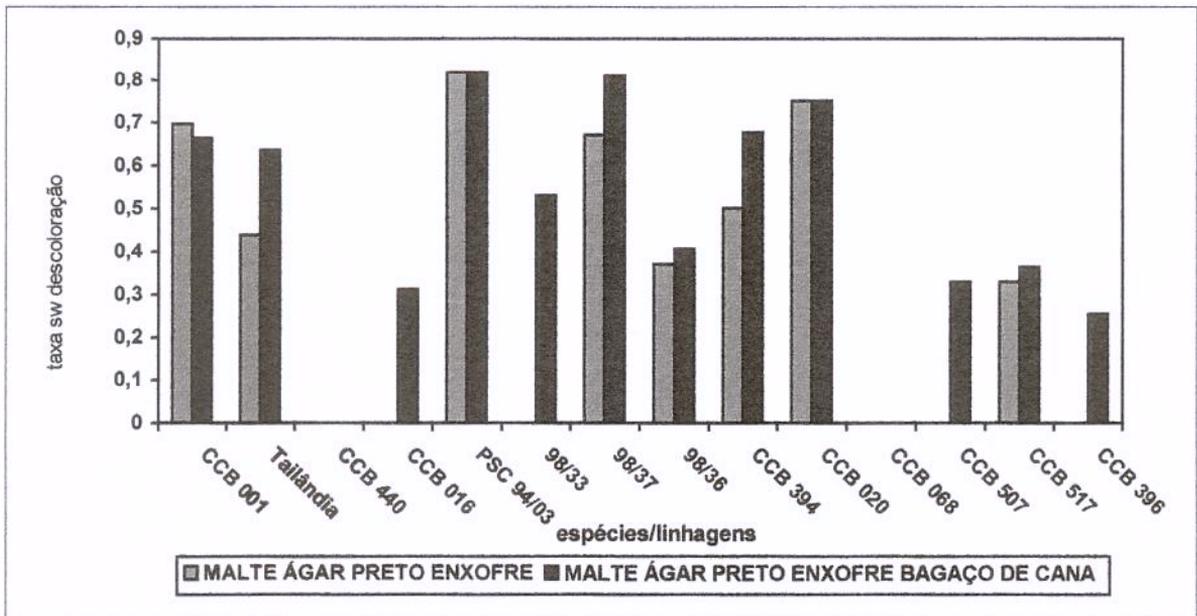


Figura 7. Taxa de descoloração (cm/dia) por *Pleurotus* spp em meios de cultura com e sem corante preto enxofre. (espécies/linhagens que não descoloriram apenas estão citadas).



Figura 8. Exemplos de espécies/linhagens de *Pleurotus* que descoloriram o corante preto enxofre.

5.4. Discussão sobre a descoloração dos corantes testados

Dos resultados obtidos com o corante índigo e preto enxofre observou-se que as espécies/linhagens CCB 068 e CCB 440 não descoloriram nenhum dos corantes testados, no período e condições empregadas, embora tenham crescido na presença dos mesmos. Essas mesmas espécies/linhagens não descoloriram o corante RBBR, indicando que as enzimas do sistema ligninolítico são produzidas em quantidades insuficientes para descoloração e/ou não há presença de pelo menos uma das enzimas necessárias/envolvidas no processo de descoloração.

Nas condições deste estudo o corante RBBR mostrou-se adequado para uma seleção prévia dos fungos testados, pois apenas uma espécie/linhagem POS 98/37 que não descoloriu o RBBR, foi capaz de descolorir o preto enxofre e o corante índigo. Embora o corante RBBR dê origem a vários corantes, a estrutura molecular varia e a mineralização dos mesmos está ligada, em parte, à complexidade da molécula (Bumpus, 1995, Knapp et al., 1995).

Por outro lado, para todas as espécies/linhagens implicadas na descoloração do corante índigo, observou-se que essa só foi possível na presença de bagaço de cana, indicando que o sistema implicado com a descoloração é indutivo ligninolítico. Resultados semelhantes foram observados por Platt et al. (1985) na descoloração do corante polivinalina antraquinona sulfonada ("poly blue") por *P. sp florida* que só ocorreu quando o fungo foi previamente cultivado em substrato contendo palha de algodão.

O mesmo não ocorreu com o corante preto enxofre, pois algumas espécies/linhagens descoloriram este corante na ausência de bagaço de cana. Para esta situação pode-se inferir que a fonte carbono (malte) e/ou o próprio corante foi suficiente para ativar as enzimas ligninolíticas envolvidas no processo de descoloração. No entanto, o sistema enzimático extracelular envolvido no processo de descoloração é ligninolítico, confirmado pela maior taxa de

descoloração na presença de bagaço de cana para a maioria das espécies/linhagens que descoloriram o corante preto enxofre (exceto para as espécies/linhagens CCB 001, PSC 94/03, POS 98/36 e CCB 020), nem sempre maior quando o bagaço de cana esteve presente.

Na Figura 9 estão expressos em percentual de descoloração os resultados obtidos para todos os *Pleurotus* spp em ambos os meios testados, sem e com bagaço de cana. De acordo com tais resultados, as espécies/linhagens que não foram consideradas para novos estudos em meio sólido, foram CCB 016, POS 98/33, POS 98/36, CCB 507 e CCB 517 que apresentaram um percentual menor que 60%, em pelo menos um dos corantes testados. Estudos com *P. ostreatus* demonstraram outras enzimas do sistema ligninolítico implicadas na descoloração do RBBR. Entre elas citam-se a MIP - uma peroxidase independente do mangânes e uma outra enzima que necessita de peróxido de hidrogênio (Vyas & Molitoris, 1995; Shin et al., 1997). A quantidade produzida dessa enzima extracelular dependente de peróxido de hidrogênio é influenciada pela relação carbono:nitrogênio e, sua máxima atividade foi alcançada quando essa relação foi de 24.

Neste estudo preliminar, duas fontes de carbono foram empregadas, a glicose presente no meio mínimo mais o RBBR e, no caso dos corantes estudados a fonte foi o malte mais material lignocelulósico. Embora não tenha havido determinação dessa relação, considera-se que, pelos resultados obtidos, essa esteve de acordo com as necessidades da maioria dos basidiomicetos estudados.

Dentre as enzimas implicadas com a degradação da lignina e a descoloração de corantes por espécies/linhagens de *Pleurotus* a lacase têm sido freqüentemente implicada assim como sua interação com a MnP (Vyas & Molitoris, 1995) e, sabe-se que a quantidade produzida varia entre as diferentes espécies/linhagens deste basidiomiceto (Leisola & Feichter, 1988; Rajarathnam & Bano, 1989; Rajarathnam et al., 1992).

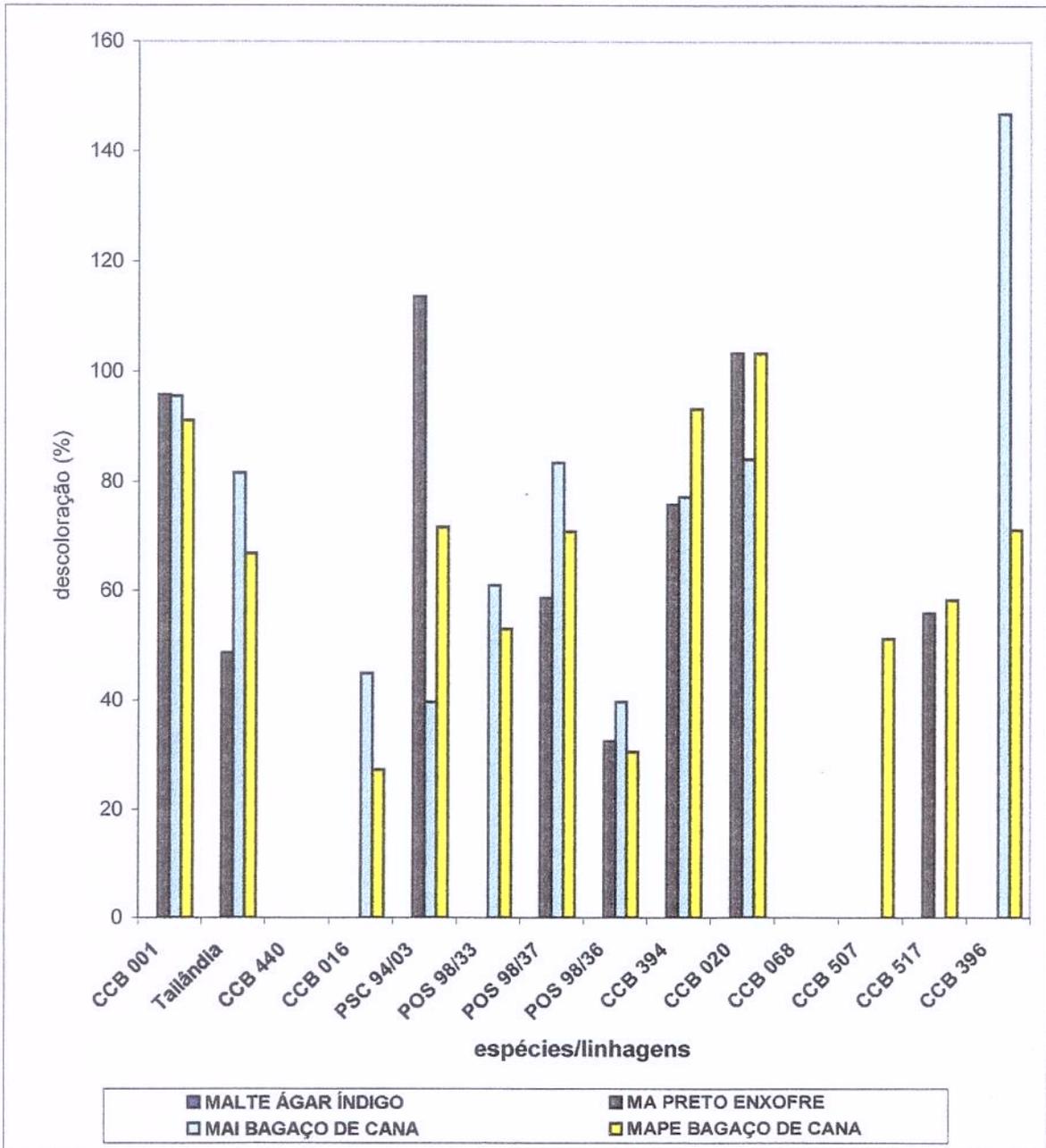


Figura 9. Percentual de descoloração dos corantes índigo e preto enxofre por *Pleurotus* spp em diferentes meios de cultura. (espécies/linhagens que não descoloriram apenas estão citadas).

Estudos mais recentes com espécies/linhagens de *Pleurotus* e vários corantes confirmam que a lacase e a manganês peroxidase estão implicadas no processo de descoloração, tendo sido a lacase apontada como a enzima principal (Rodriguez et al., 1999, Wong & Yu, 1999, Reyes et al., 1999).

5.5. Seleção em meio sólido contendo lodo

As espécies/linhagens selecionadas acima (itens 5.2 e 5.3) foram testadas em meio sólido na presença de lodo. Num primeiro momento empregou-se o meio mínimo com 0,2% de glicose, meio de malte 0,5% e apenas bagaço de cana, todos acrescidos de lodo (10% em peso úmido). Esses meios foram inoculados com discos de 1cm de meio de malte ágar bagaço de cana com micélio crescido das culturas em estudo, e incubados por 12 dias à $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Observou-se um crescimento do micélio para todas as linhagens, porém não houve formação de halo de descoloração, apenas em algumas espécies/linhagens foram notados indícios devido a uma aparente descoloração nas bordas das culturas. Os resultados mostraram que os meios mais indicados para prosseguir com os ensaios eram meio de malte lodo e meio com bagaço de cana lodo (Figura 10), provavelmente devido a um aumento na relação carbono/nitrogênio em relação ao meio mínimo, assim como a fonte de nitrogênio.

Foram, então, realizados dois ensaios com lodo na proporção de 2% em peso úmido em malte ágar bagaço de cana, bagaço de cana ágar e, apenas o lodo ágar. No primeiro ensaio os resultados não foram satisfatórios na observação do halo de descoloração, que não se formou homogeneamente devido à má distribuição do lodo no meio. Repetiu-se o experimento homogeneizando-se mecanicamente o lodo com o meio antes da esterilização, na tentativa de medir-se o halo de descoloração, entretanto não foi possível medi-lo, pois a descoloração, quando ocorreu, apresentou-se difundida por todo o meio.

Os resultados estão apresentados na Tabela 4 (apêndice 1) e a descoloração está descrita conforme observações visuais. Na Figura 11

encontram-se alguns exemplos fotografados. Neste experimento excluiu-se a espécie/linhagem CCB 396 devido à baixa taxa de crescimento na presença do lodo, independente do meio de cultivo.

Dados relativos à composição do lodo, fornecidos pela indústria têxtil, mostram que este contém nitrogênio (total entre 0,9 a 1,03%; amoniacal entre 436 a 1118 mg/kg); cálcio, fósforo, sódio e potássio estão entre os macrominerais e, zinco, cobre, selênio, cromo entre os microminerais; metais pesados em quantidades menores que 0,1 mg/kg. Tais elementos são necessários ao crescimento desses fungos e complementam o bagaço de cana que é especialmente pobre em nitrogênio comparado à quantidade de carbono orgânico disponível (C:N 40:1) (Sturion & Oetterer, 1994).

Os resultados mostraram que o lodo, embora suporte o crescimento das espécies/linhagens testadas, conduz à má formação do micélio devido à falta de carbono orgânico; a necessidade de uma fonte de carbono é evidente quando se observa a taxa de crescimento nos meios contendo bagaço de cana e bagaço de cana malte. A descoloração ocorreu para todas as espécies/linhagens testadas, exceto para POS 98/37. As melhores espécies/linhagens foram PSC 94/03 e CCB 394, com taxas de crescimento e início da descoloração no 5º dia em ambos os meios, contendo bagaço de cana. A presença do bagaço de cana é necessária para que ocorra a descoloração, pois o lodo é uma mistura dos corantes índigo e preto enxofre, e o bagaço de cana é necessário para que ocorra a descoloração do corante índigo, pois induz a atividade das enzimas lignocelulolíticas expressas no metabolismo secundário desses fungos (item 5.2).

Em função dos dados obtidos, duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* - PSC 94/03 e CCB 020, empregadas em cultivo de cogumelos comestíveis, foram selecionadas para estudar o lodo misturado a material lignocelulósico, em condições próximas às empregadas no cultivo comercial desses basidiomicetos.

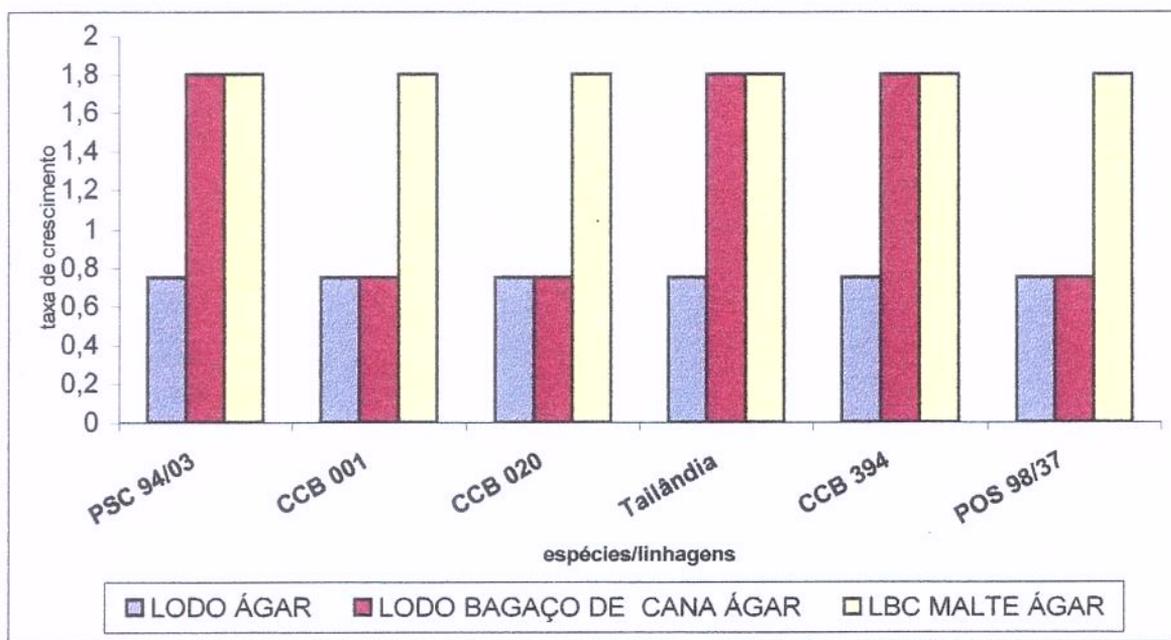


Figura 10. Taxa de crescimento (cm/dia) (média de duplicatas) de *Pleurotus* spp. em meio de malte ágar lodo, lodo bagaço de cana ágar e lodo bagaço de cana malte ágar.

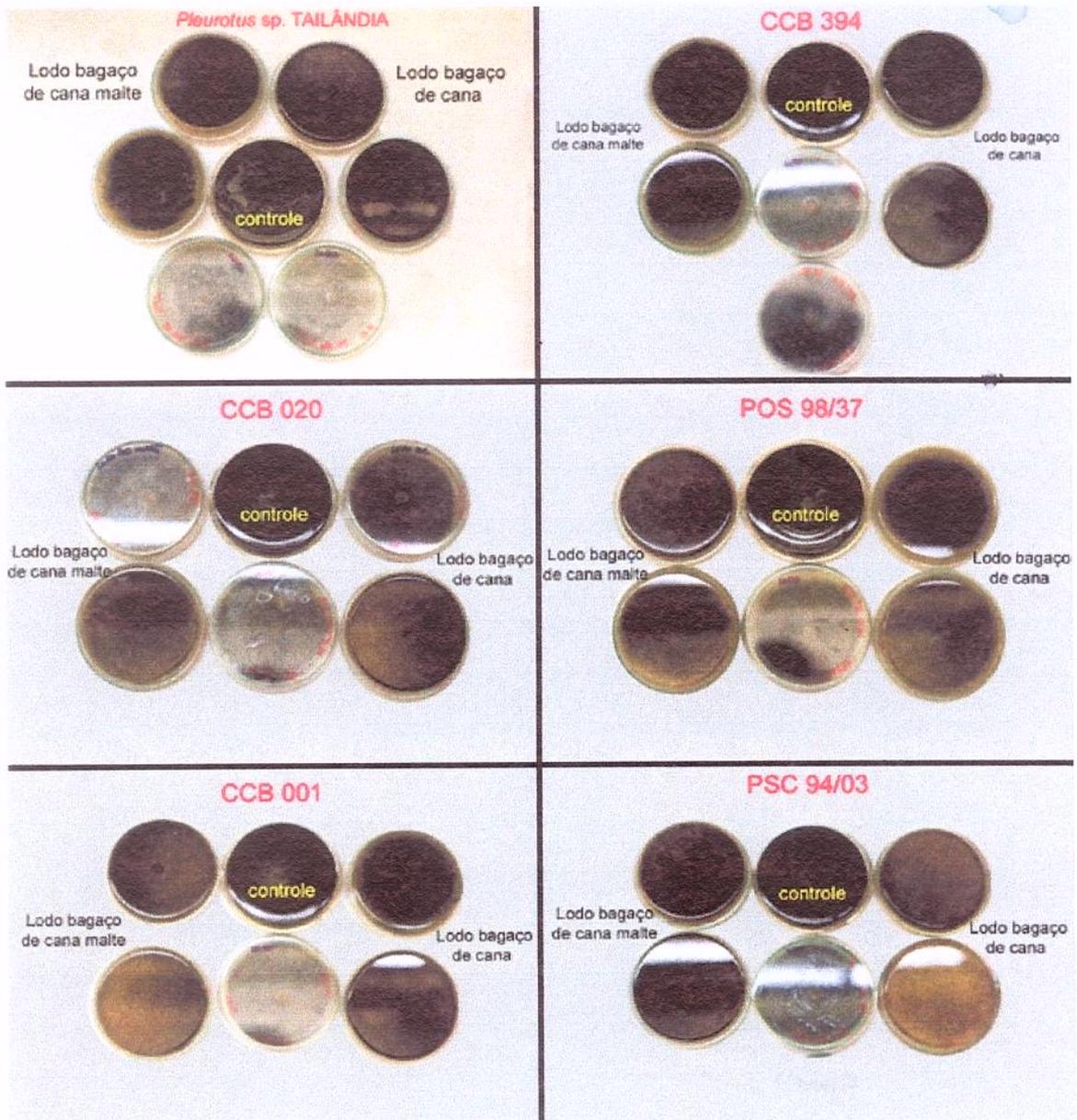


Figura 11. Exemplos de espécies/linhagens de *Pleurotus* que descoloriram o Lodo.

5.6. Avaliação do desenvolvimento do micélio, no lodo mais bagaço de cana colonizado por *P. sajor-caju* - PSC 94/03.

Cerca de 5 dias após a inoculação, todos os tratamentos com lodo estavam com maior ou igual taxa de colonização que o bagaço de cana sozinho; os tratamentos com 10%, 20%, 30% e 50% de lodo, apresentaram cerca de 75% de colonização do substrato, contra apenas 25% do crescimento só com bagaço de cana. No final de 10 dias, todos os tratamentos apresentaram colonização total, exceto tratamento com 50% de lodo e apenas bagaço de cana. A melhor concentração de lodo ficou entre 30 e 50%.

Este dado foi obtido preliminarmente para o estabelecimento da concentração a ser empregada no estudo com lodo mais material lignocelulósico - bagaço de cana e folha de bananeira.

5.7. Seleção do meio de cultura para a realização do ensaio em meio líquido

Três meios líquidos foram testados quanto ao potencial de descoloração das espécies/linhagens de *Pleurotus*, a saber: meio de malte 0,5%, meio mínimo (Pontecorvo et al., 1953) e meio basal (Commanday & Macy, 1985).

Os resultados obtidos (Tabelas 5 e 6, apêndice 2) mostraram que não ocorrem diferenças consideráveis entre os meios mínimo e basal, e o meio de malte não alcançou resultados satisfatórios quando comparado aos dois primeiros.

O meio basal é incorporado de vitaminas do complexo B. Contudo, a necessidade das mesmas não está clara e varia conforme a espécie/linhagem. Sob condições de crescimento em substrato natural a maioria dos microrganismos sobreviventes à pasteurização pode sintetizar as vitaminas necessárias ao desenvolvimento de *Pleurotus* spp. Em condições de substratos estéreis preconiza-se a incorporação de vitaminas bem como de nitrogênio orgânico. Em

meio líquido *P. ostreatus* precisou de tiamina para crescer, e a adição das outras vitaminas do complexo B não influenciou o crescimento; para *P. sajor-caju* tiamina e biotina foram necessárias; as quantidades também têm influências positivas e negativas em relação ao crescimento (Rajarithnam & Bano, 1988).

Considerando-se o exposto, optou-se por trabalhar em meio mínimo na realização da seleção propriamente dita, pensando-se na viabilidade econômica dos constituintes dos meios para trabalhos posteriores com o efluente líquido. Além disso, esse meio foi utilizado por Balan (1998) e por Balan & Monteiro (2001) para estudos de descoloração de corante têxtil por basidiomicetos mostrando resultados satisfatórios.

5.8. Seleção das espécies/linhagens de *Pleurotus* capazes de descolorir os corantes índigo e preto enxofre em meio mínimo

Com base no maior comprimento de onda do espectro de cada um dos corantes calculou-se o percentual de descoloração e, as diferenças quanto à fonte de carbono foram avaliadas com relação ao peso do micélio. Calculando-se a razão da descoloração (absorbância entre o maior e menor comprimento de onda) obteve-se dados relativos à capacidade de degradação dos corantes pelos basidiomicetos estudados.

As espécies/linhagens de *Pleurotus* mais eficientes quanto à descoloração do corante índigo foram CCB 394, POS 98/37, CCB 001 e PSC 94/03, com médias variando de 93,07% a 85,79% (Tabelas 7,8,9,10,11 e 12 - apêndice 2). No entanto, estas não diferiram estatisticamente das espécies/linhagens POS 98/36, POS 98/33, CCB 020 e *Pleurotus* sp (origem Tailândia), cujas médias estiveram entre 84,00% a 76,27% (Tabela 13, apêndice 2), após 12 dias de incubação à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, em cultivo estático.

Os resultados da análise de variância mostraram que houve diferenças entre as espécies/linhagens quanto ao percentual de descoloração e que o peso

do micélio variou conforme a fonte de carbono utilizada, para ambos os corantes (Quadros 1 e 2, apêndice 2) sendo que a glicose proporcionou crescimento 1,5 a 2 vezes menor que o preto enxofre ou índigo, respectivamente. O pH inicial ajustado para 6,0 caiu para 4,0-5,0, após o crescimento do micélio, independente da fonte de carbono.

As espécies/linhagens de *Pleurotus* mais eficientes quanto à descoloração do corante preto enxofre foram CCB 394, CCB 016 e POS 98/36, com médias variando de 91,72% a 84,66%. No entanto, estas não diferiram estatisticamente das espécies/linhagens POS 98/33, POS 98/37, CCB 001, PSC 94/03, CCB 517 e CCB 507, cujas médias estiveram entre 74,39% a 66,76% (Tabela 14, apêndice 2).

As espécies/linhagens que apresentaram as menores taxas de descoloração e que diferiram das médias acima mencionadas foram CCB 440, CCB 068 e CCB 396 e CCB 440 e CCB 068, para corante índigo e preto enxofre, respectivamente (Tabelas 13 e 14, apêndice 2).

Quanto ao peso do micélio em relação à fonte de carbono e a correlação desse com o percentual de descoloração, avaliou-se que para o corante índigo houve diferença estatística quanto à fonte de carbono em relação ao peso do micélio e essas diferenças foram observadas na presença de glicose (Tabela 15, apêndice 2), provavelmente devido a diferenças genéticas entre as espécies/linhagens estudadas. Entretanto, não se pôde correlacionar peso do micélio e percentual de descoloração uma vez que não houve diferenças estatísticas entre as espécies/linhagens quando a fonte de carbono era o corante (Tabela 16, apêndice 2). No caso do corante preto enxofre as diferenças estatísticas entre as espécies/linhagens foram observadas tanto quando a fonte de carbono era a glicose ou o corante (Tabelas 18 e 19, apêndice 2). Tanto para o corante índigo quanto para o corante preto enxofre os maiores pesos de micélio foram observados quando a fonte foi glicose (Tabelas 17 e 20, apêndice 2).

Não se pôde correlacionar estatisticamente maior peso do micélio com maior percentual de descoloração para o corante índigo, embora pareça haver

uma tendência do menor peso de micélio estar relacionado ao maior percentual de descoloração (Figura 12). No caso do corante preto enxofre, o contrário parece ser verdadeiro (Figura 13).

Estes resultados podem estar indicando uma maior toxicidade do corante índigo em relação ao corante preto enxofre e/ou disponibilidade constitutiva das enzimas necessárias à utilização desse corante. No entanto, para ambos corantes observou-se que as espécies/linhagens com menores percentuais de descoloração foram CCB 440, CCB 068 e CCB 396, as duas últimas apresentaram menor peso de micélio e a espécie/linhagem CCB 440 embora tenha apresentado valores intermediários de peso do micélio na presença dos corantes apresentou diferenças estatísticas quando a fonte de carbono foi glicose, onde houve maior crescimento assim como para a espécie/linhagem CCB 068, o que indica a toxicidade de tais corantes, confirmando os resultados obtidos para essas espécies/linhagens em meio sólido; no caso da espécie/linhagem CCB 396 não houve diferenças estatísticas em relação à fonte de carbono, sendo portanto uma característica de menor crescimento, também observado em meios sólidos.

Em relação à razão de descoloração do corante índigo (Quadro 3, apêndice 2), os resultados obtidos apontam diferenças estatísticas quando comparados aos controles (meio mínimo com corante não inoculado). No caso das espécies/linhagens CCB 396, CCB 068 e CCB 507, essas diferenças podem indicar, segundo Glenn & Gold (1983), que estas puderam degradar o corante em alguma extensão, embora tenham apresentado os menores peso de micélio e menores percentuais de descoloração (entre 58,69% - 14,65% e 13,43%), estatisticamente significativos. Para o restante das espécies/linhagens que apresentaram descoloração a remoção da cor deu-se por adsorção do corante ao micélio (Tabela 21, apêndice 2). As observações visuais confirmaram esse fato, entretanto as espécies/linhagens onde pode ter havido alguma degradação também se observou adsorção do corante ao micélio.

O mesmo não foi observado com relação ao corante preto enxofre, onde os

resultados estatísticos apontam que a descoloração deu-se, para todas as espécies/linhagens, por adsorção do corante ao micélio, uma vez que tais resultados não diferem dos controles (Tabela 22, apêndice 2). Tais dados foram confirmados também visualmente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Knapp et al. (1995) e Swamy & Ramsay (1999a). Knapp et al. (1995) estudando a descoloração/degradação de 14 corantes, concluiu que a descoloração pode estar associada à adsorção do corante à biomassa fúngica e, nesse caso quando a adsorção ocorreu, o exame do espectro de absorção da luz revelou que todos os picos tinham diminuído proporcionalmente, em igualdade entre si e, quando a degradação ocorreu houve completa remoção dos picos ou mudanças significativas no espectro. A adsorção também foi visualizada na inspeção da massa micelial colorida; todos os basidiomicetos estudados acidificaram o meio e o pH ficou entre 4,0 e 5,0.

Estudos de degradação da lignina, em meio líquido, por *Pleurotus* spp revelaram que, no geral, há necessidade da disponibilidade de oxigênio, mas o cultivo estático favorece a melhor degradação; as carências de uma fonte de nitrogênio e temperatura, entre 25-30°C, também foram necessárias e, a suplementação com glicose aumentou a atividade ligninolítica (Commanday & Macy, 1985; Rajarathnam & Bano, 1989).

Na degradação de corantes também foi observado que uma fonte primária de carbono, como a glicose, é essencial para descoloração extensiva de alguns corantes embora outros tenham sido metabolizados como única fonte de carbono (Kirby et al., 1995).

No presente estudo os corantes foram empregados como única fonte de carbono que, de algum modo, favoreceu o crescimento do micélio, porém, pelo menos a estrutura do cromóforo permaneceu igual ao controle para maioria das espécies/linhagens quanto à utilização do índigo e para todas, no caso do corante preto enxofre.

Considera-se que ambas as fontes - nitrogênio e carbono empregadas em meio mínimo, são adequadas para o crescimento desses fungos (Rajarathnam & Bano, 1988). Porém, o problema da não degradação do corante em sua totalidade pode estar relacionado à concentração das fontes de carbono e nitrogênio. Resultados obtidos por Kim et al. (1996) mostram que, em meio líquido, a limitação em nitrogênio pode estar associada à maior atividade ligninolítica, responsável pela descoloração do corante RBBR. No entanto, Platt et al. (1985) concluiu que o crescimento do inóculo em material lignocelulósico pode ser mais relevante que mudanças nas concentrações de glicose e nitrogênio, embora uma concentração baixa de nitrogênio tenha favorecido a descoloração do "poly blue".

Um outro problema relacionado com a falta de degradação dos corantes empregados pode ser conseqüência da concentração dos mesmos. Young & Yu (1997) observaram que, dependendo da estrutura do corante, concentrações acima de 10-125 mg/L foram críticas para *Phanerochaete chrysosporium*. No entanto, concentrações de 0,2 g a 0,5 g.L⁻¹ foram empregadas na degradação de vários corantes poliméricos sem que esse parâmetro fosse implicado com resultados negativos (Glenn & Gold, 1983; Platt et al., 1985; Kirby et al., 1995).

Das considerações acima, ainda, pode-se concluir também que o menor peso do micélio obtido foi conseqüente da menor quantidade de carbono, insuficiente na geração de energia e construção estrutural. O mesmo aconteceu com o nitrogênio, determinando menor síntese de glucosamina, constituinte da parede celular das hifas.

Dos resultados obtidos selecionou-se a espécie/linhagem CCB 394 para estudos posteriores variando-se a concentração de glicose e nitrogênio no meio mínimo e, as espécies/linhagens CCB 394 e PSC 94/03 para estudo da biodegradabilidade imediata, conduzidos em paralelo.

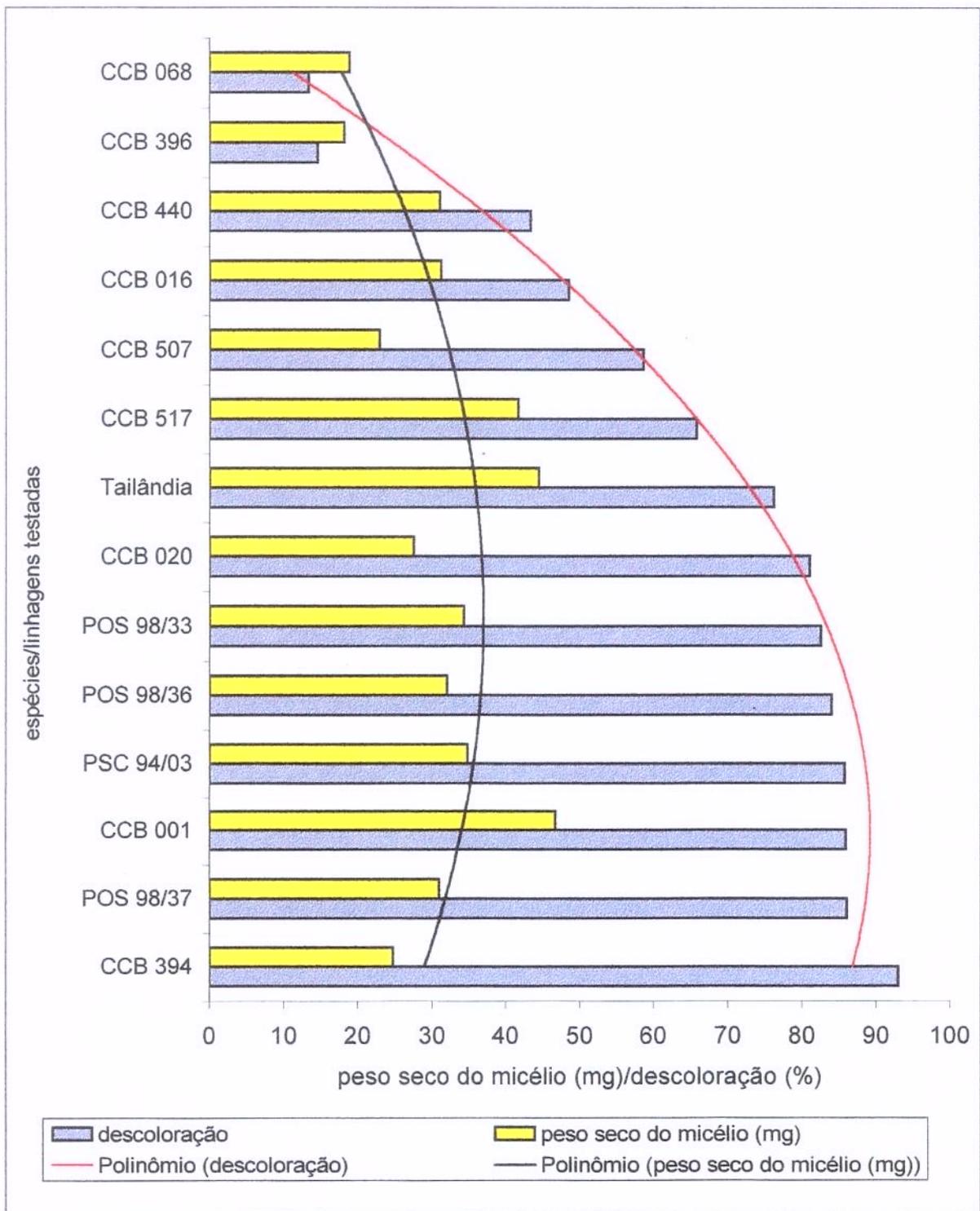


Figura 12. Peso do micélio e percentual de descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp, em meio líquido.

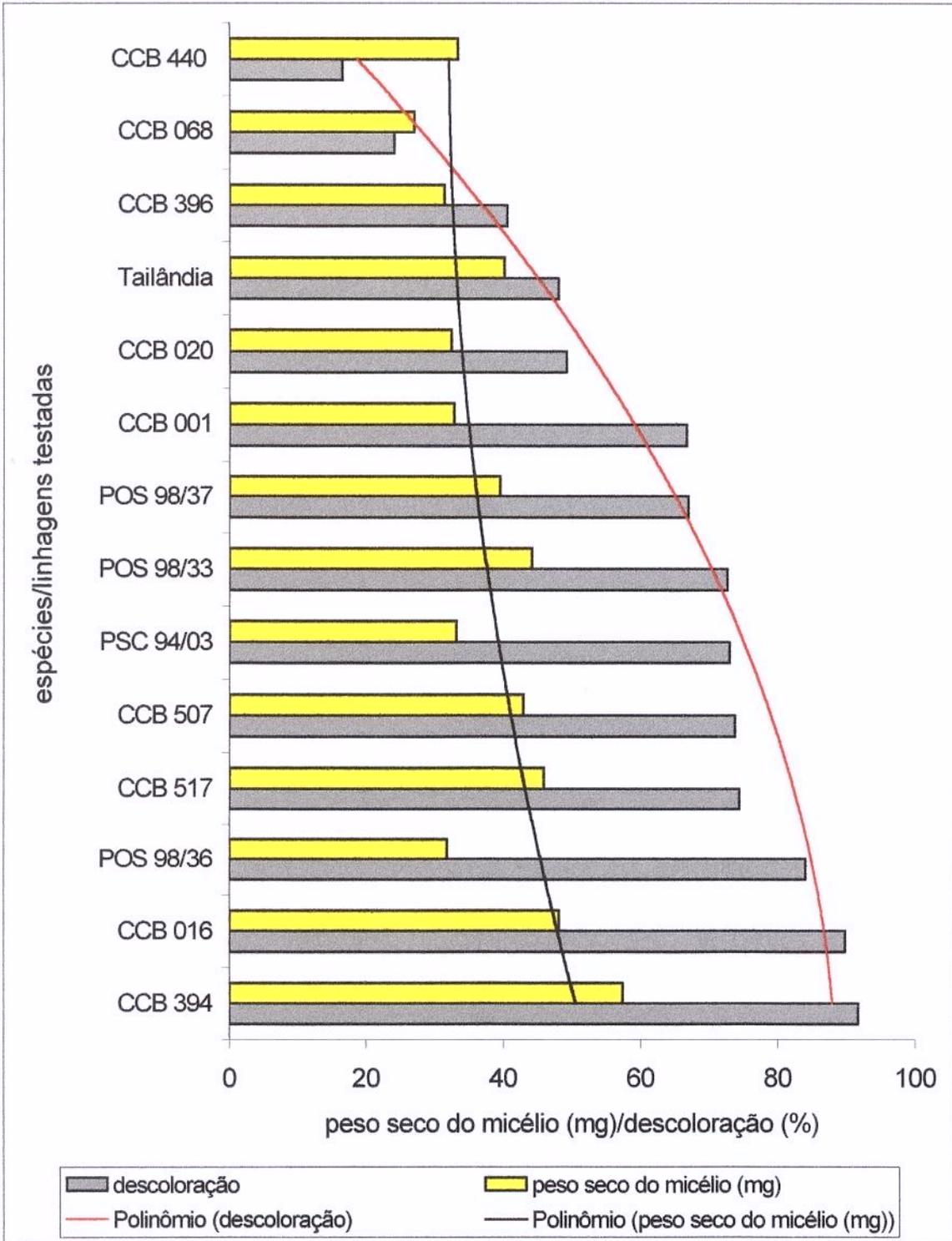


Figura 13. Peso do micélio e percentual de descoloração do corante preto enxofre por *Pleurotus* spp, em meio líquido.

5.9. Avaliação do crescimento e produção de enzimas ligninolíticas da espécie/linhagem CCB 394 em meio líquido com diferentes concentrações de nitrogênio, na presença dos corantes índigo e preto enxofre.

O crescimento e descoloração/degradação dos corantes índigo e preto enxofre foram testados em meio mínimo com o *Pleurotus flabellatus* CCB 394. Empregou-se nessas condições 2 g de glicose/L na presença e ausência dos corantes. Dos resultados obtidos com peso do micélio (Tabela 23 e 24, apêndice 2) observou-se que, na presença dos corantes, o crescimento foi maior quando se manteve a concentração de NaNO_3 de $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ do que quando foi diminuída em 10 vezes (Figura 14). Embora se tenha trabalhado com duplicatas independentes ao longo do período de incubação, observou-se que esse peso de micélio tende a se estabilizar logo após 3 dias de incubação, indicando toxicidade e/ou falta de nutrientes, mais evidente no caso do corante índigo.

Com relação à fonte de carbono, observou-se que a presença da glicose, com corante, resultou em maior peso do micélio quando comparado ao meio apenas com glicose, para ambos os corantes e mais evidente quando o meio tinha a concentração original de nitrogênio, evidenciando a necessidade de adição da glicose ao meio com corante, como já discutido.

Quanto aos resultados obtidos apenas com a glicose, como fonte de carbono (controles), estes se mostraram inconsistentes, pois dependendo do tempo de incubação houve variação na resposta, mesmo em se considerando que esses controles eram iguais para ambos os corantes, obteve-se respostas diferentes num mesmo período avaliado, mostrando que há problemas também quanto ao inóculo empregado, ou seja, há diferenças relacionadas às hifas em desenvolvimento, embora tenham sido retiradas das bordas de uma mesma cultura crescida em MEA e observadas as características rizomórficas do micélio em questão. Desses resultados, pode-se inferir que em sendo um substrato líquido, não natural para esses basidiomicetos, e trabalhando-se com micélio dicariótico, a resposta à adaptação ao novo substrato foi diferente, também observado na seleção inicial quando houve

diferenças na resposta de peso do micélio quando a glicose foi empregada como única fonte de carbono.

Dados relativos à descoloração/degradação dos corantes não puderam ser evidenciados empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência. Nenhuma das condições empregadas pode resultar em separação dos picos cromatográficos que evidenciasse a presença dos corantes e/ou produtos da degradação. Resultados obtidos empregando-se como fase móvel a acetonitrila, vazão 0,4 mL/minuto e comprimento de onda de 210 nm, para ambos os corantes, demonstraram que os picos obtidos correlacionavam-se ao controle (meio não inoculado, sem os corantes). Concluiu-se que o tratamento necessário na obtenção do extrato resultava na eliminação dos corantes do meio de cultura que ficavam aderidos ao micélio e foram eliminados do sobrenadante no processo de centrifugação. Devido a essa constatação os dados não foram apresentados.

A atividade enzimática medida durante o período de incubação (Tabela 25, apêndice 2) não foi significativa, o que demonstra que o processo de descoloração/degradação ocorreu por adsorção ao micélio, visualmente constatado nesse e no experimento anterior, ainda que possa ter havido alguma utilização do corante para o crescimento, novamente, pelo menos a estrutura molecular do cromóforo não foi utilizada.

Na degradação de corantes em meio líquido a lacase foi implicada como a enzima ligninolítica responsável (Freitag & Morell, 1992; Kaal et al., 1995; Rodriguez et al., 1999) e, a atividade foi máxima quando o meio de cultura não foi limitante em nitrogênio e a fonte foi a peptona (Kaal et al., 1995). A interação entre a lacase e a manganês peroxidase foi detectada por Lang et al. (1996).

As atividades da lacase e peroxidase foram mínimas ou não detectadas e a atividade da manganês peroxidase, expressa nos 3 primeiros dias de incubação, também não foi significativa comparada a resultados obtidos por outros pesquisadores que trabalharam com os extratos das enzimas ligninolíticas de

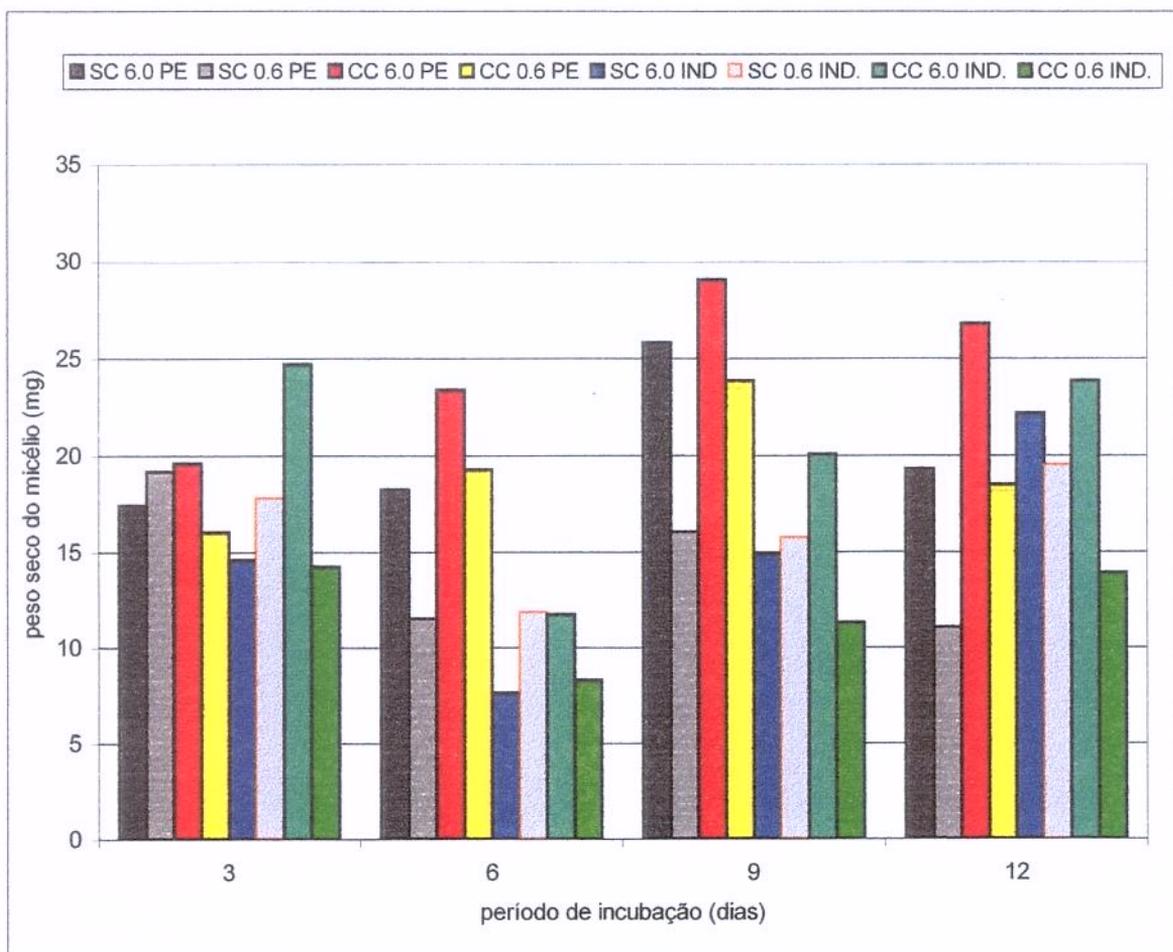


Figura 14. Cultivo estático de CCB 394 em meio mínimo com 2 g de glicose e 6,0 g NaNO₃ e com 2 g de glicose e 0,6 g NaNO₃ com corante (CC) e sem corante (SC) - preto enxofre (PE) e índigo (IND.)

Pleurotus sp e outros basidiomicetos (Heinfling et al., 1998; Rodriguez et al., 1999).

Heinfling et al. (1998) constatou que na degradação de corantes industriais poliméricos (entre os quais o “reactive blue” e “reactive black”) a principal enzima responsável pela degradação foi a manganês peroxidase produzida por *Bjerkandera adusta* e *Pleurotus eryngii*. Neste estudo os fungos foram crescidos nos meios glicose amônia e glicose peptona, respectivamente e, seus extratos foram acrescidos dos corantes para observação da degradação.

Contudo, Rodrigues et al. (1999) observaram que extratos obtidos de vários basidiomicetos, entre eles o *Pleurotus ostreatus*, crescidos em grãos de trigo e cevada integrais, quando comparados aos extratos obtidos em meio líquido complexo apresentavam maior capacidade de descoloração de corantes industriais (ao todo 23 estudados). A atividade de produção da lacase foi 7,5 vezes maior em extrato de meio sólido que em extrato de meio líquido e a atividade de descoloração do “reactive blue” foi 23 vezes mais alta nas mesmas condições. Nenhuma atividade de lignina peroxidase ou aril álcool oxidase foi detectada nos sobrenadantes de *P. ostreatus*.

Além disso, Rodrigues et al. (1999) concluíram que embora as lacases de diferentes fontes tenham muitas propriedades em comum, existem diferenças catalíticas entre elas. Comparando-se a atividade das lacases obtidas dos extratos de crescimento, em meio sólido, de *Trametes hispida*, *T. versicolor*, *Pleurotus eryngii* e *P. ostreatus*, observaram que a lacase de *T. hispida* foi capaz de descolorir *in vitro* 11 dos 23 corantes estudados, enquanto que a lacase de *P. ostreatus*, nas mesmas condições, foi capaz de oxidar somente 5 dos 11 corantes testados. Segundo os autores, as diferenças de especificidade ao substrato entre as lacases, purificadas de ambos os microrganismos, podem ser explicadas por diferenças nas seqüências de aminoácidos e, não parecem estar relacionadas às condições culturais. Os resultados também mostraram que existem outros sistemas enzimáticos em *P. ostreatus* envolvidos na descoloração de corantes em

culturas *in vivo*, tais como citocromos P450 ou peroxidases.

Dessas considerações e resultados obtidos concluiu-se que o meio líquido, pensando-se na descoloração do efluente líquido, de um modo geral, não parece ser a condição ideal para descoloração/degradação dos corantes. A imobilização de enzimas obtidas do crescimento de basidiomicetos em material lignocelulósico, produtores principalmente de lacases, parece indicar o modo mais eficiente no tratamento do efluente líquido.

5.10. Teste de biodegradabilidade imediata em sistema aberto

A biodegradabilidade imediata do corante índigo empregando como inóculo o lodo do esgoto e o lodo da estação de tratamento de lodo ativado da indústria têxtil, que emprega esse corante no tingimento do algodão, não pôde ser constatada em estudo conduzido por Balan (1998). Contudo, o estudo foi considerado válido pelos resultados obtidos com o tratamento inibição (glicose mais corante) e tratamento com o padrão biodegradável (glicose).

Considerando-se tais resultados com o corante índigo e os resultados preliminares em meio mínimo, obtidos neste estudo, conduziu-se um ensaio de biodegradabilidade imediata empregando-se como inóculo a espécie/linhagem CCB 394. Os resultados obtidos não alcançaram aqueles esperados embora tenham sido validados, pois o tratamento com o padrão biodegradável atingiu 70% de CO₂ desprendido em 10 dias contados a partir do dia em que alcançou 10%, e alcançou 94,91% aos 28 dias de incubação, quando foi obrigatoriamente encerrado, conforme metodologia empregada.

Com relação aos corantes, não se observou a descoloração no período de incubação, mas houve evolução de 53,43% e 38,06% de CO₂ dos corantes preto enxofre e índigo, respectivamente. Tais percentuais levam à interpretação de que estes corantes não são facilmente biodegradáveis pela ação desse basidiomiceto, porém são passíveis de alguma biodegradação (Tabela 26, apêndice 2). No

entanto, quando se observa a variação entre as duplicatas, e se considera os valores obtidos após o desconto do branco mais inóculo (preparado a partir de grãos de trigo inoculados, portanto também com algum carbono), concluiu-se que os corantes podem não ter sofrido biodegradação nesse sistema apenas por ação do fungo, mas também pela presença de outros microrganismos presentes na água e que, parte do CO₂ evoluído deveu-se ao consumo do carbono proveniente do grão de trigo. A presença de outros microrganismos presentes na água foi constatada a partir do crescimento observado em ágar nutriente de uma alíquota retirada do sistema.

Considerando-se os valores obtidos pela glicose entende-se que a quantidade de inóculo preparada foi adequada, no entanto, para os tratamentos com os corantes, não suficiente ou que os mesmos não puderam ser empregados como fonte de carbono (Tabela 27, apêndice 2).

No ensaio conduzido com a espécie/linhagem PSC 94/03 o inóculo foi preparado em meio mineral estéril e o micélio separado de modo a minimizar ao máximo uma fonte de carbono externa. Os resultados obtidos estão na Tabela 28 (apêndice 2). Novamente o teste foi validado com relação ao padrão glicose e, os corantes empregados não puderam ser utilizados de modo eficiente como fonte de carbono e, a descoloração novamente não foi constatada (avaliação visual). A biodegradação alcançada pelo corante índigo (5,97%) não foi significativa e apresentou-se abaixo dos 20%, percentual necessário para que o corante índigo seja avaliado em sistemas de biodegradabilidade inerente, como aconteceu com o corante preto enxofre que alcançou 20,48% de evolução de CO₂ (OECD, 1997). A mistura dos dois corantes resultou em diminuição da biodegradação (16,54%) comparado à alcançada pelo corante preto enxofre, podendo indicar que o índigo pode exercer alguma toxicidade aos microrganismos do meio.

Um outro aspecto diz respeito a aeração constante do sistema que pode ter inibido o desenvolvimento adequado do micélio, uma vez que as espécies/linhagens de *Pleurotus* crescem melhor sob cultivo estático.

Em vista dos resultados obtidos, preparou-se um estudo com algumas das espécies/linhagens que alcançaram os melhores percentuais de descoloração na seleção inicial em meio mínimo, empregando-se o meio mineral estéril e não esterilizado, simulando o ensaio de biodegradabilidade, em cultivo estático.

5.11. Avaliação dos resultados de biodegradabilidade imediata em cultivo estático empregando-se meio estéril e não esterilizado

Com o objetivo de buscar subsídios para melhor entender os resultados obtidos na biodegradabilidade imediata, um experimento empregando-se o mesmo meio de cultura, concentração de corante e inóculo foi elaborado com 7 espécies/linhagens de *Pleurotus*.

O experimento foi dividido em dois grupos, um grupo onde o meio foi esterilizado e outro grupo sem esterilização (nas mesmas condições do teste de biodegradabilidade). Os resultados do percentual de descoloração do corante índigo, peso seco do micélio e pH estão expressos na Tabela 29 (apêndice 2). A Figura 15 ilustra e compara os percentuais de descoloração obtidos.

De um modo geral a descoloração foi maior em meio não estéril do que em meio estéril e, não se pode correlacionar ao peso do micélio, o que confirma a presença de outros microrganismos envolvidos no processo.

Várias culturas bacterianas têm sido identificadas na descoloração de corantes tais como *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas cepacia*, *P. luteola*, *P. stutzer* além de actinomicetos como *Streptomyces*; em todas as culturas bacterianas envolvidas no processo a azoredutase foi identificada como a responsável, contudo a atividade desta é significativamente maior em sistemas anaeróbicos (Banat et al., 1996).

Neste experimento constatou-se que a descoloração ocorreu, em parte,

pela adsorção do corante ao micélio dos fungos e precipitação do mesmo (dados de avaliações visuais). Variações entre as triplicatas para peso do micélio e percentual de descoloração foram observadas. Considerando-se o peso do micélio e seu crescimento submerso, nessas condições de inoculação, pode-se inferir que a aeração no sistema de biodegradabilidade não foi adequada para o desenvolvimento dos basidiomicetos testados, pois naquele sistema o desenvolvimento do micélio não foi observado em nenhuma das condições de inoculação empregadas.

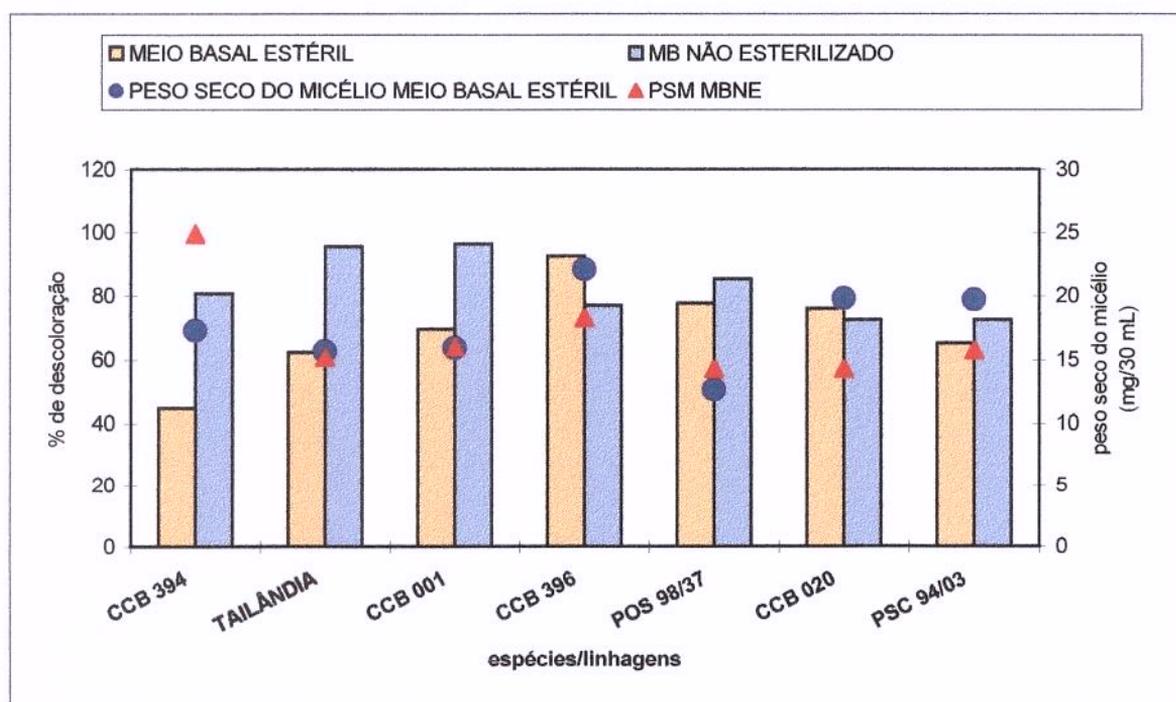


Figura 15. Percentual de descoloração do corante índigo e peso seco do micélio de *Pleurotus* spp.

A espécie/linhagem CCB 394 também, neste ensaio, em comparação com as outras testadas não pôde descolorir o corante, em meio estéril, apresentando, o menor percentual de descoloração, o que não ocorreu em meio não estéril, o que confirma a presença de outros microrganismos envolvidos no processo, exceção observada apenas para a espécie/linhagem CCB 020 quando os percentuais foram semelhantes.

Dos resultados obtidos com meio líquido, nas condições adotadas neste estudo e, dada à complexidade e interação dos vários fatores que influenciam o processo de descoloração/degradação de corantes em meio líquido e, considerando-se que a natureza desses basidiomicetos é a degradação de materiais lignocelulósicos em estado sólido, optou-se por investigar a degradação do resíduo sólido onde também resultados promissores foram obtidos.

5.12. Degradação do substrato – lodo (resíduo sólido) acrescido de resíduos lignocelulósicos

As Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados das avaliações físico-químicas realizadas nos substratos colonizados e nos controles (substratos não inoculados).

Tabela 1. Potencial hidrogeniônico dos substratos colonizados e dos controles no início e final do período de incubação

Período de avaliação	Amostras		
	Controle	PSC 94/03	CCB 020
Inicial (lodo)	12 – 13	-	-
7 dias	8,14	6,84	7,85
14 dias	8,34	6,58	6,13
21 dias	8,04	6,04	6,22
30 dias	8,15	6,18	5,93

Controle = substrato não inoculado; PSC 94/03 = substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03; CCB 020 = substrato colonizado pela linhagem CCB 020

Tabela 2. Teor de carbono e nitrogênio e, respectivas relações (C/N), nos substratos e controles no início e no final do período de incubação (28-30 dias).

Período de avaliação/substrato		Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Relação C/N
inicial	Controle	31,89	1,0042	31,76
	CCB 020	34,34	1,2583	27,45
	PSC 94/03	30,99	1,0500	29,52
28-30 dias	Controle	30,78	0,8836	34,78
	CCB 020	28,06	1,2773	21,97
	PSC 94/03	27,42	1,3497	20,31

Controle = substrato não inoculado; PSC 94/03 = substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03; CCB 020 = substrato colonizado pela linhagem CCB 020.

Tabela 3. Resultados analíticos da avaliação da DQO, fenóis, magnésio, fósforo e potássio dos substratos colonizados e controles, no final do período de incubação

Amostra	DQO (mg/kg)	Fenóis (mg/kg)	Fósforo (mg/kg)	Magnésio (mg/kg)	Potássio (mg/kg)
Controle	334	0,22	18	113	485
PSC 94/03	173	0,09	6	132	589
CCB 020	143	0,08	14	130	530

controle = substrato não inoculado; PSC 94/03 = substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03; CCB 020 = substrato colonizado pela linhagem CCB 020.

Tabela 4. Resultados analíticos da avaliação de açúcares totais, Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA) e umidade, no final do período de incubação.

Amostra	Açúcares Totais (% p/p)	FDN (% p/p)	FDA (% p/p)	Umidade (%)
Controle	18,30	56,07	43,49	75,88
PSC 94/03	15,88	32,00	24,37	75,20
CCB 020	15,98	33,80	25,40	74,60

controle = substrato não inoculado; PSC 94/03 = substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03; CCB 020 = substrato colonizado pela linhagem CCB 020.

Tabela 5. Percentual de redução dos parâmetros avaliados em relação ao controle.

Amostra	DQO (%)	Fenóis (%)	FDN (%)	FDA (%)
PSC 94/03	57,19	63,64	39,72	41,59
CCB 020	48,20	59,09	42,93	43,96

controle = substrato não inoculado; PSC 94/03 = substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03; CCB 020 = substrato colonizado pela linhagem CCB 020.

Avaliação prévia da DQO do lodo da indústria resultou em valor médio de 38.600 mg/kg. Resultados obtidos junto ao fabricante do corante preto enxofre sobre a avaliação da DQO em efluente líquido mostram que esse, após tratamento por lodo ativado, reduz-se em 83,2% (inicial no equalizado era de 1.381,35 e reduziu-se para 232,2 mg/L). Esses dados mostram que o lodo, resíduo sólido que tem cerca de 80% de umidade e pH ao redor de 12, carrega grande parte dos corantes e outros produtos químicos por adsorção, fato discutido por Zollinger (1988).

Resultados fornecidos pela indústria das características físico-químicas do lodo coletados em várias épocas (período de 2 anos) mostram que o pH varia de 9,0 a 11,4, o nitrogênio total está ao redor de 1% (p/p), fósforo total varia entre 837 – 1.903 mg P/kg, potássio entre 729 – 1.525 mg/kg, metais pesados como cádmio, arsênio, molibdênio, níquel e chumbo encontram-se abaixo do limite de detecção (0,1 mg/kg) ou eventualmente presentes como cádmio (0,86 mg/kg), cromo (7,56 mg/kg), mercúrio (2,91 mg/kg) e zinco (28 mg/kg). Parâmetros microbiológicos exigidos pela CETESB (1999) como salmonelas, coliformes totais e fecais estão ausentes.

O lodo, misturado aos resíduos lignocelulósicos, mostrou-se um substrato adequado para crescimento das linhagens estudadas, com redução em fibras, representadas pelas frações FDN/FDA, em cerca de 40% (Tabela 5). A utilização do lodo, e conseqüentemente dos corantes presentes, pode ser evidenciada pela diminuição da DQO em 57,19% para substrato colonizado pela linhagem CCB 020 e 48,20% pela PSC 94/03 - também resultante, provavelmente, do tratamento prévio de pasteurização do substrato, evidenciado pela diminuição de fenóis em cerca de 60%.

Avaliações visuais mostraram que, no final dos 30 dias de crescimento do micélio, os substratos estavam totalmente colonizados e prontos para dar origem aos corpos de frutificação devido à presença de grande quantidade de primórdios; não havia presença de material colorido do lodo e o odor característico desses fungos deu lugar ao odor amoniacal típico desse resíduo sólido de lagoas de tratamento biológico (Figura 16).

A diminuição do pH, da relação C/N e umidade dos substratos (Tabelas 1, 2 e 4) também estiveram adequadas às necessidades desses basidiomicetos, açúcares e minerais avaliados não sofreram alterações significativas com exceção do fósforo para linhagem PSC 94/03 (Tabelas 3 e 4). A presença de magnésio, fósforo, potássio e cálcio constatadas no substrato original é necessária ao crescimento e frutificação de *Pleurotus* spp (Rajaratnam & Bano, 1988).

A capacidade do micélio de *Pleurotus* spp em crescer em inúmeros materiais lignocelulósicos é atribuída à sua habilidade de produzir uma largo espectro de enzimas hidrolíticas e oxidativas, entre as quais destacam-se as celulolíticas, hemicelulolíticas, lignolíticas, proteolíticas e sacarcolíticas. Entre as oxidativas estão as fenoloxidasas do tipo lacases, peroxidases e catalases. Neste trabalho as avaliações feitas relacionam-se às enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação da lignina e que têm sido responsabilizadas pela descoloração/degradação de corantes poliméricos.

Com relação à atividade enzimática nos substratos colonizados e controles, durante o período de incubação, os resultados obtidos para peroxidases, lignina peroxidases, lacases e manganês peroxidases estão apresentados nas Tabelas 30,31,32 e 33 (apêndice, 3) e estão expressos graficamente nas Figuras 17, 18, 19 e 20.



Figura 16. Substratos colonizados pelas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* - CCB 020 e PSC 94/03, e respectivos controles, no final do período de incubação.

A atividade de lignina peroxidase, como esperado, não pôde ser detectada neste estudo (Figura 17), e considerou-se que não esteve presente durante o período avaliado. Outros trabalhos de degradação da lignina já demonstraram que essa enzima, importante no sistema de *Phanerochaete chrysosporium*, não é produzida por *Pleurotus* spp (Waldner et al., 1988, Kerem et al., 1992, Vyas & Molitoris, 1995). Em espécies/linhagens de *Pleurotus* o papel dessa enzima parece ser exercido pela lacase (Waldner et al., 1988, Kerem et al., 1992; Guillén et al., 1994; Lang et al., 1996).

Neste estudo, uma atividade maior de lacase foi observada no início do período de degradação do substrato em colonização, para ambas linhagens testadas, mais evidente no caso da linhagem PSC 94/03, porém consistentemente produzida durante todo o período de avaliação pela linhagem CCB 020 (Figura 18), com diminuição de sua produção, para ambas, no final do período de incubação.

Estes resultados estão de acordo com o observado em outros estudos (Kerem et al., 1992, Rajarathnam et al., 1992, Akmedova, 1994; Lang et al., 1996). Segundo Kerem et al. (1992), a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Outras enzimas de natureza oxidativa, como as álcool veratril oxidases, podem ter um papel importante na degradação da lignina, catalizando a reação do álcool veratril a veratrildeído, essas oxidases são provavelmente responsáveis pela formação de peróxido de hidrogênio, necessário para atividade de peroxidases (Waldner et al., 1988, Guillén et al., 1994). Diferentes espécies/linhagens de *Pleurotus* variam quanto aos teores de lacase produzida e, a atividade da lacase é regulada durante a morfogênese e, na formação do corpo de frutificação ocorre inativação seguida da proteólise dessa enzima (Wood et al., 1988).

De acordo com Kumaran et al. (1997) a lacase e a manganês peroxidase devem agir em sinergismo. Estudos recentes na descoloração de corantes

industriais, inclusive do indigo, enfatizam o papel dessas enzimas na descoloração, produzidas por espécies/linhagens de *Pleurotus* (Rodrigues et al., 1999, Swamy & Ramsay (1999b).

No presente estudo, a atividade de manganês peroxidase foi maior na linhagem CCB 020, sendo a atividade máxima detectada no 14º dia de incubação (Figura 19). Na degradação do pireno, em substrato lignocelulósico a produção de MnP foi maior entre 20 a 40 dias de incubação, quando a atividade da lacase já havia declinado e, foi nesse período que se verificou as maiores taxas de mineralização desse HPA (hidrocarboneto aromático policíclico) (Lang et al., 1996).

A correlação entre a degradação de HPAs e o corante "poly R - 478" já havia sido descrita e todos os fungos estudados secretaram as enzimas necessárias para atividade peroxidativa implicadas no processo de degradação/descoloração. A manganês peroxidase apresentou uma correlação direta e houve necessidade das oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e peroxidases (Field et al., 1993).

A atividade de peroxidase (Figura 20) também foi detectada, e máxima após 7 dias de incubação, comportando-se de modo similar à lacase, em ambas linhagens testadas. Ou seja, máxima somente no início do período de incubação para a linhagem PSC 94/03, e consistentemente produzida pela linhagem CCB 020, diminuindo gradativamente até o final dos 30 dias avaliados. A atividade dessa enzima também foi implicada com a descoloração *in vitro* do corante RBBR (Kim et al., 1996, Shin & Kim, 1998). Resultados semelhantes foram obtidos com *P. ostreatus* cultivado em bagaço de torta da produção de óleo de algodão. A produção de lacase e peroxidase ocorreu durante a fase exponencial do fungo, subseqüentemente à ação das enzimas celulolíticas foi maior e a celulose rapidamente degradada (Akhmedova, 1994).

Importante ressaltar que houve também produção de peroxidases no substrato controle, não inoculado, resultado provável devido à presença de outros microrganismos sobreviventes ao processo de pasteurização.

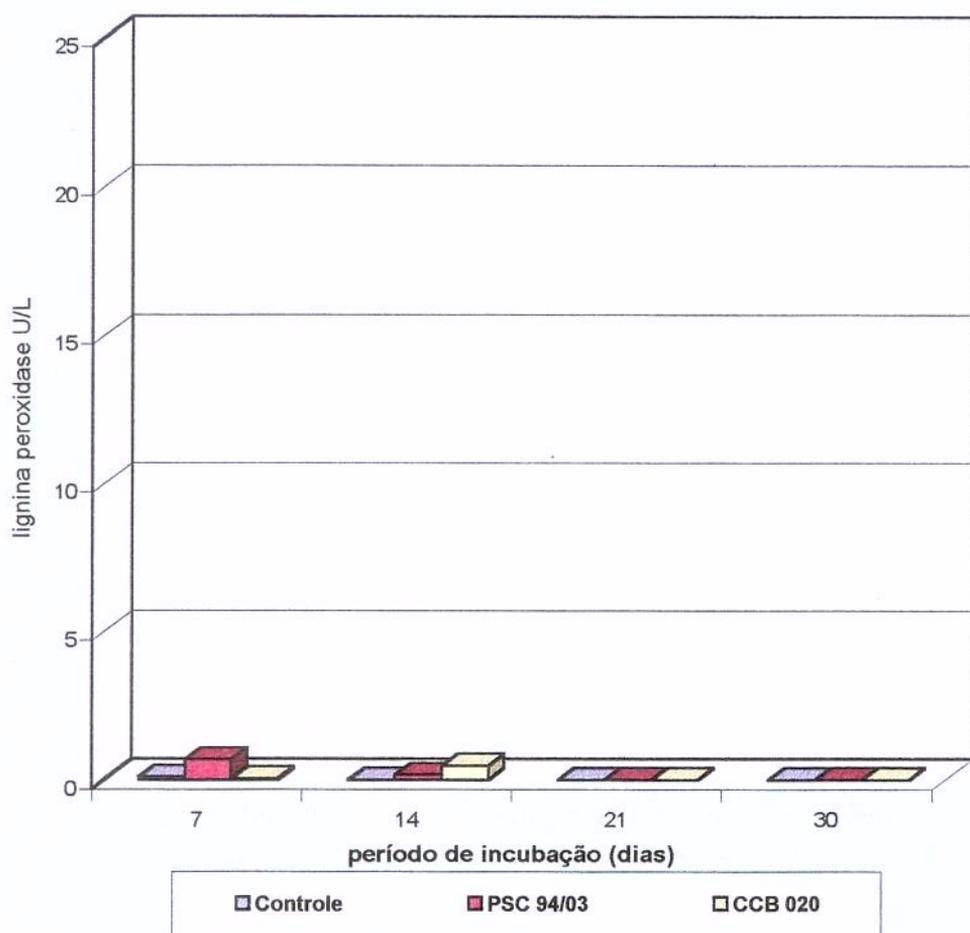


Figura 17. Atividade de lignina peroxidase nos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* – CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação.

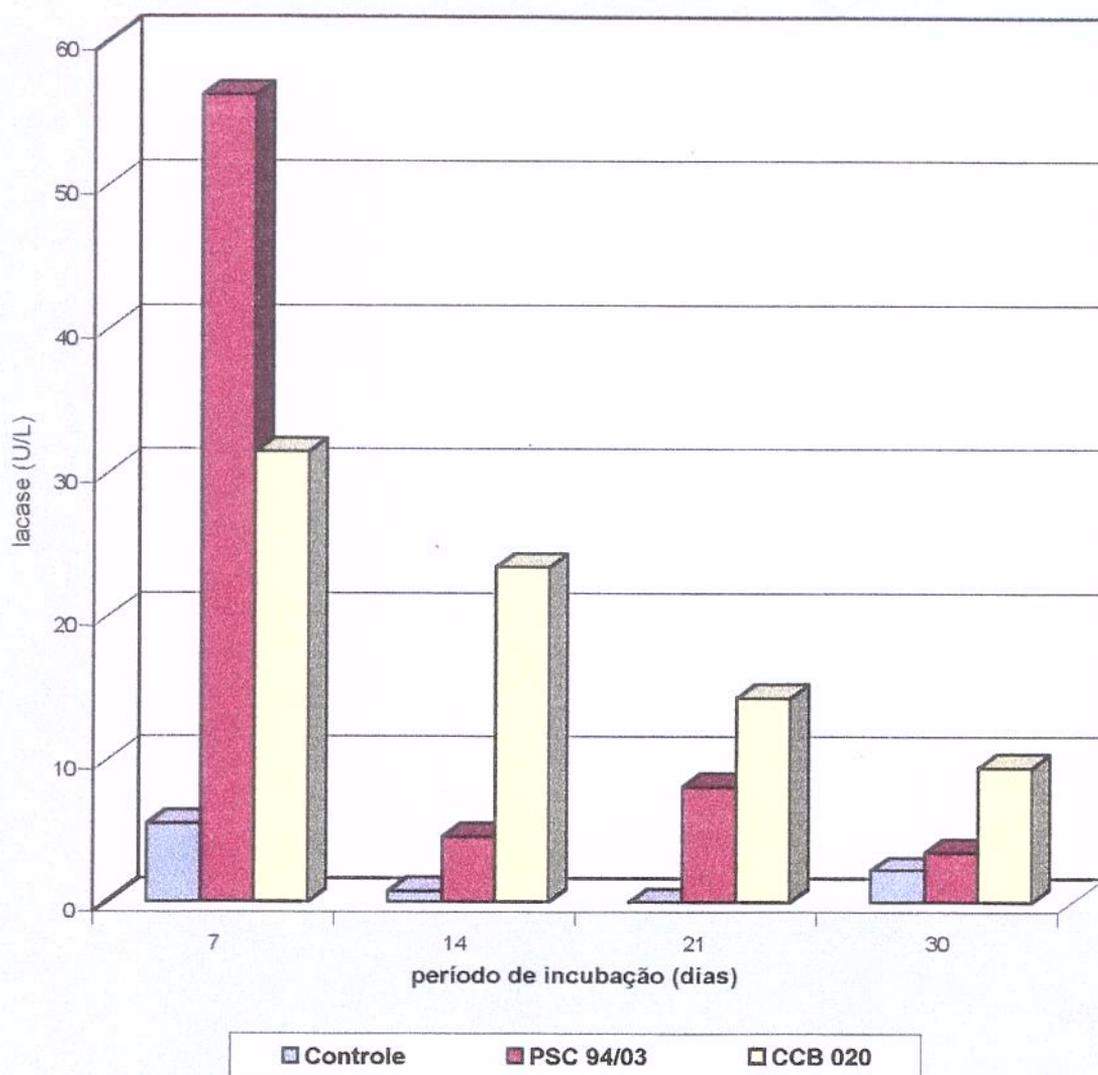


Figura 18. Atividade de lacase nos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* - CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação.

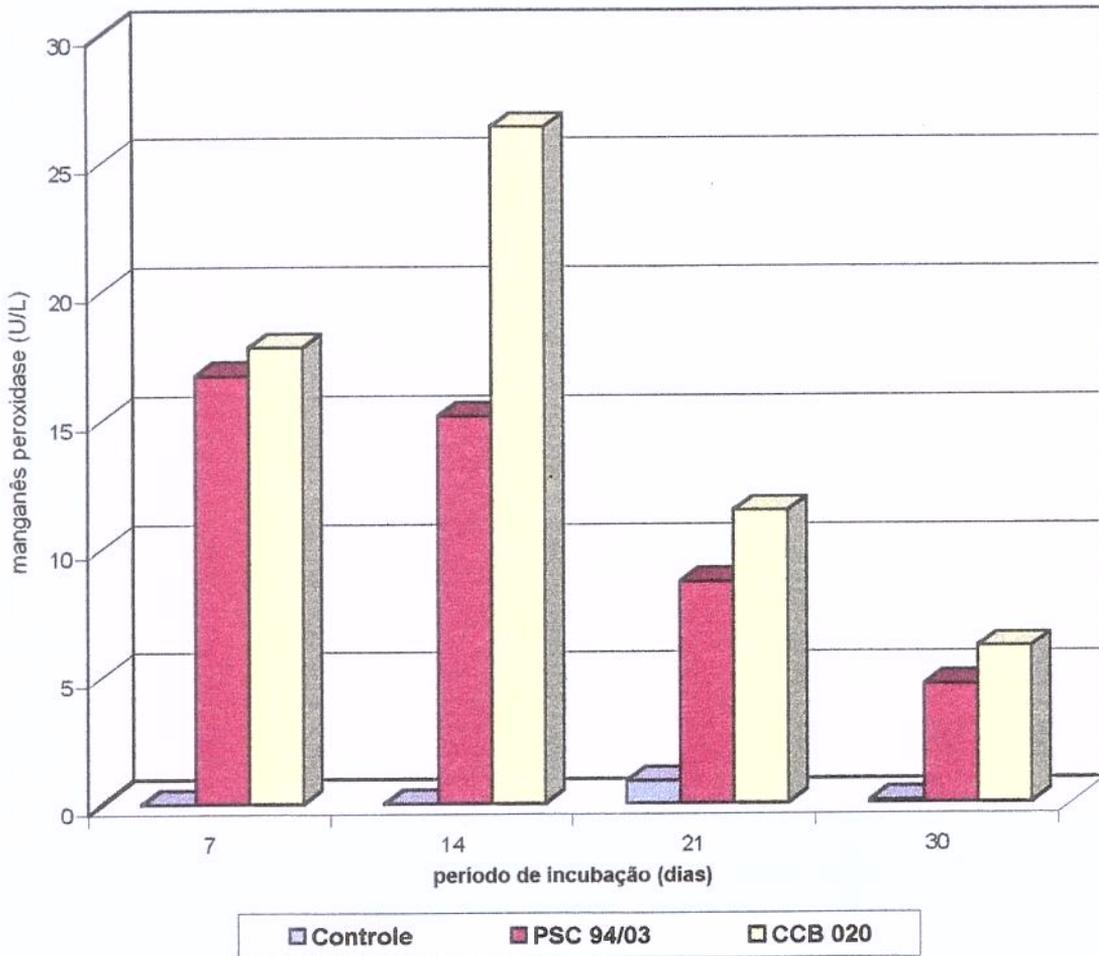


Figura 19. Atividade de manganês peroxidase nos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* - CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação.

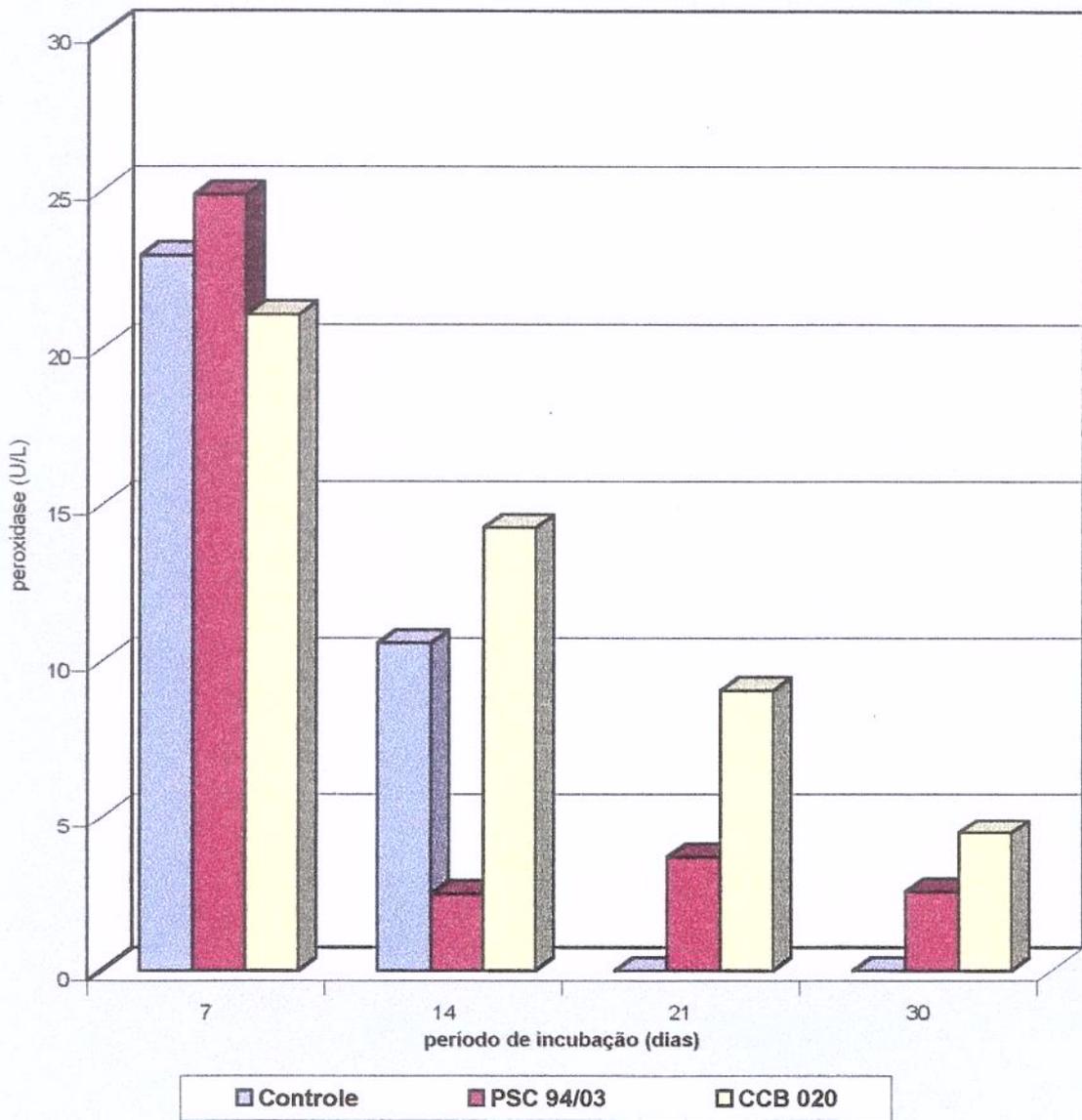


Figura 20. Atividade de peroxidase nos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* - CCB 020 e PSC 94/03, durante os 30 dias de incubação .

Dos dados obtidos e discutidos acima, concluiu-se que as linhagens estudadas puderem crescer e degradar o substrato - lodo mais bagaço de cana e folha de bananeira, resultando em novo composto. O uso de substratos degradados por cogumelos comestíveis como fertilizantes em berçários de mudas dos mais diversos vegetais e como adubo na produção de hortaliças, milho, etc., têm sido preconizado e utilizado em vários países, pois esse material torna-se rico em ácidos húmicos. Contudo, como emprega o lodo resultante do tratamento por lodo ativado de lagoas aeróbicas, da indústria têxtil, vários quesitos são solicitados antes da aplicação ao solo, entre eles o teste de mutagenicidade (CETESB, 1999).

5.13. Avaliação da mutagenicidade dos substratos colonizados pelas linhagens de *P. sajor-caju* – CCB 020 e PSC 94/03

Os resultados obtidos sobre as características genéticas confirmaram que as linhagens de bactérias tinham os genótipos requeridos para o teste de mutagenicidade. O teste de viabilidade das linhagens TA 100 e TA 98 esteve dentro dos limites esperados.

Os controles positivos promoveram um aumento do número de revertentes para todas as linhagens padrão, confirmando a sensibilidade das mesmas.

Sob as condições do ensaio e de acordo com os resultados obtidos, a amostra denominada Amostra Controle não apresentou potencial de atividade mutagênica para as linhagens TA 100 e TA 98 de *Salmonella typhimurium*. Os dados relativos à contagem do número de revertentes por placa e subsequente análise estatística dos mesmos estão apresentados no apêndice 3.

Com relação à amostra denominada PSC 94/03, as concentrações testadas da amostra não promoveram aumento no número de revertentes, em comparação ao controle, para a linhagem TA 100, sem ativador metabólico. Para a TA 98,

observou-se um aumento no número de revertentes, na ausência e presença de ativador metabólico, tendo, portanto, a substância teste potencial mutagênico. As Tabelas 6 e 7 relacionam o número de revertentes/mg de MOE obtidos com a linhagem TA 98, na ausência e presença de ativador metabólico. Os dados relativos à contagem do número de revertentes por placa e subsequente análise estatística dos mesmos estão apresentados no apêndice 3.

Com relação à amostra denominada CCB 020 as concentrações testadas da amostra não promoveram aumento no número de revertentes, em comparação aos controles, para as linhagens TA 100 e TA 98, com e sem ativador metabólico. As Tabelas 8 e 9 relacionam o número de revertentes/mg de MOE obtidos com a linhagem TA 98, na ausência e presença de ativador metabólico. Os dados relativos à contagem do número de revertentes por placa e subsequente análise estatística dos mesmos estão apresentados no apêndice 3.

Sob as condições do ensaio, os resultados obtidos demonstraram que as amostras controle e CCB 020 não apresentaram potencial de atividade mutagênica para as linhagens TA 100 e TA 98 de *Salmonella typhimurium*. Mas, a amostra PSC 94/03, embora não tenha apresentado efeito mutagênico para a linhagem TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência de ativador metabólico, apresentou potencial mutagênico para as linhagens TA 98 (com e sem ativador metabólico) e TA 100 (com ativador metabólico), sendo classificada como de potência baixa a moderada, respectivamente, conforme a concentração.

Conquanto a amostra controle não tenha apresentado potencial de mutagenicidade, o crescimento da linhagem PSC 94/03 levou à mudanças no substrato degradado, gerando metabólitos de potencial mutagênico, provavelmente, conseqüente da degradação do lodo que contém os corantes têxteis testados. Embora esta linhagem tenha apresentado atividade ligninolítica semelhante à linhagem CCB 020, diferenças foram observadas com relação à produção de manganês peroxidase no 14º dia de incubação e também com relação à atividade de

peroxidase; atividades maiores para a linhagem CCB 020 que para o primeiro. Além disso, embora a atividade dessas enzimas tenha diminuído ao longo do período de incubação, CCB 020 produziu, comparativamente, maior atividade de todas as enzimas avaliadas até ao final dos 30 dias da colonização do substrato.

Sanchez et al. (1988) empregou o extrato de efluentes, obtido com diclorometano, de 9 indústrias têxteis/corantes na avaliação da descarga na zona urbana de rios da Grande São Paulo. Os resultados de dois ensaios de mutagenicidade microbiológica (*S. typhimurium* e *E. coli* WP2) mostraram que das categorias industriais amostradas, as indústrias têxteis contribuem com o percentual mais alto (67%) dos efluentes mutagênicos.

Houk (1992), ao compilar vários outros trabalhos relacionados ao potencial mutagênico de efluentes líquidos e sólidos gerados pelas indústrias têxteis e de produção de corantes, concluiu que estas produzem efluentes consistentemente genotóxicos e, de acordo com a classificação estabelecida para grau de genotoxicidade, esses resíduos têm sido normalmente considerados de potência mutagênica moderada. Danos genéticos induzidos pelos efluentes incluem mutações e anormalidades cromossômicas. Em adição aos corantes, muitos dos quais considerados mutagênicos na sua forma pura, como é o caso do corante índigo, os metais pesados presentes nesses resíduos podem ser uma possível fonte de atividade genotóxica.

No presente trabalho, os resultados obtidos sugerem que novas avaliações devem considerar também outros solventes no processo de extração do substrato, pois o metanol pode também ter extraído ou transformado produtos do micélio em desenvolvimento com potencial mutagênico. No entanto, a CETESB (1999) preconiza o uso do metanol e diclorometano:metanol na extração de amostras contendo lodo do esgoto. Também, com base nas diretrizes dadas por Houk (1992), estes mesmos solventes são indicados na extração amostras ambientais contendo

corante, pois têm maior afinidade para extração dos compostos presentes relacionados.

Tabela 6. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra PSC 94/03, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior ou igual a 2,0).

Amostra de Lodo (mg equivalente de matéria seca)	MOE extraída (mg)	Nº médio de revertentes		Nº médio de revertentes/mg de MOE		Tabela de classificação de HOUK (1992) Potência de Mutagenidade Nº de revertentes/mg de MOE
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100	
500	6,968	31,00	149,33	2,62	-	Até 10^2 - não detectável a baixa.
100	1,400	121,33	175,00	58,66	-	
50	0,700	38,9	216,33	37,34	-	10^2 - 10^4 - moderada
10	0,140	31,67	158,00	136,00	-	
5	0,070	21,03	129,33	33,00	-	10^4 - 10^6 - alta
Controle negativo (Solvente)	0	14,67	137,33	-	-	10^6 - 10^7 - extrema

Tabela 7. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra PSC 94/03, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na presença de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior ou igual a 2,0).

Amostra de Lodo (mg equivalente de matéria seca)	MOE extraída (mg)	Nº médio de revertentes		Nº médio de revertentes/mg de MOE		Tabela de classificação de HOUK (1992) Potência de Mutagenicidade Nº de revertentes/ mg de MOE
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100	
500	6,968	35,00	99,00	-	-	Até 10^2 - não detectável a baixa.
100	1,400	123,67	161,33	64,50	-	
50	0,700	105,00	150,67	103,33	-	10^2 - 10^4 - moderada
10	0,140	44,33	137,00	-	-	
5	0,070	33,00	353,33	-	3.373	10^4 - 10^6 - alta
Controle negativo (Solvente)	0	33,67	118,00	-	-	10^6 - 10^7 - extrema

Tabela 8. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra CCB 020, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior ou igual a 2,0).

Amostra de Lodo (mg equivalente de matéria seca)	MOE extraída (mg)	Nº médio de revertentes		Nº médio de revertentes/mg de MOE		Tabela de classificação de HOUK (1992) Potência de Mutagenicidade Nº de revertentes/ mg de MOE
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100	
500	4,65	32,00	113,67	3,2	-	Até 10^2 não detectável a baixa $10^2 - 10^4$ - moderada $10^4 - 10^6$ - alta $10^6 - 10^7$ - extrema
100	0,93	29,67	89,67	-	-	
50	0,46	22,67	87,67	-	-	
10	0,09	26,33	76,33	-	-	
5	0,0465	22,67	85,33	-	-	
Controle Negativo (Solvente)	0	16,67	115,00	-	-	

Tabela 9. Número de revertentes/mg de MOE (matéria orgânica extraída), da amostra CCB 020, obtido para as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, na presença de ativador metabólico (para doses com razão de mutagenicidade maior ou igual a 2,0).

Amostra de Lodo (mg equivalente de matéria seca)	MOE extraída (mg)	Nº médio de revertentes		Nº médio de revertentes/mg de MOE		Tabela de classificação de HOUK (1992) Potência de Mutagenicidade Nº de revertentes/ mg de MOE
		TA 98	TA 100	TA 98	TA 100	
500	4,65	41,00	148,00	-	-	Até 10^2 não detectável a baixa $10^2 - 10^4$ - moderada $10^4 - 10^6$ - alta $10^6 - 10^7$ - extrema
100	0,93	43,00	92,33	-	-	
50	0,46	42,67	80,33	-	-	
10	0,09	34,33	85,33	-	-	
5	0,0465	30,67	105,33	-	-	
Controle Negativo (Solvente)	0	29,00	99,33	-	-	

6. CONCLUSÕES

- Os dados obtidos confirmaram que há diferenças entre as espécies/linhagens de *Pleurotus* quanto à capacidade ligninolítica, envolvida no processo de descoloração do RBBR. As espécies/linhagens CCB 440, CCB 068 e POS 98/37 embora tenham crescido na presença desse corante, não puderam descolorí-lo.
- As espécies/linhagens que puderam descolorir o RBBR também descoloriram o corante índigo e o corante preto enxofre, exceto CCB 440 e CCB 068. O corante índigo só pode ser descolorido na presença de bagaço de cana adicionado ao meio, o mesmo não ocorreu na descoloração do preto enxofre.
- Em meio de cultura adicionado de lodo e bagaço de cana, estéril, todas as espécies testadas puderam crescer e a descoloração ocorreu paralelamente ao desenvolvimento do micélio, exceto a espécie/linhagem POS 98/37, novamente confirmando os resultados de seleção em RBBR.
- Dos resultados obtidos nos diferentes meios de cultura sólidos e esterilizados, adicionados dos corantes, pode-se concluir que o RBBR é um corante adequado para se selecionar culturas de *Pleurotus* spp ligninolíticas.
- Em meio líquido a descoloração foi conseqüente da adsorção do corante ao micélio. A variação da concentração de nitrogênio não alterou os resultados e, a produção de enzimas ligninolíticas não foi significativa durante o período avaliado.
- No teste de biodegradabilidade, dois basidiomicetos selecionados – *Pleurotus flabellatus* e *P. sajor-caju* (respectivamente, CCB 394 e PSC 94/03) foram empregados como inóculo e, os resultados obtidos com o corante índigo e preto

enxofre foram insatisfatórios; os corantes foram classificados como não facilmente biodegradável, nas condições adotadas.

- No estudo complementar ao teste de biodegradabilidade, observou-se que outros microrganismos presentes na água podem estar implicados no processo de descoloração dos corantes, pois o sistema não é estéril e, ainda o processo de aeração contínua pode ter sido uma das causas dos resultados insatisfatórios obtidos.
- Em resíduo lignocelulósico mais lodo, as linhagens de *Pleurotus sajor-caju* estudadas - PSC 94/03 e CCB 020, mostraram capacidade de colonização e descoloração, expressa pela redução média em 42,05% de FDN/FDA e, diminuição média da DQO em 52,7%, comparada ao controle bem como com relação à diminuição média de 61,4% dos fenóis. Pouca ou nenhuma alteração foi observada no conteúdo de minerais e açúcares totais. Houve produção de lacase, peroxidase e manganês peroxidase, principalmente nos primeiros 14 dias de incubação, sendo mais expressiva para linhagem CCB 020.
- Os resultados de mutagenicidade mostraram que o substrato colonizado pela linhagem PSC 94/03 tornou-se mutagênico. O mesmo não ocorreu com o substrato colonizado pela linhagem CCB 020.
- Embora se tenha observado que o padrão de expressão das enzimas ligninolíticas era semelhante para ambas linhagens de *P. sajor-caju*, avaliadas nos resíduos compostos de lodo acrescido de material lignocelulósico, diferenças quanto à quantidade e consistência de produção das mesmas ao longo dos 30 dias de incubação puderam ser constatadas, especialmente com relação a manganês peroxidase e lacase, envolvidas no processo de descoloração de corantes e mais expressivas na linhagem CCB 020.

- O uso do lodo misturado a outros resíduos lignocelulósicos é viável, no entanto, o monitoramento do novo composto deve ser feito considerando-se a espécie/linhagem a ser utilizada através de testes toxicológicos e de mutagenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSIN, E. & ODIER, E. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 397-403, 1985.

AGOSIN, E.; DAUDIN, J. J.; ODIER, E. Screening of white-rot fungi on (¹⁴C) lignin labelled and (¹⁴C) whole-labelled wheat straw. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 132-138, 1985.

ARDON, O.; KEREM, Z.; HADAR, Y. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 201-207, 1996.

AKHMEDOVA, Z. R. Cellulolytic, xylanolytic, and lignolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 32-37, 1994.

AMES, B. N.; McCANN, J. & YAMASAKY, E. Methods for detecting carcinogenics and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.

BALAN, D. S. L. & MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile indigo dye by lignolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.

BALAN, D.S.L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis: corante índigo. Rio Claro, 1998. Tese (Doutor em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro/SP.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

Boletim ETAD. Corantes e o meio ambiente - guia para usuários. **Química Têxtil**, São Paulo, n. XVIII, p.22-31, 1995.

- BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Editora Ícone, 1995. 206p.
- BUMPUS, J. A. Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V. P. **Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995. p. 157-177.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, J. F.; PEBERDY, S. Y.; YU, F.; YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 537-542, 1996.
- CAMARERO, S.; BÖCKLE, B.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A. Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.3, p. 1070-1072, 1996.
- CETESB. Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas – critérios para projetos e operação (Manual Técnico)**. São Paulo: CTESB. Manual Técnico P.4230, ago/1999. 32 p.
- CHAHAL, D. S. Lignocellulosic wastes: biological conversion. In: MARTIN, A. M. (ed.). **Bioconversion of waste materials to industrial products**. Londo: Elsevier Applied Science, 1991. cap. 12, p. 373-399.
- CLAXTON, D.; ALLEN, J.; AVLWITTO, A.; MORTELMANS, K. NESTMANN, E.; ZEIGER, E. Guide for *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mutation. Research**, v. 198, p.83-91, 1987.
- CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th. Washington: American Public Health Association, 1998. Part 3111. B; 4500 P C; 5220 D; 5530 C.
- COMMANDAY, F.& MACY, J. M. Effect of substrate nitrogen on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus*. **Archives of Microbiology**, v. 142, n. 1, p. 61-65, 1985.

CONCHON, J .A.; MATUSAKI, L. F.; CONCHON, E. A.; CONCHON, E. Lodo biológico têxtil: um método de disposição econômico e racional. **Química Têxtil**, v. 48, p. 74-77, 1997.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanaerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1114-118, 1990.

DEY, S.; MAITI, T. K.; BHATTACHARYYA, B. C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4216-4218, 1994.

DHALIWAL, R. P. S.; GARCHA, H. S.; KHANNA, P. K. High laccase producing mutants of *Pleurotus florida*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 39-41, 1992.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. Part 8030. *Salmonella* Microsomal Mutagenicity Test. In: EATON, A. D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. (ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th. Washington: American Public Health Association, 1995. Part 8050.

FIELD, J. A.; JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; BONT, J. A. M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p.44-48, 1993

FREITAG, M. & MORRELL, J .J. Decolorization of the polymeric dye poly R-478 by wood-inhabiting fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 811-822, 1992.

GATEHOUSE, D.; HARWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, T.; OHTA, T.; VENITT, S.; ZEIGER, E. Recommendations for the performance o bacterial mutation assays. **Research Mutation**, v. 312, p. 217-233, 1994.

GHOSH, P. & SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 295-327, 1993.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GOLD, M. H. & ALIC, M. Molecular biology of lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology Reviews**, v. 57, n. 3, p. 606-622, 1993.

GROFF, K. A. Textile wastes-textile industry waste-water disposal; a review. **Water Environmental Research**, v. 65, p. 421-423, 1993.

GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M.J.; EVANS, C. S. Hydrogen-peroxidase producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 465-470, 1994.

GUTHRIE, R. F. & DAVIS, E. M. Biodegradation in effluents. In: MIZRAHI, A. & WEZEL, A. L. (ed.). **Advances in Biotechnological Processes 5**. New York: Alan R. Liss Inc., 1985. p.149-192.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. E.1.1.2.: Teste de biodegradabilidade imediata pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema aberto. In: IBAMA. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**, 1990.

HAAPALA, R. & LINKO, S. Production of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase under various culture conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 494-498, 1993.

HEINFLING, A.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T.; BUGBAUER, M.; SZCWZYSK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2788-2793, 1998.

HELDRICH, K. (Ed.). **Official methods of analysis**. 15 ed. Washington: AOAC-Association of Official Analytical Chemists, 1990. v. 1.

HORNIN, K. S. Resíduos sólidos industriais: caminhos e soluções. Meio Ambiente. Jornal de Piracicaba, Piracicaba, 12 de dezembro de 2001. caderno 1, p. 3.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

KAAL, E. J.; FIELD, J. A.; JOYCE, T. W. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 133-139, 1995.

KEREM, Z. & HADAR, Y. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 3057-3062, 1993.

KEREM, Z. & HADAR, Y. Effect of manganese on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus* during solid state fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4115-4120, 1995.

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1121-1127, 1992.

KIM, B. -S.; RYU, S.-J.; SHIN, K.-S. Effect of culture parameters on decolorization of remazol brilliant blue R by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p.101-104, 1996.

KIRBY, N.; Mc MULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolorisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 7, p. 761-764, 1995.

KNAPP, J. S; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 664-668, 1995.

KUMARAN, S.; SASTRY, C. A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p.43-49, 1997.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p.247-250, 1984.

LANG, E.; NERUD, F.; NOVOTNÁ, E.; ZADRAZIL, F.; MARTENS, R. Production of lignolytic exoenzymes and ¹⁴C-pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocellulose. **Folia Microbiologica**, v. 41, n. 6, p. 489-493, 1996.

LEISOLA, M. & WALDNER, R. In: ZADRAZIL, F. & REINIGER, P. (Ed.) **Treatment of lignocellulosics with white rot fungi**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.37-42.

LEISOLA, M. S. A & FIECHTER, A. New trends in lignin biodegradation. In: MIZRAHI, A. & WEZEL, A. L. **Advances in Biotechnological Processes 5**. New York: Alan R. Liss Inc., 1985. p.59-89.

LONGO, A. N. Sistemas de tratamento de águas residuais têxteis. **Química Têxtil**, v. 20: 19-22, 1987.

MARON, D. & AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MASAPHY, S. & LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 828-832, 1992.

MOYSON, E. & VERACHTERT, H. Factors influencing the lignin-peroxidase-producing ability of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 391-394, 1993.

MYERS, L. E., ADAMS, N.; KIER, L.; RAO, T. K.; SHAW, B.; & WILLIAMS, L. Microcomputersoftware for data management and statistical analysis of the

Ames/Salmonella test. In: Krewisk, D. (Ed.). **Statistical Methods in Toxicological Research**. New York: Gordon and Breech, 1991, p. 265-279.

NIGAM, P.; Mc MULLAN, G.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Decolorisation of effluent from textile industry by a microbial consortium. **Biotechnology Letters**, v. 18, n 1, p. 117-120, 1996.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Summary of considerations in the report from OECD Expert Group on degradation and accumulation. Paris: OECD, 1997. Section 3, p. 405-415.

PALMIERE, G.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; DESIDERIO, B.; NITTI, G.; CANNIO, R.; SANNIA, G. Stability and activity of phenol oxidase from lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 632-636, 1993.

PASTI-GRIGSBY, M. B. ; PASZCZYNSKI, S. ; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D. L.; CRAWFORD, R. L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3605-3613, 1992.

PASZCZYNSKI, A.; PASTY-GRIGSBY, M. B.; GOSZCZYNSKY, S.; CRAWFORD, R. L.; DRAWFORD, D. L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.

PLATT, M. W.; HADAR, Y.; CHET, I. The decolorization of the polymeric dye poly-blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.21,n. 6, p.394-396, 1985.

PONTECORVO, G; ROPER, J. A.; HERMONDS, L .M. McDONALD, D. K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advance in Genetics**, v. 5, p. 141-238,1953.

RAGUNATHAM, R.; GURUSAMY, M.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. **Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p.139-144, 1996.

RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms: Part 1A: Morfolgy, life cicle, taxonomy, breeding and cultivation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 157-223, 1987.

RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. Part 1B: Pathology in vitro and in vivo growth requeriments, and world status. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 31-113, 1988.

RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. *Pleurotus* Mushrooms. Part III: biotransformations of natural lignocellulosic wastes; commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.

RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialities of the basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 233-361, 1992.

REYES, P.; PICKARD, M. A.; VASQUEZ-DUHAL T, R. Hydroxybenzotriazole increases the range of textiles dyes decolorized by immobilized laccase. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 10, p. 875-880, 1999.

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VASQUEZ-DUHAL T, R. Industrial dye decolorization by laccases from lignolytic fungi. **Current Microbiology**, v. 38, p 27-32, 1999.

SALEM, V. Corantes na indústria têxtil: uma abordagem ecológica. **Quimica Têxtil**, Ano VIII, março 1995, p. 7-14.

SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z.; PASCHOAL , C. M. R. B.; ALVES, M. N.; FURLAN, E. V.; MARTINS, M. T. Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo Satae, Brazil, using short-term assays. **Toxicity Assessment**, v. 3, p. 55-80, 1988.

SANJUST, E.; LOI, F.; RESCIGNO, A.; RINALDI, A.; SANNA, M. T.; FADDA, M. B. Laccase induction in *Pleurotus* spp. by olive milling wastewater. **Meeting of the Italian Society**, v. 40, n. 3, p. 170A-171A, 1991.

SANNIA, G.; GIARDINA, P.; LUNA, M.; ROSSI, M.; BUONOCORE, V. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 11, p. 797-800, 1986.

SEMPLE, K. T. & FERMOR, T. R. The bioremediation of xenobiotic-contamination by composts and associated microflora. Science and Cultivation of Edible Fungi. Oxford, **Proceedings of the 14th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi**, 1995. p. 917-924.

SCHLIEPHAK, E. K. & LONERGAN, G. T. Laccase variation during dye decolorization in a 200L pocked-bed bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 8, p. 881-886, 1996.

SHARAT, G (Ed.). **The dictionary of substances and their effects**. 2nd Edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. v. 4, p. 747.

SHIN, K. S.; OH, I. K.; KIM, C. J. Production and purification of remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1744-1748, 1997.

SHIN, KWANG-SOO & KIM, CHANG-JIN. Decolorization of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 6, p. 569-572, 1998.

SMITH, D. & ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Common wealth Mycological Institute. Norfolk: Page Bros (Norwich) Ltd, 1983. 51 p.

STANIGHER, C.A. Tratamento de efluente de tinturaria com sistema de lodo ativado. **Química Têxtil**, v. 17, p. 10-14, 1987.

STURION, G.L. **Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.)**. Piracicaba, 1994. 147 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP.

- SWAMY, J. & RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textiles dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, 24:130-137, 1999(a).
- SWAMY, J. & RAMSAY, J. A. Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p.391-396, 1999(b).
- SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p.234-240, 1989.
- TAUTORUS, T. E. Mushroom fermentation. In: MIZRAHI, A. & WEZEL, A. L. **Advances in Biotechnological Processes 5**. New York: Alan R. Liss Inc., 1985. p.227-273.
- THORNE, R. G. The use of cellulose azure agar as a crude assay of both cellulotic and ligninolytic abilities of wood-inhabiting fungi. **Proc. Jpn. S. Acad. Ser. B**, v. 69, p. 29-34, 1993.
- TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H_2O_2 requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 81, p. 2280-2284, 1984.
- TROTMAN, E. R. Chemical constitution and colour, and classification of dyes. In: TROTMAN, E. R. **Dyeing and technology of textile fibres**. London: Butler and Tanner Ltd, 1964. cap.12, p.279-294.
- TUOR, U; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p.1-17, 1995.
- VAN SOEST, P. J. & WINER, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of Plant cell wall constituents. **Journal of Association of Official Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 50-55, 1967.

VYAS, B. R. M. & MOLITORIS, H. P. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent lignolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3919-3927, 1995.

VYAS, B. R. M.; VOLC, J.; SASEK, V. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, v. 39, n. 1, p. 9-22, 1994.

WALDNER, R.; LEISOLA, M. S. A.; FICHTER, A. Comparison of lignolytic activities of selected white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 400-407, 1988.

WANUCHA, D. J. Residuals management produces greener pastures; textile manufacturers could reduce liquid residual storage needs through year-round land application on nearby pastureland. **Industrial Wastewater**, p. 37-40, 1997.

WONG, Y. & YU, J. Laccase catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v.33, n. 6, p. 3512-3520, 1999.

WOOD, D. A.; MATCHAM, S. E.; FERMOR, T. R. Production and function of enzymes during lignocellulose degradation. In: ZADRAZIL, F. & REINIGER, P. (Eds) **Treatment of lignocellulosics with white rot fungi**. London: Elsevier Applied Science, 1988. pp.43-49.

YOUNG, L. & YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1187-1193, 1997.

ZOLLINGER, H. 40 years of dye chemistry – past experience and future prospects. **Melliand Textilber**, v. 69, n. 9, p. 644-649, 1988.

APÊNDICE 1

Tabela 1. Meio mínimo acrescido do corante RBBR 0.02% (p/v)

Espécies/ linhagens	Taxa de crescimento (cm)**	Taxa de descoloração (halo, cm)	% de descoloração (*)	Observação
CCB 440	0.483	nd	0.00	sem formação de halo no período ensaído
POS 98/37	1.00	nd	0.00	sem formação de halo no período ensaído
CCB 016	0.645	0.730	113.17	halo forte/3º dia
CCB 001	0.594	0.677	113.97	halo forte/3º dia
CCB 020	0.880	1.000	112.50	halo forte/3º dia
CCB 517	0.327	0.410	125.38	3º dia
CCB 068	0.848	nd*	0.00	sem formação de halo no período ensaído
CCB 396	0.300	0.383	127.77	halo forte/3º dia
CCB 394	0.660	0.750	112.44	halo forte
CCB 507	0.504	0.587	116.52	halo forte/3º dia
POS 98/33	0.593	0.670	112.98	descoloração fraca/3º dia
POS 98/36	0.660	0.750	113.64	descoloração fraca/3º dia
Tailândia	0.625	0.710	113.60	halo forte/3º dia
PSC 94/03	0.660	0.750	113.64	halo forte/3º dia

Legenda: nd = não detectado; (*) percentual de descoloração = (taxa de descoloração/taxa de crescimento)x100;
 ** média de duplicatas obtidas durante um período de 12 dias de incubação.

Tabela 2. Taxas de crescimento e descoloração do corante índigo** por *Pleurotus* spp em diferentes meios de cultura.

Espécie/linhagem	Taxa de crescimento (cm/dia)				Taxa de descoloração (cm/dia)		% Descoloração*		Início da descoloração (dia)
	malte ágar(MA)	MA índigo (MAI)	MA bagaço de cana (BC)	MABC índigo	MA índigo	MABC índigo	MA índigo	MABC índigo	
CCB001	0.45	0.520	0.53	0.41	nd	0.39	nd	95.50	4º
Tailândia	0.86	0.870	0.87	0.86	nd	0.69	nd	81.53	4º
CCB440	0.52	0.600	0.63	0.28	nd	nd	nd	Nd	nd
CCB016	0.29	0.320	0.54	0.51	nd	0.23	nd	44.93	4º
PSC 94/03	0.57	0.660	1.03	0.63	nd	0.25	nd	39.68	4º
POS 98/33	0.79	0.790	1.00	1.00	nd	0.61	nd	61.00	5º
POS 98/37	0.80	0.800	0.90	0.80	nd	0.67	nd	83.34	7º
POS 98/36	0.80	0.780	0.84	0.63	nd	0.25	nd	39.68	7º
CCB394	0.82	0.800	0.80	0.81	nd	0.62	nd	77.11	5º
CCB020	0.80	0.800	1.14	0.78	nd	0.65	nd	83.92	5º
CCB068	0.16	0.180	0.54	0.44	nd	nd	nd	nd	nd
CCB507	0.12	0.170	0.26	0.47	nd	nd	nd	Nd	nd
CCB517	0.25	0.230	0.41	0.42	nd	nd	nd	nd	nd
CCB396	0.104	0.031	0.26	0.17	nd	0.25	nd	147.00	8º

Legenda: nd = não detectado; (*) percentual de descoloração = (taxa de descoloração/taxa de crescimento)x100;
 ** média de duplicatas obtidas durante um período de 12 dias de incubação

Tabela 3. Taxas de crescimento e descoloração do corante preto enxofre** por *Pleurotus* spp em diferentes meios de cultura.

Espécie/linhagem	Taxa de crescimento (cm/dia)				Taxa de descoloração (cm/dia)		% Descoloração *		Início da descoloração (dia)
	malte ágar	MA preto enxofre (PE)	MA bagaço de cana (BC)	MABC PE	MA PE	MABC PE	MA PE	MABC PE	
CCB001	0.73	0.73	0.73	0.73	0.70	0.39	95.70	91.10	4°
Tailândia	0.86	0.87	0.90	0.95	0.44	0.69	48.61	66.88	4° MABC Preto enxofre 6° MA Preto enxofre
CCB440	0.58	0.58	0.60	0.66	0.00	nd	nd	nd	nd
CCB016	0.42	0.66	0.54	1.14	0.00	0.31	nd	27.35	4°
PSC 94/03	0.68	1.14	0.74	1.14	0.82	0.82	113.60	71.70	6°
POS 98/33	1.14	1.14	1.14	1.00	0.00	0.53	nd	53.00	6°
POS 98/37	1.00	1.14	1.00	1.14	0.67	0.81	58.69	70.86	3° MABC Preto enxofre 4° MA Preto enxofre
POS 98/36	1.14	1.33	1.14	1.33	0.37	0.41	37.08	30.54	3° MABC Preto enxofre 4° MA Preto enxofre
CCB394	0.71	0.66	0.66	0.73	0.50	0.67	75.75	93.13	4°
CCB020	0.73	0.73	0.73	0.73	0.75	0.75	103.16	103.16	4° MABC Preto enxofre 11° MA Preto enxofre
CCB068	0.60	0.61	0.64	0.65	nd	nd	nd	nd	nd
CCB507	0.59	0.55	0.54	0.65	0.00	0.33	nd	51.28	6°
CCB517	0.42	0.51	0.59	0.63	0.33	0.36	55.93	58.33	3° MABC Preto enxofre 6° MA Preto enxofre
CCB396	0.10	0.26	0.26	0.36	nd	0.25	nd	71.18	8°

Legenda: nd = não detectado; MABC = malte ágar bagaço de cana

* % de descoloração = (taxa de descoloração/taxa de crescimento) x 100; ** média de duplicatas obtidas durante o período de 12 dias de incubação

Tabela 4. Taxa de crescimento (cm/dia) de *Pleurotus* spp em meios contendo lodo e observação da descoloração.

Espécies/ linhagens	Taxa de crescimento (cm/dia)*			Início da descoloração
	(●) descoloração parcial		(●●) descoloração total	
	lodo ágar	Lodo bagaço de cana ágar	Lodo BC malte ágar	
PSC 94/03	0.75	1.80 (●)	1.80 (●●)	5º dia
CCB 001	0.75	0.75 (●)	1.80 (●)	5º dia (LBCMA) 12º dia (LBCA) 5º dia (LBCA)
CCB 020	0.75	0.75 (●)	1.80 (●)	12º dia (LBCMA) 5º dia (LBCA)
Tailândia	0.75	1.80 (●)	1.80 (●)	12º dia (LBCMA)
CCB 394	0.75	1.80 (●)	1.80	5º dia
POS 98/37	0.75	0.75	1.80	Sem descoloração no período ensaiado

*média de duplicatas obtidas durante 12 dias de incubação.

APÊNDICE 2

Tabela 5. Descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp em diferentes meios de cultura líquidos (valores listados correspondem à média de 3 repetições).

Parâmetros culturais	meio de malte (pH = 6,0)				meio mínimo (pH=6,0)				meio basal (pH=6,0)			
	Tailândia		CCB 517		Tailândia		CCB 517		Tailândia		CCB 517	
	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo
pH	4,0	5,0	5,0	5,0	4,0	5,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Absorv. 686 nm*	-	1.7706	-	1.1313	-	0.3076	-	1.917	-	0.0946	-	0.3950
Absorv. 583 nm*	-	1.3636	-	0.7060	-	0.5126	-	1.581	-	0.086	-	0.2836
% Redução da cor 686 nm	-	59.0	-	45.0	-	93.2	-	57.84	-	97.87	-	91.3
% Redução da cor 583 nm	-	33.5	-	66.3	-	78.1	-	33.0	-	96.7	-	98.8
Micélio p.s. (mg)	22.9	27.0	17.7	23.5	25.3	17.9	20.4	11.5	23.7	17.4	11.5	14.9

*Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação: Absorbância 686 nm: Meio de Malte ($y=0.03217+168.04259x$; $r=0.99859$); Meio Mínimo ($y=-0.025+227.88129x$; $r=0.99998$); Meio Basal ($y=-0.00706+217.83553x$; $r=0.99983$); Absorbância 583 nm: Meio de Malte ($y=0.0321+100.10907x$; $r=0.99905$); Meio Mínimo ($y=0.00648+118.63712x$; $r=0.99978$); Meio Basal ($y=-0.00408+135.96792x$; $r=0.99968$).

Tabela 6. Descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp em diferentes meios de cultura líquidos (valores listados correspondem à média de 3 repetições).

Parâmetros culturais	Meio de Malte (pH = 6,0)				Meio Mínimo (pH=6,0)				Meio Basal (pH=6,0)			
	CCB 016		PSC 94/03		CCB 016		PSC 94/03		CCB 016		PSC 94/03	
	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo	Testem.	Índigo
pH	5,0	5,0-6,0	5,0	5,0-6,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,0	5,0	4,0	5,0
Absorv. 686 nm*	-	1.905	-	0.0803	-	0.1870	-	0.092	-	0.1136	-	0.8033
Absorv. 583 nm*	-	1.206	-	0.0703	-	0.1720	-	0.0743	-	0.1993	-	0.0703
% Redução da cor 686 nm	-	16.6	-	51.2	-	96.3	-	98.2	-	98.8	-	99.5
% Redução da cor 583 nm	-	22.2	-	53.9	-	93.4	-	97.3	-	93.0	-	98.4
Micélio p.s. (mg)	20.8	13.2	20.4	21.0	21.0	14.4	23.8	15.3	11.5	10.7	17.7	11.0

*Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação: Absorbância 686 nm: Meio de Malte ($y=0.01595+165.98456x$; $r=0.99859$); Meio Mínimo ($y=0.00718+228.759x$; $r=0.99998$); Meio Basal ($y=0.005923+230.75038x$; $r=0.99983$); Absorbância 583 nm: Meio de Malte ($y=0.00688+113.00852x$; $r=0.99931$); Meio Mínimo ($y=0.00406+127.9621x$; $r=0.99991$); Meio Basal ($y=0.03027+127.3183x$; $r=0.99909$).

Tabela 7. Comportamento de *Pleurotus* spp. em meio líquido – meio mínimo, na ausência e presença do corante índigo (concentração inicial = 200 mg/L).

Tratamentos	Espécies/ linhagem	pH	p.s. micéio (mg)	*Absov. 596nm	*Absov. 694 nm	Razão 596/694	com. 596nm	conc. 694nm	conc. 596nm (mg)	conc. 694nm (mg)	% descol. 596 nm	% descol. 694 nm
Índigo♦	CCB 020	5,0	29.0	0.955	1.351	1.41	0.32	0.27	63.61	54.63	68.20	72.68
	CCB 020	5,0	25.8	0.567	0.986	1.74	0.19	0.20	37.26	39.48	81.37	80.26
	CCB 020	5,0	27.7	0.383	0.502	1.31	0.12	0.10	24.76	19.38	81.37	90.31
Glicose	CCB 020	5,0	34.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 020	4,0-5,0	37.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 020	4,0-5,0	38.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo♦	CCB 016	5,0	31.4	1.323	1.803	1.36	0.44	0.42	88.60	84.45	55.70	57.78
	CCB 016	5,0	32.2	1.818	2.768	1.52	0.61	0.57	122.22	113.47	38.89	43.97
	CCB 016	5,0	30.3	1.737	2.734	1.57	0.58	0.56	116.71	112.06	41.64	43.97
Glicose	CCB 016	4,0-5,0	58.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 016	4,0-5,0	56.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 016	4,0-5,0	60.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo♦	CCB 517	5,0	53.8	1.021	1.35	1.32	0.34	0.27	68.09	54.59	65.96	72.70
	CCB 517	5,0	35.7	0.805	1.074	1.33	0.27	0.22	53.42	43.13	41.50	78.43
	CCB 517	5,0	35.7	2.052	2.612	1.27	0.69	0.53	138.11	106.99	30.95	46.50
Glicose	CCB 517	5,0	81.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 517	5,0	77.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 517	5,0	72.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo§	POS 98/36	5,0	33.8	0.489	0.687	1.41	0.16	0.14	31.96	27.06	84.02	86.47
	POS 98/36	5,0	34.7	0.696	0.977	1.40	0.23	0.20	46.02	39.10	76.99	80.45
	POS 98/36	5,0	34.6	0.625	0.958	1.53	0.23	0.19	46.02	38.32	76.99	80.84
Glicose	POS 98/36	5,0	51.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/36	5,0	43.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/36	5,0	55.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*(♦) Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação:

596 nm $y=0,01838+2,945x$; $r=0,99936$ / 694 nm $y=0,03525+4,81662x$; $r=0,99854$

(§) 596 nm $y=0,036407+3,6407x$; $r=0,99816$; 694 nm $y=0,03511+6,07507x$; $r=0,99773$.

Tabela 8. Comportamento de *Pleurotus* spp. em meio líquido – meio mínimo, na ausência e presença do corante índigo (concentração inicial = 200 mg/L).

Tratamentos	Espécies/ linhagem	pH	p.s. micélio (mg)	Absov.		Razão 596/694	conc.		conc.		% descol.	
				596nm	694 nm		596nm	694nm	596nm (mg)	694nm (mg)	596 nm	694 nm
Índigo	CCB 001	5,0	45.6	1.068	1.355	1.268	0.21	0.17	42.87	33.17	78.57	83.42
	CCB 001	5,0	44.7	0.568	0.877	1.544	0.11	0.11	22.50	21.35	88.75	89.32
	CCB 001	5,0	50.1	0.587	1.222	1.425	0.17	0.15	34.27	29.88	82.86	85.06
Glicose	CCB 001	5,0	74.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 001	5,0	85.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 001	5,0	127.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	POS 98/37	5,0	27.8	0.557	0.818	1.468	0.11	0.10	22.06	19.89	88.97	90.05
	POS 98/37	5,0	30.5	0.593	1.383	2.332	0.12	0.17	23.52	33.86	88.24	83.07
	POS 98/37	5,0	34.6	0.876	1.215	1.386	0.18	0.15	35.05	29.70	82.48	85.15
Glicose	POS 98/37	4,0	49.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/37	4,0	38.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/37	4,0	45.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	CCB 440	6,0	39.7	5.088	5.084	0.999	1.03	0.63	200.00	125.34	0.00	37.33
	CCB 440	6,0	30.9	2.696	3.408	1.264	0.55	0.42	109.17	83.91	41.50	58.04
	CCB 440	6,0	22.7	3.272	5.280	1.613	0.56	0.65	132.63	130.18	33.69	34.91
Glicose	CCB 440	5,0	101.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 440	5,0	151.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 440	5,0	105.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	PSC 94/03	5,0	37.1	0.905	1.230	1.359	0.18	0.15	36.23	30.08	81.89	84.96
	PSC 94/03	5,0	37.7	0.975	1.296	1.329	0.20	0.16	39.08	31.71	80.46	84.15
	PSC 94/03	5,0	29.8	0.745	0.962	1.291	0.15	0.12	29.71	23.45	85.14	88.27
Glicose	PSC 94/03	4,0	47.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PSC 94/03	4,0	62.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PSC 94/03	4,0	42.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	Tailândia	5,0	46.8	0.711	1.018	1.4317	0.14	0.12	28.33	24.84	85.84	87.58
	Tailândia	5,0	402.	1.682	2.300	1.367	0.34	0.28	67.87	56.52	66.06	71.74
	Tailândia	5,0	46.5	2.290	2.482	1.083	0.46	0.31	92.63	61.02	53.68	69.49
Glicose	Tailândia	4,0	66.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tailândia	4,0	57.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tailândia	4,0	78.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	CCB 394	5,0	22.6	0.526	0.748	1.422	0.10	0.09	20.79	18.16	89.60	90.92
	CCB 394	5,0	21.0	0.491	0.610	1.242	0.10	0.07	19.37	14.75	90.32	92.62
	CCB 394	5,0	30.6	0.237	0.363	1.532	0.05	0.04	9.02	8.65	95.49	95.68
Glicose	CCB 394	4,0	70.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 394	4,0	39.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 394	4,0	23.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

• Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação:
 596 nm $y=0,01546+4,91078x$; $r=0,99914$ / 694 nm $y=0,01323+8,09137x$; $r=0,99849$

Tabela 9. Comportamento de *Pleurotus* spp. em meio líquido – meio mínimo, na ausência e presença do corante índigo (concentração inicial = 200 mg/L).

Tratamentos	Espécies/ linhagem	pH	p.s. micélio (mg)	*Absov.	*Absov.	Razão	conc.		conc.		% descol. 596 nm	% descol. 694 nm
				596nm	694 nm		596/694	596nm	694nm	596nm (mg)		
Índigo	CCB 507	4,0-5,0	24.7	1.179	2.958	2.508	0.24	0.41	48.10	82.28	75.95	58.86
	CCB 507	4,0-5,0	21.7	1.171	2.784	2.377	0.24	0.39	47.78	77.43	76.11	58.61
	CCB 507	4,0-5,0	22.5	1.062	2.976	2.802	0.22	0.41	43.34	82.78	78.33	58.61
Glicose	CCB 507	4,0-5,0	27.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 507	4,0-5,0	37.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 507	4,0-5,0	28.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	CCB 068	5,0	18.9	1.214	6.396	5.268	0.25	0.89	49.53	178.21	75.24	10.90
	CCB 068	5,0	20.4	1.091	5.912	5.418	0.22	0.82	44.52	164.70	77.74	17.65
	CCB 068	5,0	17.5	1.119	6.336	5.706	0.23	0.88	45.66	176.53	77.17	11.73
Glicose	CCB 068	5,0	61.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 068	5,0	125.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 068	5,0	69.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	CCB 396	5,0	18.6	0.951	4.720	4.963	0.19	0.66	38.81	131.44	80.59	34.28
	CCB 396	5,0	21.3	1.101	6.524	5.920	0.22	0.91	44.92	181.78	77.54	9.11
	CCB 396	5,0	14.8	1.189	7.136	6.000	0.24	0.99	48.51	198.86	75.74	0.57
Glicose	CCB 396	4,0	27.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 396	4,0	25.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 396	4,0	23.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índigo	POS 98/33	5,0	23.1	0.660	0.560	0.848	0.14	0.08	27.49	15.37	86.26	92.31
	POS 98/33	5,0	36.5	1.082	3.026	2.796	0.22	0.42	44.69	84.18	77.66	57.91
	POS 98/33	5,0	21.8	0.823	2.460	2.989	0.17	0.34	34.13	68.39	82.93	65.81
Glicose	POS 98/33	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/33	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/33	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação:
 596 nm $y=0,00146+4,90806x$; $r=0.99994$ / 694 nm $y=0,00909+7,16794x$; $r=0.99842$

Tabela 10. Comportamento de *Pleurotus* spp. em meio líquido – meio mínimo, na ausência e presença do corante preto enxofre (concentração inicial = 200 mg/L).

Tratamentos	Espécies/ linhagem	pH	p.s. micélio (mg)	*Absov. 380nm	*Absov. 454 nm	Razão 380/454	conc. 380nm	conc. 454nm	conc. 380nm (mg)	conc. 454nm (mg)	% descol. 380 nm	% descol. 454 nm
Preto enxofre	CCB 016	5,0	44.3	0.114	0.081	1.41	0.13	0.12	25.55	23.85	87.23	88.07
	CCB 016	5,0	52.7	0.096	0.086	1.12	0.10	0.13	20.99	25.34	89.50	87.33
	CCB 016	5,0	47.3	0.088	0.149	0.59	0.09	0.22	18.97	44.10	90.51	77.95
Glicose	CCB 016	4,0	55.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 016	4,0	49.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 016	4,0	63.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre	CCB 020	5,0	34.9	0.453	0.340	1.33	0.56	0.50	111.34	100.98	44.33	49.51
	CCB 020	5,0	32.9	0.374	0.252	1.48	0.46	0.37	91.35	74.77	54.32	62.62
	CCB 020	5,0	29.6	0.416	0.304	1.37	0.51	0.38	101.98	76.71	49.01	61.64
Glicose	CCB 020	4,0	38.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 020	4,0	37.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 020	4,0	52.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre	CCB 440	5,0	31.3	0.659	0.590	1.12	0.82	0.88	163.48	175.43	18.26	12.29
	CCB 440	5,0	35.4	0.676	0.595	1.14	0.84	0.88	167.78	176.92	16.11	11.54
	CCB 440	5,0	33.5	0.684	0.590	1.16	0.85	0.88	169.81	175.43	15.10	12.29
Glicose	CCB 440	5,0	46.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 440	5,0	44.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 440	5,0	63.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre	PSC 94/03	5,0	31.6	0.323	0.197	1.64	0.39	0.29	78.44	58.40	60.78	70.80
	PSC 94/03	5,0	35.0	0.178	0.160	1.11	0.21	0.24	41.74	47.38	79.13	76.31
	PSC 94/03	5,0	32.9	0.268	0.169	1.59	0.21	0.25	41.74	50.06	79.13	74.97
Glicose	PSC 94/03	4,0	44.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PSC 94/03	4,0	45.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PSC 94/03	4,0	44.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre	POS 98/37	5,0	33.6	0.286	0.288	0.990	0.35	0.43	69.08	85.50	65.46	57.25
	POS 98/37	5,0	45.1	0.298	0.213	1.399	0.36	0.32	72.12	63.16	63.94	68.42
	POS 98/37	5,0	39.9	0.238	0.335	0.710	0.28	0.50	56.93	99.49	71.53	50.25
Glicose	POS 98/37	4,0	60.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/37	4,0	45.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/37	4,0	42.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação:
380 nm $y=0,01306+0,79023x$; $r=0.99929$ / 454 nm $y=-0,000902765+0,67161x$; $r=0.99849$

Tabela 11. Comportamento de *Pleurotus* spp. em meio líquido – meio mínimo, na ausência e presença do corante preto enxofre (concentração inicial = 200 mg/L).

Tratamentos	Espécies/ linhagem	pH	p.s. micélio (mg)	*Absov. 380nm	*Absov. 454 nm	Razão 380/454	conc. 380nm	conc. 454nm	conc. 380nm (mg)	conc. 454nm (mg)	% descol. 380 nm	% descol. 454 nm
Preto enxofre♦	CCB 001	5,0	35.50	0.256	0.265	0.966	0.307	0.393	61.486	78.646	69.25	60.67
	CCB 001	6,0	28.00	0.541	0.444	1.218	0.668	0.660	133.617	131.951	33.19	34.02
	CCB 001	6,0	35.10	0.030	0.010	3.000	0.021	0.014	4.267	2.709	97.85	98.64
Glicose	CCB 001	4,0	77.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 001	4,0	65.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 001	4,0	57.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre♦	Taiândia	5,0	39.10	0.528	0.469	1.126	0.652	0.697	130.327	139.39	34.837	30.302
	Taiândia	5,0	34.50	0.339	0.205	1.654	0.412	0.304	82.492	60.77	58.754	69.611
	Taiândia	5,0	46.70	0.405	0.283	1.431	0.496	0.420	99.196	84.00	50.402	57.997
Glicose	Taiândia	4,0	32.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Taiândia	4,0	30.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Taiândia	4,0	35.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre\$	POS 98/36	5,0	31.0	0.171	0.098	1.74	0.23	0.17	46.96	33.24	76.52	83.38
	POS 98/36	5,0	29.7	0.036	0.026	1.38	0.06	0.06	11.86	11.92	94.07	94.04
	POS 98/36	5,0	34.9	0.118	0.085	1.39	0.17	0.15	33.18	29.39	83.41	85.30
Glicose	POS 98/36	5,0	44.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/36	5,0	48.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/36	5,0	47.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre#	POS 98/33	5,0	45.5	0.686	0.590	1.16	0.35	0.37	70.62	74.40	64.69	62.80
	POS 98/33	5,0	39.4	0.340	0.463	0.73	0.17	0.29	34.25	58.16	82.85	70.92
	POS 98/33	5,0	47.6	0.573	0.346	1.00	0.29	0.215	58.74	43.18	70.63	78.41
Glicose	POS 98/33	5,0	51.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/33	5,0	43.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	POS 98/33	5,0	55.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

♦ (♦) Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação:

380 nm $y=0,01306+0,79023x$; $r=0.99929$ / 454 nm $y=-0,000902765+0,67161x$; $r=0.99849$.

(\$) 380 nm $y=-0.00959+0.76907x$; $r=0.999$ / 454 nm $y=-0.00472+0.59995x$; $r=0.99752$.

(#) 380 nm $y=0.01417+1.90273x$; $r=0.99908$ / 454 nm $y=0.00825+1.56388x$; $r=0.99958$.

Tabela 12. Comportamento de *Pleurotus* spp. em meio líquido – meio mínimo, na ausência e presença do corante Preto enxofre (concentração inicial = 200 mg/L).

Tratamentos	Espécies/ linhagem	pH	p.s. micélio (mg)	*Absov.	*Absov.	Razão	conc.		conc.		% descol. 380 nm	% descol. 454 nm
				380nm	454 nm		380/454	380nm	454nm	380nm (mg)		
Preto enxofre	CBB 396	6,0	27.7	1.012	0.916	1.10	0.59	0.69	118.07	137.62	40.96	31.19
	CBB 396	6,0	34.1	1.135	1.190	0.95	0.66	0.89	132.53	178.98	33.74	10.51
	CBB 396	6,0	32.5	0.912	0.580	1.57	0.53	0.43	106.33	86.89	46.83	56.56
Glicose	CBB 396	5,0	40.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CBB 396	5,0	33.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CBB 396	5,0	36.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre	CCB 068	6,0	24.8	1.436	1.233	1.16	0.84	0.93	167.89	185.48	16.05	7.26
	CCB 068	6,0	28.3	1.383	1.151	1.20	0.81	0.87	161.66	173.10	19.17	13.45
	CCB 068	6,0	28.0	1.076	0.944	1.14	0.63	0.71	125.59	141.84	37.20	29.08
Glicose	CCB 068	5,0	93.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 068	5,0	160.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 068	5,0	132.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Preto enxofre	CCB 517	5,0	46.5	0.387	0.597	0.65	0.22	0.35	44.64	69.32	77.68	65.34
	CCB 517	5,0	41.4	0.463	0.587	0.79	0.27	0.34	53.57	68.14	73.22	65.93
	CCB 517	5,0	49.8	0.479	0.755	0.63	0.28	0.44	55.45	87.88	72.72	56.06
Glicose	CCB 517	5,0	70.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 517	5,0	60.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 517	5,0	76.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PretoEnxofre	CCB 507	5,0	46.8	0.676	0.568	1.19	0.39	0.43	78.60	85.07	60.70	57.46
	CCB 507	5,0	41.0	0.342	0.155	2.21	0.19	0.11	39.34	22.72	80.32	88.64
	CCB 507	5,0	40.8	0.225	0.167	1.35	0.13	0.12	25.60	24.53	80.32	87.73
Glicose	CCB 507	5,0	46.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 507	5,0	42.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 507	5,0	42.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PretoEnxofre	CCB 394	5,0	61.5	0.216	0.131	1.65	0.12	0.10	24.55	19.10	87.72	90.45
	CCB 394	5,0	66.4	0.123	0.093	0.76	0.07	0.07	13.63	13.36	93.19	93.32
	CCB 394	5,0	44.6	0.105	0.081	1.30	0.06	0.06	11.51	11.55	94.24	94.23
	CCB 394	5,0	95.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 394	5,0	114.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCB 394	5,0	108.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Equações de regressão linear (Absorbância x concentração do corante) e coeficientes de correlação:
380 nm $y=0,00702+1,70228x$; $r=0.9999$ / 454 nm $y=-0,00452+1,32467x$; $r=0.9999$

Quadro 1. Análise de variância de peso do micélio em relação à fonte de carbono e percentual de descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
ESPÉCIE/LINHAGEM	13	19410.4157170	1493.1089013	10.5342	0.00001
FONTE C	1	16385.6911768	16385.6911768	115.6043	0.00001
ESP./LIN*FON	13	11505.6998797	885.0538369	6.2442	0.00001
RESÍDUO	56	7937.4118308	141.7394970		
TOTAL	83	55239.2186042			

MÉDIA GERAL = 45.395237

COEFICIENTE DE VARIACAO = 26.226 %

Quadro 2. Análise de variância de peso do micélio em relação à fonte de carbono e percentual de descoloração do corante preto enxofre por *Pleurotus* spp.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
ESPÉCIE/LINHAGEM	13	16698.7667083	1284.5205160	17.0165	0.00001
FONTE C	1	8698.6065019	8698.6065019	115.2336	0.00001
ESP./LIN*FON	13	14397.6421312	1107.5109332	14.6716	0.00001
RESÍDUO	56	4227.2574511	75.4867402		
TOTAL	83	44022.2727925			

MÉDIA GERAL = 48.776192

COEFICIENTE DE VARIACAO = 17.813 %

Quadro 3. Análise de variância da razão de descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp (dados transformados segundo raiz(x+0)).

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	17	7.2666715	0.4274513	74.0269	0.00001
RESÍDUO	36	0.2078738	0.0057743		
TOTAL	53	7.4745453			

MÉDIA GERAL = 1.357046

COEFICIENTE DE VARIACAO = 5.600 %

Quadro 4. Análise de variância da razão de descoloração do corante preto enxofre por *Pleurotus* spp.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
LINHAGEM	17	0.6135676	0.0360922	1.6232	0.10916
RESÍDUO	36	0.8004859	0.0222357		
TOTAL	53	1.4140535			

MÉDIA GERAL = 1.111513

COEFICIENTE DE VARIACAO = 13.416 %

Tabela 13. Teste de Tukey para médias de descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp.

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	10	CCB394	3	93.073334	93.073334	a	A
2	6	POS9837	3	86.089996	86.089996	ab	AB
3	5	CCB001	3	85.933329	85.933329	ab	AB
4	8	PSC9403	3	85.793335	85.793335	ab	AB
5	14	POS9836	3	84.000000	84.000000	abc	AB
6	4	POS9833	3	82.586665	82.586665	abc	AB
7	11	CCB020	3	81.083333	81.083333	abc	AB
8	9	TAILÂNDIA	3	76.269999	76.269999	abc	ABC
9	13	CCB517	3	65.876668	65.876668	bcd	ABCD
10	1	CCB507	3	58.693334	58.693334	cd	BCD
11	12	CCB016	3	48.573334	48.573334	d	CD
12	7	CCB440	3	43.426666	43.426666	d	DE
13	3	CCB396	3	14.653333	14.653333	e	E
14	2	CCB068	3	13.426666	13.426666	e	E

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

Tabela 14. Teste de Tukey para médias de descoloração do corante preto enxofre por *Pleurotus* spp.

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	13	CCB394	3	91.716665	91.716665	a	A
2	2	CCB016	3	89.080007	89.080007	a	AB
3	14	POS9836	3	84.666667	84.666667	a	ABC
4	11	CCB517	3	74.393331	74.393331	ab	ABCD
5	12	CCB507	3	73.779999	73.779999	ab	ABCD
6	5	PSC9403	3	73.013336	73.013336	ab	ABCD
7	1	POS9833	3	72.690002	72.690002	ab	ABCD
8	6	POS9837	3	66.976664	66.976664	ab	ABCD
9	7	CCB001	3	66.766001	66.766001	ab	ABCD
10	3	CCB020	3	49.220001	49.220001	bc	BCDE
11	8	TAILÂNDIA	3	47.997335	47.997335	bc	CDE
12	9	CCB396	3	40.513331	40.513331	bc	DE
13	10	CCB068	3	24.139999	24.139999	c	E
14	4	CCB440	3	16.490000	16.490000	c	E

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO - D.M.S. 5% = 34.31780 - D.M.S. 1% = 40.65170

Tabela 15. Teste de Tukey para médias de peso do micélio das espécies/linhagens de *Pleurotus* crescidas em meio mínimo com glicose como fonte de carbono (testemunhas do corante índigo).

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	7	CCB440	3	119.533325	119.533325	a	A
	5	CCB001	3	96.033335	96.033335	ab	AB
3	2	CCB068	3	85.366669	85.366669	bc	ABC
4	13	CCB517	3	76.966665	76.966665	bcd	BCD
5	9	TAILÂNDIA	3	67.433334	67.433334	bcde	BCDE
6	12	CCB016	3	58.633331	58.633331	cdef	BCDEF
7	8	PSC94/03	3	50.966665	50.966665	def	CDEF
8	4	POS9833	3	49.966665	49.966665	def	CDEF
9	6	POS9837	3	44.666667	44.666667	def	DEF
10	10	CCB394	3	44.333333	44.333333	def	DEF
11	14	POS9836	3	43.533335	43.533335	def	DEF
12	11	CCB020	3	37.000000	37.000000	ef	EF
13	1	CCB507	3	31.033335	31.033335	f	EF
14	3	CCB396	3	25.600001	25.600001	f	F

Tabela 16. Teste de Tukey para médias de peso do micélio das espécies/linhagens de *Pleurotus* crescidas em meio mínimo com corante índigo como fonte de carbono.

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	5	CCB001	3	46.733337	46.733337	a	A
2	9	TAILÂNDIA	3	44.500000	44.500000	a	A
3	13	CCB517	3	41.733332	41.733332	a	A
4	8	PSC94/03	3	34.866669	34.866669	a	A
5	4	POS9833	3	34.366666	34.366666	a	A
6	14	POS9836	3	32.066666	32.066666	a	A
7	12	CCB016	3	31.299998	31.299998	a	A
8	7	CCB440	3	31.100001	31.100001	a	A
9	6	POS9837	3	30.966665	30.966665	a	A
10	11	CCB020	3	27.500000	27.500000	a	A
11	10	CCB394	3	24.733332	24.733332	a	A
12	1	CCB507	3	22.966667	22.966667	a	A
13	2	CCB068	3	18.933333	18.933333	a	A
14	3	CCB396	3	18.233334	18.233334	a	A

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO D.M.S. 5% = 34.09310 - D.M.S. 1% = 39.61948

Tabela 17. Teste de Tukey para médias de peso do micélio das espécies/linhagens de *Pleurotus* spp com relação à fonte de carbono no meio mínimo do corante índigo.

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	GLICOSE	42	59.361904	59.361904	a	A
2	2	ÍNDIGO	42	31.428571	31.428571	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 5.20987 - D.M.S. 1% = 6.92935

Tabela 18. Teste de Tukey para médias de peso do micélio das espécies/linhagens de *Pleurotus* crescidas em meio mínimo com corante preto enxofre como fonte de carbono.

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	13	CCB394	3	57.500000	57.500000	a	A
2	2	CCB016	3	48.100001	48.100001	ab	AB
3	11	CCB517	3	45.899999	45.899999	ab	AB
4	1	POS9833	3	44.166667	44.166667	ab	AB
5	12	CCB507	3	42.866669	42.866669	ab	AB
6	8	TAILÂNDIA	3	40.100001	40.100001	ab	AB
7	6	POS9837	3	39.533333	39.533333	ab	AB
8	4	CCB440	3	33.399999	33.399999	ab	AB
9	5	PSC9403	3	33.166667	33.166667	ab	AB
10	7	CCB001	3	32.866666	32.866666	ab	AB
11	3	CCB020	3	32.466667	32.466667	b	AB
12	14	POS9836	3	31.866669	31.866669	b	AB
13	9	CCB396	3	31.433334	31.433334	b	AB
14	10	CCB068	3	27.033333	27.033333	b	B

Tabela 19. Teste de Tukey para médias de peso do micélio das espécies/linhagens de *Pleurotus* crescidas em meio mínimo com glicose como fonte de carbono (testemunhas do corante preto enxofre).

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	10	CCB068	3	128.433329	128.433329	a	A
2	13	CCB394	3	106.099996	106.099996	a	A
3	11	CCB517	3	69.033335	69.033335	b	B
4	7	CCB001	3	66.633336	66.633336	bc	B
5	2	CCB016	3	56.333333	56.333333	bcd	BC
6	4	CCB440	3	51.399999	51.399999	bcd	BC
7	1	POS9833	3	49.966665	49.966665	bcd	BC
8	6	POS9837	3	49.399999	49.399999	bcd	BC
9	14	POS9836	3	46.899999	46.899999	bcd	BC
10	5	PSC9403	3	44.833333	44.833333	bcd	BC
11	12	CCB507	3	43.900004	43.900004	cd	BC
12	3	CCB020	3	42.799998	42.799998	cd	BC
13	9	CCB396	3	36.933334	36.933334	d	C
14	8	TAILÂNDIA	3	32.666667	32.666667	d	C

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 24.88034 - D.M.S. 1% = 28.91337

Tabela 20. Teste de Tukey para médias de peso do micélio das espécies/linhagens de *Pleurotus* spp com relação à fonte de carbono no meio mínimo, do corante preto enxofre.

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	GLICOSE	42	58.952381	58.952381	a	A
2	1	PRETO S	42	38.600000	38.600000	b	B

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO
D.M.S. 5% = 3.80204 - D.M.S. 1% = 5.05688

Tabela 21. Teste de Tukey para médias da razão de descoloração do corante índigo por *Pleurotus* spp.

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MÉDIAS	MÉDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	3	CCB 396	3	2.370124	5.617490	a	A
2	2	CCB 068	3	2.337199	5.462497	a	A
3	1	CBB 507	3	1.599779	2.559292	b	B
4	6	POS 98/37	3	1.305456	1.704214	c	C
5	16	CONTROLE3	3	1.288927	1.661333	c	C
6	18	CONTROLE4	3	1.263124	1.595483	c	C
7	11	CONTROLE2	3	1.253557	1.571405	c	C
8	4	CONTROLE1	3	1.249081	1.560203	c	C
9	13	CCB 016	3	1.218545	1.484852	c	C
10	12	CCB 020	3	1.217634	1.482632	c	C
11	15	POS 98/33	3	1.202709	1.446508	c	C
12	17	POS 98/36	3	1.190885	1.418208	c	C
13	5	CCB 001	3	1.187685	1.410595	c	C
14	10	CCB394	3	1.179395	1.390974	c	C
15	8	PSC94/03	3	1.151602	1.326187	c	C
16	14	CCB 517	3	1.144348	1.309533	c	C
17	9	TAILÂNDIA	3	1.135514	1.289392	c	C
18	7	CCB 440	3	1.131272	1.279777	c	C

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 0.23314 - D.M.S. 1% = 0.27183

Tabela 22. Teste de Tukey para médias da razão de descoloração do corante preto enxofre por *Pleurotus* spp.

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MÉDIAS	MÉDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	8	CCB 001	3	1.272845	1.620134	a	A
2	14	CCB 507	3	1.246458	1.553657	a	A
3	17	POS 98/36	3	1.224269	1.498835	a	A
4	6	PSC94/03	3	1.198381	1.436117	a	A
5	10	CONTROLE2	3	1.191669	1.420075	a	A
6	9	TAILÂNDIA	3	1.181152	1.395119	a	A
7	4	CCB 020	3	1.180093	1.392619	a	A
8	16	CONTROLE3	3	1.137247	1.293331	a	A
9	2	CONTROLE1	3	1.109199	1.230322	a	A
10	18	CONTROLE4	3	1.109049	1.229990	a	A
11	15	CCB 394	3	1.098826	1.207419	a	A
12	11	CCB 396	3	1.092162	1.192817	a	A
13	12	CCB 068	3	1.080062	1.166534	a	A
14	5	CCB 440	3	1.067680	1.139941	a	A
15	7	POS 98/37	3	1.006799	1.013643	a	A
16	3	CCB 016	3	1.004616	1.009254	a	A
17	1	POS 98/33	3	0.977144	0.954811	a	A
18	13	CCB 517	3	0.829590	0.688220	a	A

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 0.45750 - D.M.S. 1% = 0.53343

Tabela 23. Crescimento de *Pleurotus flabellatus*, CCB 394, em meio mínimo com 2 g de glicose e com 0,6 e 6,0 g de NaNO₃ (0,6N e 6N, respectivamente) com e sem corante índigo.

Tratamento	Tempo de incubação (dias)	Peso seco do micélio (mg/25 mL)	Peso seco médio micélio (mg/ 25 mL)	pH
Sem Corante 6N	3	16,1 13,1	14,6	5,0
Sem Corante 0,6N		19,7 15,9	17,8	5,0
Com Corante 6N		19,2 30,2	24,7	6,0
Com Corante 0,6N		14,6 13,9	14,25	6,0
Sem Corante 6N	6	8,3 7,0	7,65	5,0
Sem Corante 0,6N		10,9 12,8	11,85	5,0
Com Corante 6N		12,3 11,2	11,75	5,0
Com Corante 0,6N		10,2 6,4	8,30	5,0
Sem Corante 6N	9	14,6 15,3	14,95	5,0
Sem Corante 0,6N		16,3 15,2	15,75	5,0
Com Corante 6N		18,8 21,3	20,05	5,0
Com Corante 0,6N		12,2 10,4	11,3	5,0
Sem Corante 6N	12	21,3 23,10	22,20	5,0
Sem Corante 0,6 N		19,3 19,7	19,5	5,0
Com Corante 6 N		27,9 19,8	23,85	5,0
Com Corante 0,6N		13,6 14,2	13,9	5,0

Tabela 24. Crescimento de *Pleurotus flabellatus*, CCB 394, em meio mínimo com 2 g de glicose e com 0,6 e 6,0 g de NaNO₃ (0,6N e 6N, respectivamente) com e sem corante preto enxofre.

Tratamento	Tempo de incubação (dias)	Peso seco do micélio (mg/25 mL)	Peso seco médio micélio (mg/ 25 mL)	pH
Sem Corante 6N	3	16,4 18,4	17,4	6,0
Sem Corante 0,6N		18,6 19,7	19,15	6,0
Com Corante 6 N		20,2 19,0	19,6	6,0
Com Corante 0,6N		16,1 16,0	16,05	6,0
Sem Corante 6N	6	22,6 13,9	18,25	6,0
Sem Corante 0,6N		9,5 13,5	11,50	6,0
Com Corante 6N		20,8 26,0	23,40	6,0
Com Corante 0,6N		18,6 19,9	19,25	6,0
Sem Corante 6N	9	30,7 20,9	25,80	5,0
Sem Corante 0,6N		16,9 15,2	16,05	5,0
Com Corante 6 N		31,2 26,9	29,05	6,0
Com Corante 0,6N		26,9 20,8	23,85	5,0
Sem Corante 6N	12	20,7 17,9	19,30	6,0
Sem Corante 0,6N		10,0 12,1	11,05	6,0
Com Corante 6N		27,3 26,3	26,80	5,0
Com Corante 0,6N		19,1 17,9	18,50	5,0

Tabela 25. Avaliação da atividade enzimática em cultivo estático da espécie/linhagem CCB 394, em duplicata, em meio mínimo com 2 g de glicose e 6,0 g de NaNO₃ (6N) e com 2 g de glicose com 0,6 g de NaNO₃ (0,6), sem corante e com corante índigo e preto enxofre.

Tratamento	Tempo de incubação (dias)	Manganês Peroxidase (U/L)	Peroxidase (U/L)	Lacase (U/L)
Índigo 6	3	2,00	0,00	0,00
Índigo 0,6		2,50	0,00	0,00
Preto enxofre 6		9,74	0,00	0,00
Preto enxofre 0,6		0	0,16	0,00
Índigo 6	6	0,04	0,02	0,00
Índigo 0,6		0,80	0,44	0,00
Preto enxofre 6		0,00	0,30	0,02
Preto enxofre 0,6N		0,00	0,00	0,00
Índigo 6	9	0,00	0,00	0,25
Índigo 0,6		0	0,28	0
Preto enxofre 6		0,00	0,00	0,044
Preto enxofre 0,6		0,80	0,08	0,04
Índigo 6	12	2,30	0,00	0,00
Índigo 0,6		2,3	0,00	0,00
Preto Enxofre 6		0,00	0,00	0,00
Preto Enxofre 0,6		0,00	0,00	0,00

Tabela 26. Percentual de CO₂ liberado nos tratamentos empregados.

Dias de incubação	Branco + Inóculo		Corante índigo			Corante preto enxofre			Glicose			
	3	4	Média	5	6	Média	7	8	Média	9	10	Média
1	0.32	0.48	0.40	1.06	1.06	1.06	0.00	0.01	0.00	7.79	13.90	10.84
2	0.90	1.87	1.38	2.07	2.25	2.16	0.00	1.96	0.98	18.13	28.08	23.10
3	1.77	3.51	2.64	3.43	4.23	3.83	0.14	7.60	3.87	29.29	42.91	36.10
4	2.50	5.37	3.93	4.94	6.37	5.66	1.75	15.51	8.63	39.98	52.84	46.41
5	3.05	6.92	4.99	6.61	8.92	7.77	4.60	23.18	13.89	45.99	58.33	52.16
8	4.95	11.73	8.34	9.73	15.27	12.50	11.60	34.95	23.28	50.83	68.44	59.64
10	8.61	20.04	14.33	13.49	21.38	17.44	18.70	46.24	32.47	55.06	76.70	65.88
13	9.48	22.96	16.22	15.03	25.60	20.31	21.59	51.79	36.69	58.84	84.39	71.62
16	11.34	27.92	19.93	16.43	29.97	23.20	23.25	58.61	40.93	61.69	92.36	77.03
20	18.55	34.25	26.25	20.90	36.61	28.75	25.02	66.11	45.56	66.51	101.71	84.11
24	21.58	37.26	29.42	23.88	43.65	33.76	27.40	71.84	49.62	70.23	108.06	89.15
28	28.14	41.94	35.04	25.59	50.53	38.06	30.63	77.25	53.94	75.37	114.44	94.91

Tabela 27. Percentual médio de CO₂ evoluído em relação ao esperado (teórico) e real (excluído a diferença do branco mais inóculo).

DIAS DE INCUBAÇÃO	TRATAMENTOS (frascos)		
	corante índigo	corante preto enxofre	glicose
1	0.66	0.00	10.44
2	0.77	0.00	21.72
3	1.19	1.23	33.46
4	1.72	4.70	42.47
5	2.78	8.90	47.17
8	4.16	14.94	51.30
10	3.11	18.14	51.56
13	4.09	20.47	55.39
16	3.27	21.00	57.10
20	2.50	19.31	57.86
24	4.34	20.19	59.72
28	3.02	18.90	59.86

Tabela 28. Percentual de CO₂ nos tratamentos empregados.

DIAS DE INCUBAÇÃO	Corante índigo		Corante preto enxofre			índigo + preto enxofre			Glicose			
	3	4	Média	5	6	Média	7	8	Média	9	10	Média
	1	0.00	0.00	0.00	0.00	7.69	3.84	0.00	0.00	0.00	15.58	12.81
2	0.32	0.43	0.37	0.00	7.69	3.84	0.00	0.00	0.00	40.58	41.43	41.01
3	3.46	0.75	2.11	0.03	7.71	3.87	0.70	1.21	0.96	62.70	63.59	63.14
4	4.02	1.11	2.56	0.95	10.29	5.62	1.73	6.91	4.32	71.56	74.71	73.14
5	4.02	1.11	2.56	1.66	12.71	7.19	2.11	6.91	4.51	72.05	78.97	75.51
8	4.02	1.11	2.56	3.14	13.93	8.53	2.50	10.06	6.28	76.28	82.00	79.14
12	4.02	1.11	2.56	8.09	16.69	12.39	3.45	17.34	10.39	79.43	85.60	82.51
16	4.02	1.11	2.56	10.46	21.66	16.06	5.44	19.25	12.35	80.73	88.33	84.53
20	4.02	1.11	2.56	11.24	21.86	16.55	5.44	20.73	13.08	80.73	88.33	84.53
22	4.02	1.59	2.80	12.17	21.98	17.07	5.44	21.00	13.22	84.19	88.91	86.55
24	5.42	3.56	4.49	14.70	23.84	19.27	7.92	21.78	14.85	85.47	89.77	87.62
26	5.42	5.77	5.59	15.38	25.10	20.24	8.85	22.52	15.69	86.17	89.77	87.97
28	5.42	6.53	5.97	15.38	25.58	20.48	10.12	22.96	16.54	86.66	92.45	89.55

Tabela 29. Resultados do teste complementar ao de biodegradabilidade imediata, em meio basal estéril e não estéril, com o corante índigo e ação de descoloração por várias espécies/linhagens de *Pleurotus*.

Tratamento	Espécies/ linhagens	pH	p.s. micélio (mg)	Absov. 686	conc. 686 nm	conc. 686 mg	% descol 686 nm	% médio de Desco- loração
Índigo MB estéril	CCB 394	6,0	27,7	5,76	0,83	165,17	17,42	44,67
	CCB 394	6,0	19,3	3,574	0,51	101,95	49,02	
	CCB 394	6,0	14,6	2,292	0,32	64,88	67,56	
Índigo MB n estéril	CCB 394	7,0	27,1	0,986	0,22	43,67	78,16	80,74
	CCB 393	7,0	25,8	0,624	0,14	27,19	86,40	
	CCB 394	7,0	21,7	1,008	0,22	44,67	77,66	
Índigo MB estéril	Tailândia	5,0	12,4	4,516	0,65	129,19	35,40	62,10
	Tailândia	5,0	3,3	1,78	0,25	50,08	75,45	
	Tailândia	5,0	31,3	1,746	0,25	49,09	75,45	
Índigo MB n estéril	Tailândia	7,0	11,4	0,17	0,03	6,70	96,65	95,46
	Tailândia	7,0	21,1	0,23	0,05	9,03	95,49	
	Tailândia	7,0	12,9	0,28	0,06	11,48	94,26	
Índigo MB estéril	CCB 001	6,0	16,8	0,122	0,01	2,13	98,93	69,50
	CCB 001	6,0	15,4	3,93	0,56	112,25	43,88	
	CCB 001	6,0	15,4	2,422	0,34	68,64	65,68	
MB n estéril	CCB 001	6,0	16,8	0,25	0,05	10,16	94,92	96,31
	CCB 001	6,0	15,6	0,12	0,02	4,25	97,88	
	CCB 001	6,0	15,4	0,196	0,04	7,71	96,15	
Índigo MB estéril	CCB 396	6,0	14,7	4,888	0,70	139,95	30,02	92,45
	CCB 396	6,0	35,7	2,932	0,42	83,39	58,31	
	CCB 396	6,0	15,7	6,68	0,96	191,77	4,12	
Índigo MB n estéril	CCB 396	7,0	15	1,284	0,29	57,24	71,38	77,08
	CCB 396	7,0	27	1,275	0,28	56,83	71,59	
	CCB 396	7,0	12,7	0,542	0,12	23,46	88,27	

corante índigo / 686 nm $y=0,04842+6,91645x$ meio basal estéril e $y=0,02674+4,3932x$ meio não estéril

Tabela 29 (continuação). Resultados do teste complementar ao de biodegradabilidade imediata, em meio basal estéril e não estéril, com o corante índigo e ação de descoloração por várias espécies/linhagens de *Pleurotus*.

Tratamento	Espécies/ linhagens	pH	p.s. micélio (mg)	Absov. 686	conc. 686 nm	conc. 686 mg	% descol 686 nm	% médio de Desco- loração
Índigo MB estéril	POS 98/37	5,0	14,2	1,24	0,17	34,46	82,77	
	POS 98/37	5,0	8,2	2,314	0,33	65,52	67,24	77,59
	POS 98/37	5,0	15,3	1,24	0,17	34,46	82,77	
Índigo MB n estéril	POS 98/37	5,0	11,3	1,244	0,28	55,42	72,29	
	POS 98/37	5,0	15,6	0,419	0,09	17,86	91,07	85,36
	POS 98/37	5,0	15,7	0,347	0,07	14,58	92,71	
Índigo MB estéril	CCB 020	6,0		1,94	0,27	54,70	72,65	
	CCB 020	6,0	17,9	1,343	0,19	37,44	81,28	75,98
	CCB 020	6,0	21,6	1,846	0,26	51,99	74,01	
Índigo MB n estéril	CCB 020	6,0	11,3	0,347	0,07	14,58	92,71	
	CCB 020	6,0	15,6	0,692	0,15	30,29	84,86	72,52
	CCB 020	6,0	15,7	0,263	0,05	10,76	94,62	
Índigo MB estéril	PSC 94/03	5,0	17,6	0,685	0,09	18,41	90,79	
	PSC 94/03	5,0	23,9	3,476	0,50	99,12	50,44	65,07
	PSC 94/03	5,0	17,5	3,232	0,46	92,06	53,97	
Índigo MB n estéril	PSC 94/03	6,0	16,3	0,052	0,01	1,15	99,43	
	PSC 94/03	6,0	14	1,262	0,28	56,24	71,88	72,44
	PSC 94/03	6,0	16,8	0,15	0,03	5,61	97,19	

corante índigo / 686 nm $y=0,04842+6,91645x$ meio basal estéril e $y=0,02674+4,3932x$ meio não estéril

APÊNDICE 3

Tabela 30. Avaliação da atividade de peroxidase nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Amostra/ período de avaliação (dias)	Repetições	NF t10 Abs	NF t0 Abs	F t10 Abs	F t0 Abs	NF t10-t0 Abs	F t10- t0 Abs	NF-F Abs	U/L	Média	D.P	C.V
Controle 7	1.1	0,45	0,069	0,36	0,36	0,381	0	0,381	25,918	22,925	6,028	26,29422
	1.2	0,491	0,06	0,397	0,361	0,431	0,036	0,395	26,871			
	1.3	0,416	0,062	0,478	0,359	0,354	0,119	0,235	15,986			
PSC 94/03 7	2.1	0,608	0,067	0,319	0,145	0,541	0,174	0,367	24,966	24,875	0,617	2,481433
	2.2	0,673	0,057	0,389	0,147	0,616	0,242	0,374	25,442			
	2.3	0,668	0,081	0,384	0,153	0,587	0,231	0,356	24,218			
CCB 020 7	3.1	0,641	0,104	0,387	0,216	0,537	0,171	0,366	24,898	21,066	3,745	17,77668
	3.2	0,588	0,103	0,454	0,225	0,485	0,229	0,256	17,415			
	3.3	0,64	0,131	0,434	0,232	0,509	0,202	0,307	20,884			
Controle 14	1.1	0,551	0,088	0,372	0,057	0,463	0,315	0,148	10,068	10,590	0,903	8,530443
	1.2	0,61	0,117	0,381	0,059	0,493	0,322	0,171	11,633			
	1.3	0,536	0,097	0,355	0,064	0,439	0,291	0,148	10,068			
PSC 94/03 14	2.1	0,565	0,098	0,441	0,027	0,467	0,414	0,053	3,605	2,494	1,639	65,7003
	2.2	0,598	0,072	0,508	0,03	0,526	0,478	0,048	3,265			
	2.3	0,586	0,087	0,525	0,035	0,499	0,49	0,009	0,612			
CCB 020 14	3.1	0,756	0,102	0,553	0,069	0,654	0,484	0,17	11,565	14,263	2,343	16,42759
	3.2	0,762	0,097	0,503	0,065	0,665	0,438	0,227	15,442			
	3.3	0,755	0,1	0,479	0,056	0,655	0,423	0,232	15,782			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorbância (nm); PSC 94/03 e CCB 020 = linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Tabela 30 (continuação). Avaliação da atividade de peroxidase nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Controle Tempo 3	1.1	0,52	0,095	0,543	0,072	0,425	0,471	-0,046	-3,129	-1,383	1,531	-110,665
	1.2	0,551	0,103	0,55	0,098	0,448	0,452	-0,004	-0,272			
	1.3	0,564	0,117	0,559	0,101	0,447	0,458	-0,011	-0,748			
PSC 94/03 21	2.1	0,584	0,066	0,495	0,046	0,518	0,449	0,069	4,694	3,696	2,533	68,52791
	2.2	0,525	0,086	0,486	0,059	0,439	0,427	0,012	0,816			
	2.3	0,59	0,065	0,494	0,051	0,525	0,443	0,082	5,578			
CCB 020 21	3.1	0,613	0,088	0,507	0,07	0,525	0,437	0,088	5,986	9,048	2,879	31,81971
	3.2	0,601	0,088	0,435	0,061	0,513	0,374	0,139	9,456			
	3.3	0,604	0,089	0,405	0,062	0,515	0,343	0,172	11,701			
Controle 30	1.1	0,547	0,111	0,523	0,053	0,436	0,47	-0,034	-2,313	-1,655	1,023	-61,8262
	1.2	0,571	0,13	0,509	0,061	0,441	0,448	-0,007	-0,476			
	1.3	0,608	0,127	0,595	0,082	0,481	0,513	-0,032	-2,177			
PSC 94/03 T30	2.1	0,577	0,085	0,526	0,041	0,492	0,485	0,007	0,476	2,562	1,808	70,55823
	2.2	0,576	0,087	0,475	0,038	0,489	0,437	0,052	3,537			
	2.3	0,585	0,077	0,515	0,061	0,508	0,454	0,054	3,673			
CCB 020 30	3.1	0,587	0,108	0,504	0,069	0,479	0,435	0,044	2,993	4,467	1,993	44,61522
	3.2	0,574	0,092	0,506	0,078	0,482	0,428	0,054	3,673			
	3.3	0,577	0,095	0,469	0,086	0,482	0,383	0,099	6,735			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorbância (nm); PSC 94/03 e CCB 020 = linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Tabela 31. Avaliação da atividade de lignina peroxidases nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Amostra/ período de avaliação (dias)	Repetições	NF t10	NF t0	F t10	F t0	NF t10- t0	F t10- t0	NF-F	U/L	Média	D.P	C.V
Controle 7	1.1	2,333	2,36	2,234	2,276	-0,027	-0,042	0,015	0,269	0,108	0,147	136,4225
	1.2	2,277	2,331	2,203	2,261	-0,054	-0,058	0,004	0,072			
	1.3	2,268	2,304	2,219	2,254	-0,036	-0,035	-	-			
PSC 94/03 7	2.1	1,22	1,215	1,067	1,091	0,005	-0,024	0,029	0,520	0,693	0,214	30,85436
	2.2	1,214	1,191	1,081	1,11	0,023	-0,029	0,052	0,932			
	2.3	1,201	1,2	1,067	1,101	0,001	-0,034	0,035	0,627			
CCB 020 7	3.1	1,425	1,453	1,334	1,378	-0,028	-0,044	0,016	0,287	0,048	0,242	506,3657
	3.2	1,397	1,428	1,358	1,392	-0,031	-0,034	0,003	0,054			
	3.3	1,385	1,42	1,368	1,392	-0,035	-0,024	-	-			
Controle 14	1.1	2,244	2,297	2,163	2,112	-0,053	0,051	-	-	1,350	0,671	-49,6739
	1.2	2,225	2,297	2,158	2,197	-0,072	-0,039	0,033	0,591			
	1.3	2,197	2,351	2,182	2,247	-0,154	-0,065	0,089	1,595			
PSC 94/03 14	2.1	1,026	1,046	0,936	0,992	-0,02	-0,056	0,036	0,645	0,167	0,414	247,6677
	2.2	1,011	1,045	0,959	0,99	-0,034	-0,031	0,003	0,054			
	2.3	0,995	1,043	0,964	1,007	-0,048	-0,043	0,005	0,090			
CCB 020 14	3.1	1,228	1,261	1,371	1,404	-0,033	-0,033	0	0,000	0,484	0,420	86,78055
	3.2	1,227	1,234	1,341	1,39	-0,007	-0,049	0,042	0,753			
	3.3	1,257	1,291	1,326	1,399	-0,034	-0,073	0,039	0,699			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorvância (nm); PSC 94/03 e CCB 020 = linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Tabela 31 (continuação). Avaliação da atividade de lignina peroxidases nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Controle 21	1.1	1,919	1,947	1,971	1,988	-0,028	-0,017	-0,011	-0,197	-0,687	0,438	-63,7042
	1.2	1,9	1,968	1,947	1,969	-0,068	-0,022	-0,046	-0,824			
	1.3	1,931	1,993	1,962	1,966	-0,062	-0,004	-0,058	-1,039			
PSC 94/03 21	2.1	1,251	1,296	1,181	1,223	-0,045	-0,042	-0,003	-0,054	-0,018	0,271	-1509,97
	2.2	1,242	1,288	1,215	1,246	-0,046	-0,031	-0,015	-0,269			
	2.3	1,216	1,256	1,201	1,256	-0,04	-0,055	0,015	0,269			
CCB 020 21	3.1	1,535	1,555	1,535	1,571	-0,02	-0,036	0,016	0,287	0,358	0,082	22,91288
	3.2	1,53	1,557	1,56	1,612	-0,027	-0,052	0,025	0,448			
	3.3	1,522	1,553	1,554	1,604	-0,031	-0,05	0,019	0,341			
Controle 30	1.1	1,95	2,032	1,973	2,032	-0,082	-0,059	-0,023	-0,412	-0,323	0,570	-176,646
	1.2	1,957	2,006	1,936	2,001	-0,049	-0,065	0,016	0,287			
	1.3	1,873	1,995	1,939	2,014	-0,122	-0,075	-0,047	-0,842			
PSC 94/03 30	2.1	1,446	1,48	1,387	1,418	-0,034	-0,031	-0,003	-0,054	-0,418	0,678	-162,198
	2.2	1,399	1,486	1,351	1,371	-0,087	-0,02	-0,067	-1,201			
	2.3	1,416	1,481	1,354	1,419	-0,065	-0,065	-2,2E-16	0,000			
CCB 020 30	3.1	2,132	2,189	2,162	2,23	-0,057	-0,068	0,011	0,197	0,681	0,467	68,57271
	3.2	2,092	2,143	2,116	2,23	-0,051	-0,114	0,063	1,129			
	3.3	2,115	2,183	2,13	2,238	-0,068	-0,108	0,04	0,717			

Legenda: Nft10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; Nft0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorbância (nm); PSC 94/03 e CCB 020 = linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Tabela 32. Avaliação da atividade de lacase nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Amostra/ Período (dias)	Repetições	NF t10	NF t0	F t10	F t0	NF t10- t0	F t10- t0	NF-F	U/L	Média	D.P	C.V
Controle 7	1.1	0,468	0,061	0,332	0,034	0,407	0,298	0,109	5,590	5,607	1,256	22,41009
	1.2	0,444	0,049	0,301	0,04	0,395	0,261	0,134	6,872			
	1.3	0,441	0,056	0,34	0,04	0,385	0,3	0,085	4,359			
PSC 94/03 7	2.1	1,437	0,134	0,349	0,019	1,303	0,33	0,973	49,897	56,239	5,502	9,783788
	2.2	1,648	0,105	0,426	0,035	1,543	0,391	1,152	59,077			
	2.3	1,647	0,091	0,419	0,028	1,556	0,391	1,165	59,744			
CCB 020 7	3.1	0,844	0,179	0,349	0,027	0,665	0,322	0,343	17,590	31,453	12,872	40,9237
	3.2	1,217	0,217	0,383	0,041	1	0,342	0,658	33,744			
	3.3	1,41	0,219	0,396	0,044	1,191	0,352	0,839	43,026			
Controle 14	1.1	0,536	0,088	0,431	0,041	0,448	0,39	0,058	1,487	0,769	0,731	95,04385
	1.2	0,508	0,096	0,46	0,049	0,412	0,411	0,001	0,026			
	1.3	0,507	0,095	0,425	0,044	0,412	0,381	0,031	0,795			
PSC 94/03 14	2.1	0,719	0,093	0,531	0,041	0,626	0,49	0,136	3,487	4,718	1,085	23,00653
	2.2	0,73	0,075	0,516	0,061	0,655	0,455	0,2	5,128			
	2.3	0,73	0,072	0,486	0,044	0,658	0,442	0,216	5,538			
CCB 020 14	3.1	1,426	0,138	0,381	0,031	1,288	0,35	0,938	24,051	23,436	1,556	6,637992
	3.2	1,422	0,131	0,37	0,038	1,291	0,332	0,959	24,590			
	3.3	1,352	0,135	0,415	0,043	1,217	0,372	0,845	21,667			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorbância (nm); PSC 94/03 e CCB 020 = linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Tabela 32 (continuação). Avaliação da atividade de lacase nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Controle 21	1.1	0,494	0,094	0,505	0,077	0,4	0,428	-0,028	-0,718	-1,171	1,110	-94,8034
	1.2	0,483	0,129	0,514	0,065	0,354	0,449	-0,095	-2,436			
	1.3	0,494	0,095	0,488	0,075	0,399	0,413	-0,014	-0,359			
PSC 94/03 21	2.1	0,837	0,092	0,49	0,035	0,745	0,455	0,29	7,436	8,162	0,964	11,81391
	2.2	0,817	0,101	0,451	0,039	0,716	0,412	0,304	7,795			
	2.3	0,837	0,088	0,46	0,072	0,749	0,388	0,361	9,256			
CCB 020 21	3.1	1,101	0,095	0,477	0,046	1,006	0,431	0,575	14,744	14,333	0,359	2,504472
	3.2	1,057	0,107	0,471	0,07	0,95	0,401	0,549	14,077			
	3.3	1,036	0,095	0,44	0,052	0,941	0,388	0,553	14,179			
Controle 30	1.1	0,543	0,093	0,302	0,045	0,45	0,257	0,193	4,949	1,880	3,130	166,4549
	1.2	0,583	0,121	0,451	0,067	0,462	0,384	0,078	2,000			
	1.3	0,544	0,104	0,544	0,053	0,44	0,491	-0,051	-1,308			
PSC 94/03 30	2.1	0,74	0,073	0,524	0,044	0,667	0,48	0,187	4,795	3,615	1,466	40,54356
	2.2	0,715	0,081	0,511	0,036	0,634	0,475	0,159	4,077			
	2.3	0,651	0,099	0,508	0,033	0,552	0,475	0,077	1,974			
CCB 020 30	3.1	0,909	0,105	0,484	0,039	0,804	0,445	0,359	9,205	9,487	1,318	13,88937
	3.2	0,938	0,108	0,486	0,082	0,83	0,404	0,426	10,923			
	3.3	0,866	0,104	0,481	0,044	0,762	0,437	0,325	8,333			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorbância (nm); PSC 94/03 e CCB 020 = linhagens de *Pleurotus sajor-caju*.

Tabela 33. Avaliação da atividade de mangânes peroxidase nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Amostra/ período	Repetições	NF t10 Abs	NF t0 Abs	F t10 Abs	F t0 Abs	NF t10- t0 Abs	F t10- t0 Abs	NF-F Abs	U/L	Média	D.P	C.V
Controle 7	1.1	0,372	0,334	0,333	0,285	0,038	0,048	-0,01	-0,448	-0,747	0,274	-36,6606
	1.2	0,368	0,335	0,36	0,309	0,033	0,051	-0,018	-0,807			
	1.3	0,364	0,339	0,331	0,284	0,025	0,047	-0,022	-0,987			
PSC 94/03 7	2.1	0,542	0,105	0,147	0,088	0,438	0,059	0,379	16,996	16,726	0,237	1,418633
	2.2	0,537	0,108	0,147	0,089	0,429	0,058	0,371	16,637			
	2.3	0,529	0,102	0,145	0,087	0,427	0,058	0,369	16,547			
CCB 020 7	3.1	0,616	0,16	0,193	0,146	0,456	0,047	0,409	18,341	17,818	0,868	4,869387
	3.2	0,586	0,158	0,19	0,137	0,428	0,053	0,375	16,816			
	3.3	0,621	0,163	0,197	0,147	0,458	0,05	0,408	18,296			
Controle 14	1.1	0,422	0,39	0,405	0,364	0,032	0,041	-0,009	-0,404	-0,628	0,280	-44,6071
	1.2	0,4	0,38	0,409	0,368	0,02	0,041	-0,021	-0,942			
	1.3	0,42	0,398	0,413	0,379	0,022	0,034	-0,012	-0,538			
PSC 94/03 14	2.1	0,429	0,038	0,099	0,043	0,391	0,056	0,335	15,022	15,142	0,207	1,367858
	2.2	0,437	0,037	0,102	0,045	0,4	0,057	0,343	15,381			
	2.3	0,42	0,03	0,102	0,047	0,39	0,055	0,335	15,022			
CCB 020 14	3.1	0,795	0,151	0,197	0,141	0,644	0,056	0,588	26,368	26,368	1,300	4,931973
	3.2	0,768	0,152	0,203	0,146	0,616	0,057	0,559	25,067			
	3.3	0,807	0,15	0,198	0,158	0,657	0,04	0,617	27,668			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorvância (nm); CCB 020 e PSC 94/03 = *P. sajor-caju*.

Tabela 33 (continuação). Avaliação da atividade de mangânes peroxidase nos substratos colonizados e respectivos controles nos diferentes tempos de avaliação durante o período de incubação.

Controle 21	1.1	0,477	0,375	0,399	0,356	0,102	0,043	0,059	2,646	0,568	1,816	319,745
	1.2	0,411	0,375	0,403	0,362	0,036	0,041	-0,005	-0,224			
	1.3	0,413	0,383	0,405	0,359	0,03	0,046	-0,016	-0,717			
PSC 94/03 21	2.1	0,291	0,031	0,096	0,034	0,26	0,062	0,198	8,879	8,685	1,156	13,30878
	2.2	0,305	0,027	0,095	0,034	0,278	0,061	0,217	9,731			
	2.3	0,252	0,031	0,09	0,035	0,221	0,055	0,166	7,444			
CCB 020 21	3.1	0,366	0,077	0,141	0,083	0,289	0,058	0,231	10,359	11,450	0,945	8,255567
	3.2	0,392	0,073	0,136	0,084	0,319	0,052	0,267	11,973			
	3.3	0,407	0,081	0,144	0,086	0,326	0,058	0,268	12,018			
Controle 30	1.1	0,346	0,307	0,342	0,295	0,039	0,047	-0,008	-0,359	-0,239	0,504	-210,746
	1.2	0,344	0,301	0,347	0,289	0,043	0,058	-0,015	-0,673			
	1.3	0,346	0,301	0,337	0,299	0,045	0,038	0,007	0,314			
PSC 94/03 30	2.1	0,192	0,03	0,093	0,028	0,162	0,065	0,097	4,350	4,649	0,263	5,652217
	2.2	0,197	0,03	0,086	0,025	0,167	0,061	0,106	4,753			
	2.3	0,195	0,029	0,086	0,028	0,166	0,058	0,108	4,843			
CCB 020 30	3.1	0,296	0,08	0,149	0,085	0,216	0,064	0,152	6,816	6,114	0,743	12,14891
	3.2	0,281	0,084	0,144	0,085	0,197	0,059	0,138	6,188			
	3.3	0,263	0,079	0,15	0,085	0,184	0,065	0,119	5,336			

Legenda: NFt10 = extrato não fervido, após 10 minutos para reação; NFt0 = extrato não fervido no início, antes da reação; Ft10 = extrato fervido, após 10 minutos para reação; Ft0 = extrato fervido no início, antes da reação; D.P> = desvio padrão da média; C.V. = coeficiente de variação; Abs = absorbância (nm); CCB 020 e PSC 94/03 = *P. sajor-caju*.

Salmonella Assay - AMOSTRA CONTROLE

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE

Source/Batch/Lot:

Solvent: DMSO

Record No.: 1 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 110/01 Technician: JTS

Assay Type: Plate incorporation,

Strain: TA 98 Activation S9: -

Data File Name: A:\MODEL.SAL

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	28	20	27	25.00	4.36	24.07
	6.64	18	29	19	22.00	6.08	23.98
	11.07	18	24	27	23.00	4.58	23.92
	63.10	28	16		22.00	8.49	23.20
	127.31	15	29	37	27.00	11.14	22.31
	630.99	13	17	15	15.00	2.00	15.33
N	0.00	23	27	15			
P	0.05	3358	3412	3033			

S: Negative control for use in analysis (DMSO)

N: Negative control not used in analysis

P: Positive control not used in analysis 2-NITROFLUORENE

P-value for ANOVA test of dose response is 0.206

ANOVA test is not significant. Other significant results should be viewed with caution.

An acceptable model is Linear with pval = 0.768

Estimate of the slope is = -0.013859 .

Standard error of the slope is = 0.005282 .

90% confidence limits for the slope are <-0.023345, -0.004373>.

P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is 0.988

Note: Smaller P-value means more positive dose response

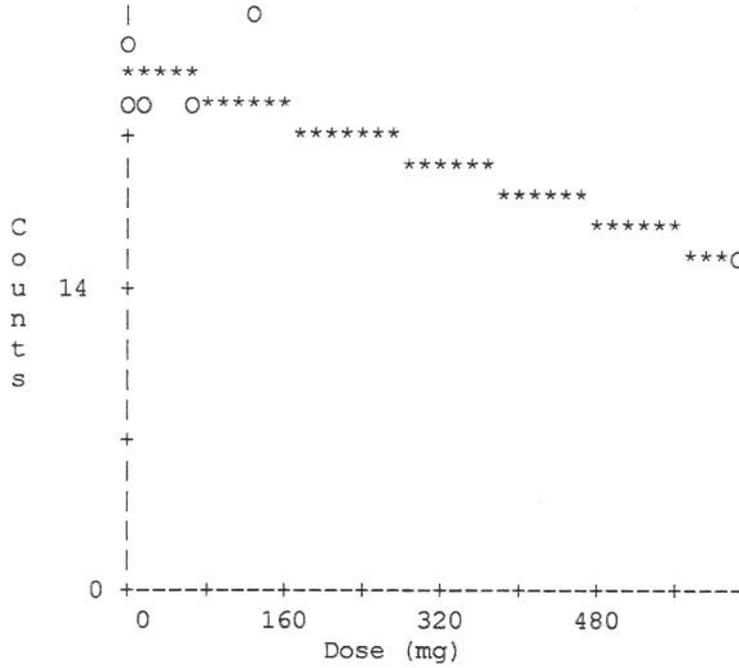
Salmonella Assay

Record No.: 1
110/01

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE
Tester Strain: TA 98



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Linear model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 2 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 110/01 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: -
 Data File Name: A:\MODEL.SAL

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	155	171	135	153.67	18.04	144.12
	6.64	121	96	138	118.33	21.13	143.18
	11.07	153	156	132	147.00	13.08	142.55
	63.10	148	153	139	146.67	7.09	135.22
	127.31	140	122	152	138.00	15.10	126.16
	630.99	60	75	28	54.33	24.01	55.12
N	0.00	167	168	154			
P	0.05	2925	3260	3130			

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis SODIUM AZIDE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Linear with pval = 0.287

Estimate of the slope is = -0.141044 .
 Standard error of the slope is = 0.015965 .
 90% confidence limits for the slope are <-0.169499, -0.112588>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 1.000
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

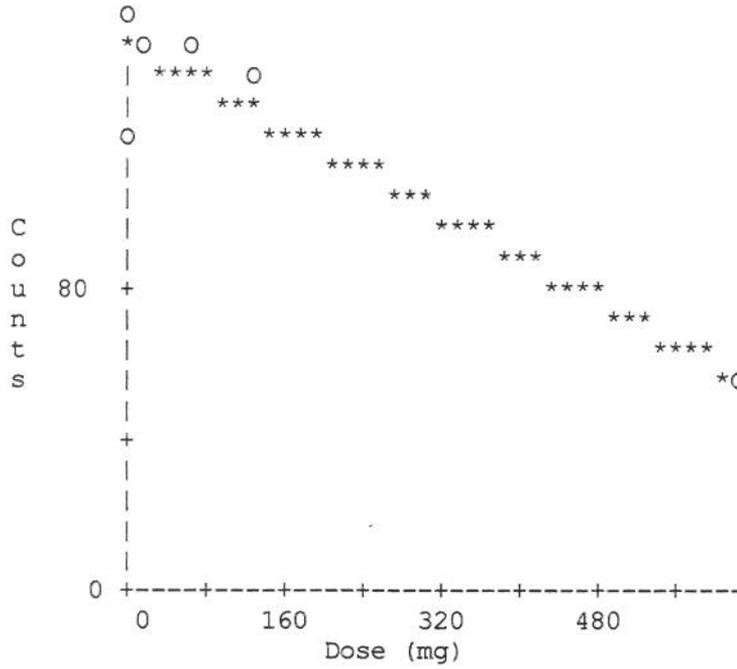
Salmonella Assay

Record No.: 2
110/01

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE
Tester Strain: TA 100



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Linear model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 3 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 110/01 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: + rat liver aroclor 0.5 mg/plate
 Data File Name: A:\MODEL.SAL

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	42	23	22	29.00	11.27	32.90
	6.64	23	33	31	29.00	5.29	32.77
	11.07	42	35	33	36.67	4.73	32.69
	63.10	34	33	28	31.67	3.21	31.75
	127.31	43	47	33	41.00	7.21	30.58
	630.99	15	29	18	20.67	7.37	21.42
N	0.00	28	22	28			
P	0.05	2210	2123	1755			

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-aminoanthracene
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.057
 ANOVA test is not significant. Other significant results
 should be viewed with caution.
 An acceptable model is Linear with pval = 0.241

Estimate of the slope is = -0.018185 .
 Standard error of the slope is = 0.006231 .
 90% confidence limits for the slope are <-0.029291, -0.007079>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.994

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Salmonella Assay

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 4 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 110/01 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: + rat liver aroclor 0.5 mg/plate
 Data File Name: A:\MODEL.SAL

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	165	162	107	144.67	32.65	154.10
	6.64	159	163	158	160.00	2.65	153.81
	11.07	165	137	264	188.67	66.73	153.61
	63.10	148	153		150.50	3.54	151.33
	127.31	126	119	142	129.00	11.79	148.51
	630.99	117	143	130	130.00	13.00	126.37
N	0.00	159	186	157			
P	0.05	3000	3412				

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-aminoanthracene
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.260
 ANOVA test is not significant. Other significant results
 should be viewed with caution.
 An acceptable model is Linear with pval = 0.323

Estimate of the slope is = -0.043940 .
 Standard error of the slope is = 0.028631 .
 90% confidence limits for the slope are <-0.095356, 0.007477>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.923
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

Salmonella Assay

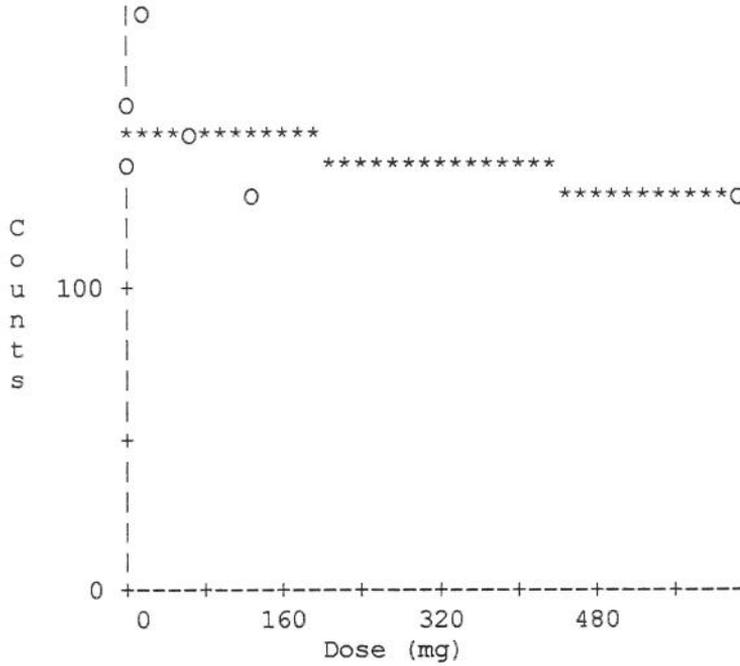
Record No.: 4
110/01

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: AMOSTRA CONTROLE

Tester Strain: TA 100



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Linear model.

Salmonella Assay - PSC 94/03

Test Sample Name: PSC 94/03
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 1 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 111/00 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: + rat liver aroclor 0.5 mg/plate
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Lintox2
S	0.00	32	38	31	33.67	3.79	31.64
	5.00	28	39	32	33.00	5.57	37.48
	10.00	48	44	41	44.33	3.51	43.28
	50.00	87	104	124	105.00	18.52**	87.59
	100.00	140	102	129	123.67	19.55**	132.61
	500.00	15	39	51	35.00	18.33	35.88
N	0.00	49	48	38			
P	0.05	1690	2578	2708			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-AMINOANTHRACENE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Lintox2 with pval = 0.373

Estimate of the slope is = 1.169158 .
 Standard error of the slope is = 0.149717 .
 90% confidence limits for the slope are <0.902309, 1.436007>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.000

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Salmonella Assay

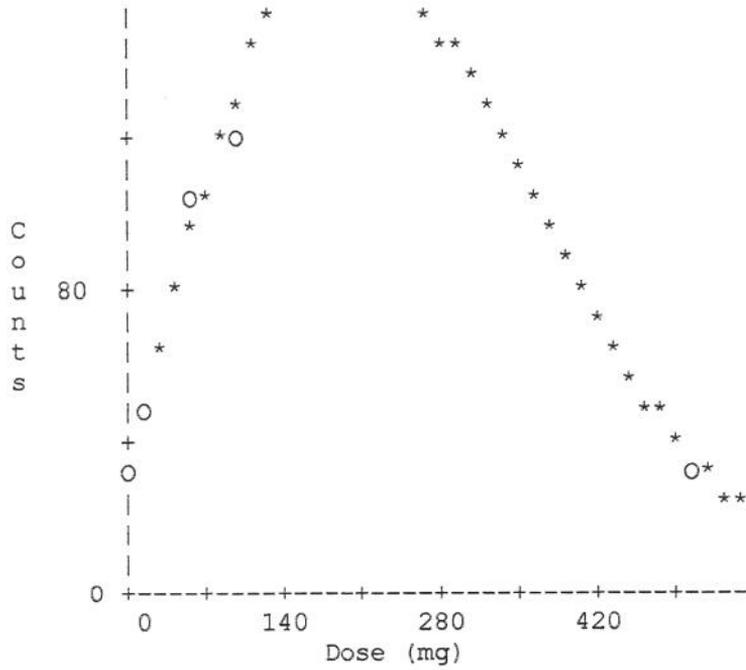
Record No.: 1

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.: 111/00

Test Sample Name: PSC 94/03

Tester Strain: TA 98



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Lintox2 model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: PSC 94/03
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 2 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 111/00 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: + rat liver aroclor 0.5 mg/plate
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted
S	0.00	97	126	131	118.00	18.36	
	5.00	387	353	320	353.33	33.50**	
	10.00	125	159	127	137.00	19.08	
	50.00	154	169	129	150.67	20.21	
	100.00	131	198	155	161.33	33.95	
	500.00	78	106	113	99.00	18.52	
N	0.00	121	119	121			
P	0.05	5395	4268	4116			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-AMINOANTHRACENE
 No acceptable model found

Analysis of variance

source	SS	DF	F-val	prob
Between doses	2754.98	5	17.41	0.000
Within doses	358.05	12		

Salmonella Assay

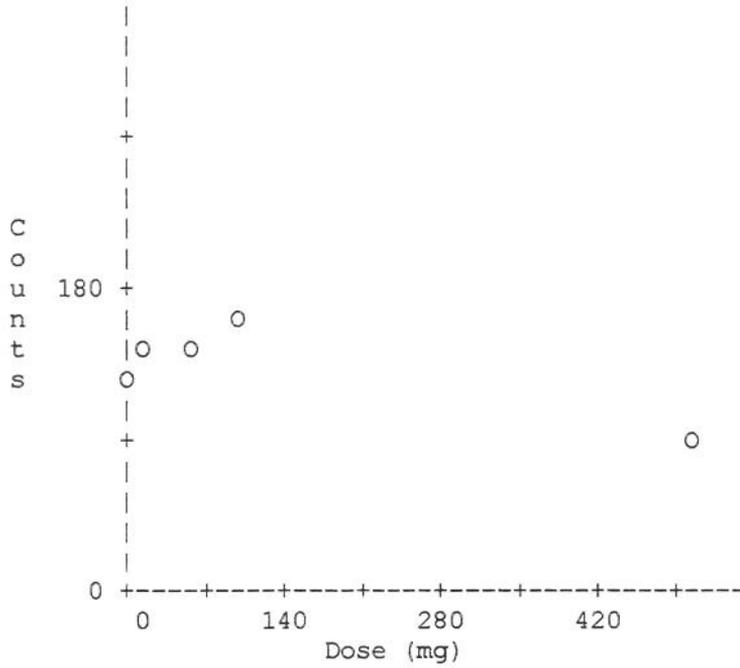
Record No.: 2
111/00

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: PSC 94/03

Tester Strain: TA 100



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Anova model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: PSC 94/03
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 3 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 111/00 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: -
 Data File Name: A:\MODEL.SAL

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Bernstein
S	0.00	13	15	16	14.67	1.53	14.27
	5.00	22	26	15	21.00	5.57	22.35
	10.00	30	35	30	31.67	2.89**	30.42
	50.00	41	36	37	38.00	2.65**	
	100.00	126	106	132	121.33	13.61**	
	500.00	35	30	28	31.00	3.61**	
N	0.00	20	15	18			
P	0.05	3900	4073	4420			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-NITROFLUORENE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.000
 An acceptable model is Bernstein with pval = 0.929
 Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 1.614615 .
 Standard error of the slope is = 0.276502 .
 90% confidence limits for the slope are <1.121789, 2.107441>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.000
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

Salmonella Assay

Test Sample Name: PSC 94/03
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 4 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 111/00 Technician: JTS
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: -
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Lintox1
S	0.00	131	144	137	137.33	6.51	138.72
	5.00	129	129	130	129.33	0.58	143.10
	10.00	133	146	195	158.00	32.70	147.30
	50.00	192	258	199	216.33	36.25*	174.60
	100.00	193	133	199	175.00	36.50	195.68
	500.00	167	114	167	149.33	30.60	147.80
N	0.00	94	107	112			
P	0.05	3546	4640	4030			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis (DMSO)
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis SODIUM AZIDE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.035
 An acceptable model is Lintox1 with pval = 0.094

Estimate of the slope is = 1.372848 .
 Standard error of the slope is = 0.356668 .
 90% confidence limits for the slope are <0.737137, 2.008558>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Salmonella Assay

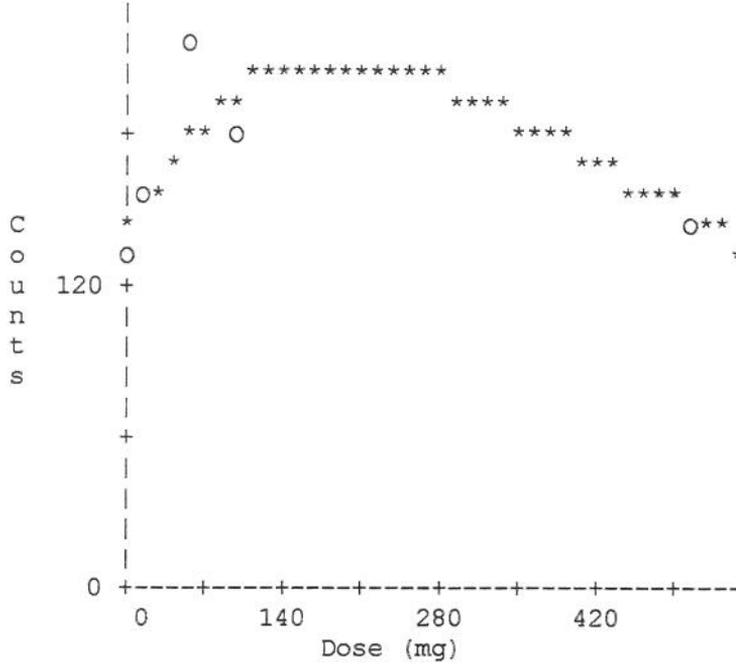
Record No.: 4
111/00

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: PSC 94/03

Tester Strain: TA 100



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Lintox1 model.

Salmonella Assay - CCB 020

Test Sample Name: CCB 020
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 1 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 112/00 Technician: jts
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: -
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Lintox1
S	0.00	14	19	17	16.67	2.52	19.78
	5.00	23	20	25	22.67	2.52	20.37
	10.00	27	19	33	26.33	7.02	20.94
	50.00	21	25	22	22.67	2.08	24.94
	100.00	28	24	37	29.67	6.66	28.73
	500.00	32	35	29	32.00	3.00**	32.02
N	0.00	17	20	22			
P	0.05	2881	2491				

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis DMSO
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2-NITROFLUORENE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.006
 An acceptable model is Lintox1 with pval = 0.065

Estimate of the slope is = 0.164420 .
 Standard error of the slope is = 0.052840 .
 90% confidence limits for the slope are <0.070239, 0.258600>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.005

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Salmonella Assay

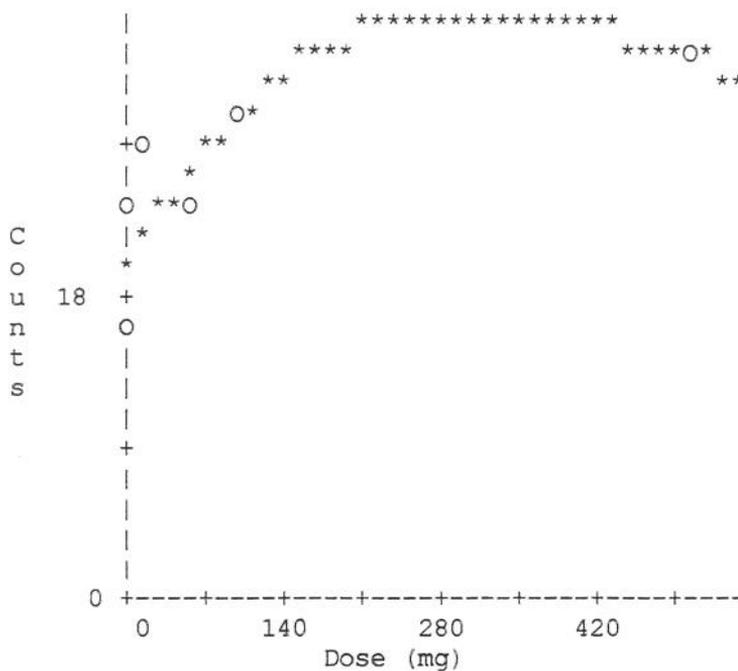
Record No.: 1
112/00

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: CCB 020

Tester Strain: TA 98



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Lintox1 model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: CCB 020
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 2 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 112/00 Technician: jts
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: -
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Bernstein
S	0.00	121	118	106	115.00	7.94	88.84
	5.00	76	78	102	85.33	14.47	88.78
	10.00	76	87	66	76.33	10.50	88.72
	50.00	91	90	82	87.67	4.93	88.23
	100.00	78	94	97	89.67	10.21	87.61
	500.00	139	90	112	113.67	24.54	
N	0.00	128	126	123			
P	0.05	3575	3986	4745			

S: Negative control for use in analysis DMSO
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis sodium azide
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.022
 An acceptable model is Bernstein with pval = 0.052
 Bernstein model used the first 5 doses

Estimate of the slope is = -0.012281 .
 Standard error of the slope is = 0.086988 .
 90% confidence limits for the slope are <-0.167324, 0.142763>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.555
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

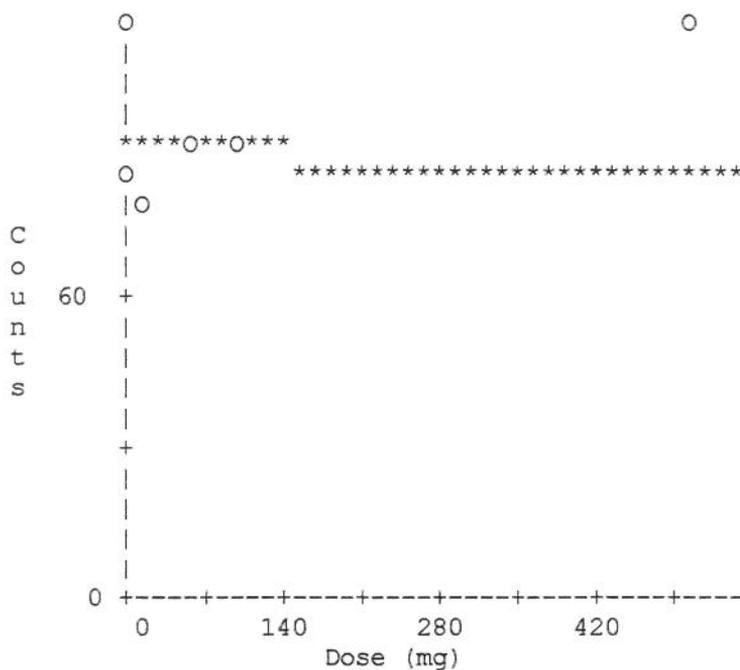
Salmonella Assay

Record No.: 2
112/00

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: CCB 020
Tester Strain: TA 100



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Bernstein model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: CCB 020
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 3 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 112/00 Technician: jts
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 98 Activation S9: + RAT LIVER AROCLOR 0.5mg/plate
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	26	31	30	29.00	2.65	33.74
	5.00	27	33	32	30.67	3.21	33.83
	10.00	34	39	30	34.33	4.51	33.92
	50.00	46	44	38	42.67	4.16*	34.67
	100.00	43	54	32	43.00	11.00	35.61
	500.00	50	32	41	41.00	9.00	43.09
N	0.00	25	35	32			
P	0.05	1600	2500	1348			

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis DMSO
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis 2AMINOANTHRACENE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.043
 An acceptable model is Linear with pval = 0.070

Estimate of the slope is = 0.018708 .
 Standard error of the slope is = 0.008508 .
 90% confidence limits for the slope are <0.003544, 0.033872>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.024

Note: Smaller P-value means more positive dose response

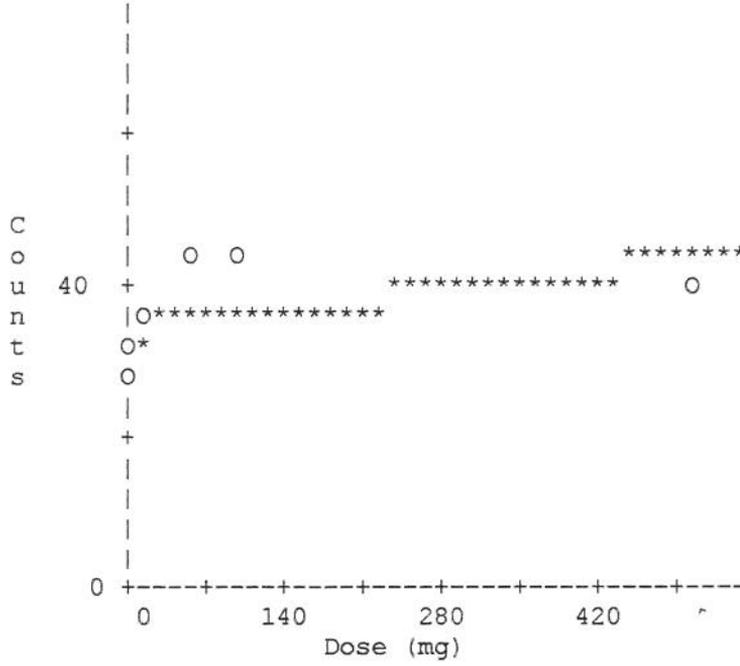
Salmonella Assay

Record No.: 3
112/00

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: CCB 020
Tester Strain: TA 98



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Linear model.

Salmonella Assay

Test Sample Name: CCB 020
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: DMSO
 Record No.: 4 Exp. Date: 04/24/01 Exp. No.: 112/00 Technician: jts
 Assay Type: Plate incorporation,
 Strain: TA 100 Activation S9: + RAT LIVER AROCLOR 0.5mg/plate
 Data File Name: a:\model.sal

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear
S	0.00	94	103	101	99.33	4.73	87.99
	5.00	89	105	122	105.33	16.50	88.53
	10.00	73	91	92	85.33	10.69	89.07
	50.00	106	64	71	80.33	22.50	93.41
	100.00	83	76	118	92.33	22.50	98.83
	500.00	140	128	176	148.00	24.98	142.20
N	0.00	97	118	116			
P	0.05	4723	5070	5540			

S: Negative control for use in analysis DMSO
 N: Negative control not used in analysis
 P: Positive control not used in analysis ZAMINOANTRACENE
 P-value for ANOVA test of dose response is 0.030
 An acceptable model is Linear with pval = 0.244

Estimate of the slope is = 0.108431 .
 Standard error of the slope is = 0.031062 .
 90% confidence limits for the slope are <0.053066, 0.163795>.

P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.002

Note: Smaller P-value means more positive dose response

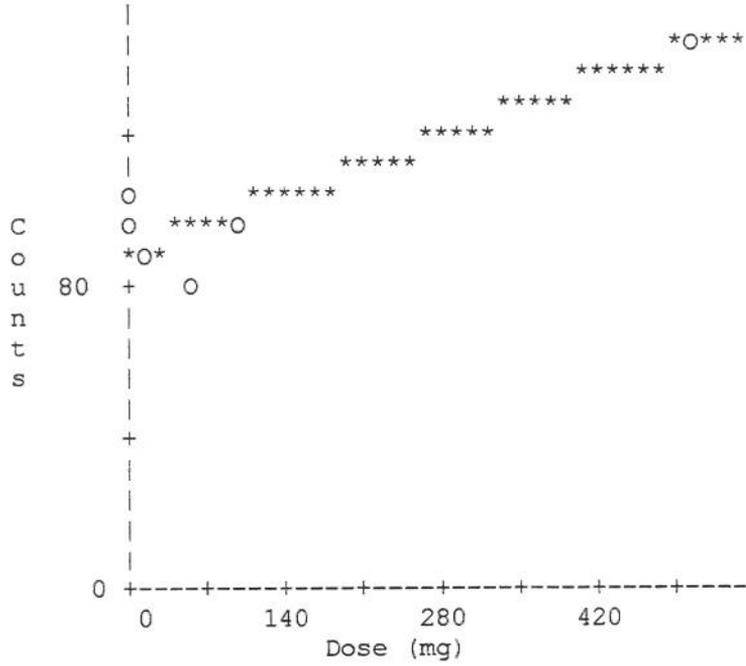
Salmonella Assay

Record No.: 4
112/00

Experiment Date: 04/24/01

Experiment No.:

Test Sample Name: CCB 020
Tester Strain: TA 100



O = Observed; * = Predicted.
The predicted values are based on Linear model.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE