

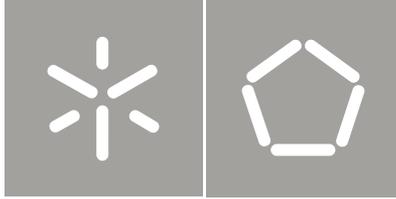


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

**Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada**

Cristiane Ottoni

**Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Cristiane Ottoni

**Descoloração de corantes têxteis por fungos  
ligninolíticos em condições de pH  
e salinidade elevada**

Tese de Doutoramento  
Engenharia Química e Biológica

Trabalho efectuado sob a orientação do  
**Professor Doutor Nelson Lima**  
**Doutor Cledir Santos**

**Autor:** Cristiane Angélica Ottoni

**Título da tese:** Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada

**Orientador:**

Professor Doutor Nelson Lima

Doutor Cleidir Santos

**Email:** c.a.ottoni@hotmail.com

Ano de conclusão: 2012

Doutoramento em Engenharia Química e Biológica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITO DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Aos meus pais, Alaide e Nelson, pelas  
valerosas lições de vida e pela eterna  
confiança em minhas escolhas.

Dedico



---

## *Agradecimentos*

A execução desta tese de doutoramento não teria sido possível sem a intervenção de várias pessoas que em muito contribuíram durante estes anos, cada um à sua maneira.

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Nelson Lima pelo seu infinito incentivo de forma desafiadora, seu entusiasmo e amplo conhecimento que me foram inspiradores, oferecendo-me a oportunidade de trabalhar como um membro de seu grupo de pesquisa e acreditando na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Doutor Cledir Santos, muito obrigada pela partilha de conhecimentos essenciais à execução deste trabalho e por todo o apoio.

Ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela disponibilidade de meios físicos e técnicos indispensáveis à elaboração deste trabalho.

Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida contribuindo de maneira decisiva para a concretização de nossos objetivos. Meu profundo agradecimento à Elisabete Silva, Isabel Soares, Madalena Vieira, Maria Conceição Gomes Cunha, Paulino Amorim e Sónia Silva pela atenção, carinho, disponibilidade e apoio prestados.

Aos meus colegas da Micoteca da Universidade do Minho e Departamento de Engenharia Biológica: Andréa Santos, Célia Soares, Graça Pinto, Héctor Morales, Isabel Santos, Leonel Pereira, Lúcia Sequeira, Luis Lima, Marta Simões, Marília Maciel, Nicolina Dias, Otniel Freitas, Virgínia Siqueira e Zlatina Genisheva que serão sempre lembrados como companheiros no aprendizado de vida durante estes anos. Em especial, a Franklin Nóbrega, Sara Fernandes, Susana Moreira e Thalita Calado pelas sugestões efetuadas que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

A todos os amigos expresse uma profunda gratidão, em especial a algumas pessoas que fizeram toda a diferença nesta etapa do percurso de minha vida: Ana Novo, Ana Margarida Novo, Adriano Gonçalves, Alessandro Sousa, Karine Berg, José Silva, Rosa Gonçalves e Rui Vilarinho.

Finalmente, devo o mais profundo e mais querido agradecimento à minha família pela compreensão e apoio constantes, meu amor, carinho e eterna gratidão.



---

## **Resumo**

O principal objetivo deste trabalho consistiu em selecionar e avaliar diferentes estirpes de fungos da podridão branca da madeira (Fpb) quanto à capacidade de descoloração, em condições similares às apresentadas na indústria têxtil, utilizando o corante azo Reativo Preto 5 (RP5). O corante Poly R-478 (PR478) foi utilizado como parâmetro comparativo por ser considerado um indicador da atividade de enzimas existentes no sistema ligninolítico dos Fpb. O trabalho inicial foi realizado com doze estirpes de Fpb em meio de cultura sólido e permitiu a seleção das estirpes aptas em descolorir estes corantes em condições restritivas. A extensão da descoloração dos dois corantes e a atividade das enzimas ligninolíticas envolvidas neste processo foram avaliadas, utilizando-se as estirpes *Trametes versicolor* MUM 94.04, 04.100 e 04.101 para além da estirpe modelo de estudo *Phanerochaete chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725), em meio de cultura líquido (MCL) alcalino sob agitação. As estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram uma taxa de descoloração de 100 % em MCL na presença do corante RP5. Definido o valor de pH, foram realizados novos ensaios com diferentes concentrações de NaCl adicionado à composição do MCL com o corante RP5. Os melhores resultados de descoloração e atividade enzimática foram obtidos em MCL contendo 15 g·l<sup>-1</sup> de NaCl na sua composição, onde a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 foi a única que apresentou uma taxa de descoloração de 100 %. Esta estirpe apresentou atividade de lacase (Lcc) e lignina-peroxidase (LiP) em valores superiores aos obtidos nas melhores condições de alcalinidade. Em MCL agitado e com os parâmetros pH e concentração de NaCl otimizados, comparou-se a capacidade da estirpe *T. versicolor* imobilizada em dois suportes sintéticos: espuma de poliuretano (EPO) e esponja de “nylon” (EN), com os resultados obtidos com células livres. Esta estirpe imobilizada em EPO e EN manteve uma taxa de descoloração do corante RP5 igual ou superior a 85 % por 18 (6 ciclos) e 21 (7 ciclos) dias. A ampliação da escala neste estudo foi feita em dois tipos de reatores: de leito fixo e de bancada. O conjunto de experimentos realizados no reator de leito fixo com células livres e imobilizadas proporcionou uma taxa de descoloração de 100 %. A adição de glicerol ao meio de cultivo promoveu uma maior atividade da enzima lacase. Em contrapartida, o controle rígido do pH nos ensaios com reator de bancada denotou a inibição do microrganismo, necessitando-se assim uma maior investigação dos parâmetros de

---

operação. Além disso, verificou-se que indução da expressão genética da lacase foi superior quando o MCL possuía glicerol como co-substrato.

Em conclusão, os excelentes resultados obtidos com a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, proporcionará boas perspectivas futuras quanto a estudos de avaliação dos mecanismos metabólicos e de compostos intermediários que são formados a partir deste corante. Do mesmo modo, o aprofundamento do estudo do processo degradativo do corante com esta estirpe poderá ser avaliado com fontes alternativas de carbono, que poderão potencializar a síntese e consequente aumento da atividade enzimática Lcc.

Palavras chave: *Trametes versicolor*, Reativo Preto 5, condição alcalina, descoloração, lacase.

---

## ***Abstract***

The main goal of this work was to select and evaluate different strains of white rot fungi (Wrf) to the capability to decolourise azo dyes in similar conditions to those presented in the textile industry, using the Reactive Black 5 (RB5). The dye Poly R-478 (PR478) was used as a comparative parameter for being considered as an indicator of the activity of the ligninolytic system of the Wrf. The initial assays were performed with twelve strains of Wrf in solid medium which allowed the selection of strains able to decolourise these dyes in restringent conditions.

The extension of the decolourisation for both dyes and the activity of the ligninolytic enzymes involved in this process were evaluated, using the strains *Trametes versicolor* MUM 94.04, 04.100 and 04.101, and the *Phanerochaete chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725) as reference strain, in alkaline liquid culture medium (LCM) under stirring conditions. The strains *T. versicolor* MUM 94.04 and MUM 04.100 showed a decolourising rate of 100 % in LCM with the presence of RB5. A optimal value of pH was defined and new assays were made with different concentrations of NaCl added to the composition of the MCL with the dye RB5. The best decolourising results and the enzymatic activity were obtained in MCL containing  $15\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  of NaCl in its composition, where the strain *T. versicolor* MUM 04.100 presented a decolourising rate of 100 %. This strain presented higher values of laccase (Lcc) and lignin-peroxidase (LiP) activity when compared to those obtained in the best alkaline conditions. In stirred MCL with RB5 and under optimised parameters of pH and NaCl, the capacity of the immobilised strain in two synthetic carriers, polyurethane foam (EPO) and nylon sponge (EN), to decolourise the dye was studied and compared with the results obtained for the free cell cultures. This strain, immobilized in EPO and EN maintained a decolourising rate, for the dye RB5, equal or higher than 85 % for 18 (6 cycles) and 21 (7 cycles) days. The scale-up of this assay was performed using two types of reactors: fixed bed and stirred tank. The set of assays performed in the fixed bed reactor with free and immobilized cells provided a decolourising rate of 100 %. The addition of glycerol to the medium promoted a higher activity of laccase. However, the pH control on the assays with the stirred tank denoted the inhibition of the microorganism, thus requiring further research of the operation parameters. Moreover, it was found that the induction of the genic expression of the laccase was higher when using MCL with glycerol as a co-substrate.

---

In conclusion, the excellent results obtained with strain *T. versicolor* MUM 04.100 will provide future prospects for studies of metabolic pathways and intermediates metabolites that are formed from this dye under biodegradation conditions. Additionally, further study of degradation process of the dye with this strain can be assessed with alternative sources of carbon, which may stimulate the synthesis and consequent increase the Lcc activity.

Keywords: *Trametes versicolor*, Reactive Black 5, alkaline condition, decolourisation, laccase.

---

## Índice

<b>Capítulo 1</b> Introdução Geral .....	1
1.1. Considerações gerais .....	3
1.2. Objetivos.....	4
1.3. Estrutura da tese.....	5
<b>Capítulo 2</b> Revisão da Literatura.....	7
2.1. Indústria e efluentes têxteis .....	9
2.1.1. Setor têxtil em Portugal .....	9
2.1.2. Efluentes têxteis.....	10
2.2. Corantes .....	12
2.2.1. Classificação dos corantes .....	13
2.2.2. Corantes azo .....	16
2.3. Métodos de remoção de corantes de efluentes têxteis.....	18
2.4. Fungos da podridão branca da madeira (Fpb) .....	21
2.4.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	22
2.4.2. <i>Trametes versicolor</i> .....	23
2.5. Enzimas modificadoras de lignina (LMEs) .....	23
2.5.1. Lignina Peroxidase (LiP).....	24
2.5.2. Manganês Peroxidase (MnP).....	25
2.5.3. Lacase (Lcc) .....	27
2.5.4. Glioxal-oxidase (GLOX).....	31
2.6. Seleção de Fpb para tratamento de efluentes têxteis .....	32
2.6.1. Alguns fatores que influenciam o desempenho dos Fpb na descoloração de corantes têxteis .....	34
2.7. Tipos de fermentação.....	42
2.8. Reatores .....	42
2.9. Etapas da investigação.....	46
<b>Capítulo 3</b> Materiais e Métodos .....	47
3.1. Corantes têxteis .....	49
3.2. Microrganismos e meios de cultura.....	50
3.2.1. Microrganismos .....	50
3.2.2. Meios de cultura .....	50
3.2.3. Inóculo .....	51
3.3. Suportes sintéticos .....	52
3.3.1. Espuma de poliuretano (EPO) e esponja de <i>nylon</i> (EN) .....	52

---

3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	52
3.4. Métodos analíticos.....	52
3.4.1. Quantificação dos corantes.....	52
3.4.2. Quantificação da biomassa.....	53
3.4.3. Quantificação da sacarose.....	53
3.4.4. Quantificação das atividades enzimáticas.....	53
3.5. Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos.....	55
3.5.1. Rastreamento para a seleção de estirpes.....	55
3.5.2. Descoloração dos corantes em Erlenmeyers sob agitação.....	55
3.5.3. Utilização de diferentes reatores na descoloração do corante RP5.....	57
3.6. Efeito da influência do pH e de diferentes fontes de carbono na expressão gênica da lacase em <i>T. versicolor</i> MUM 04.100.....	61
3.6.1. Isolamento do DNA genômico.....	61
3.6.2. Desenho dos primers.....	62
3.6.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	62
3.7. Isolamento do RNA genômico.....	64
3.7.1. Tratamento para eliminação das nucleases.....	64
3.7.2. Extração do RNA fúngico.....	64
3.8. Sondas DIG.....	66
3.9. Eletroforese com gel MOPS/Formaldeído de RNA.....	66
3.9.1. Northern blot.....	67
3.10. Reação de transcriptase reversa de cadeia de polimerase (RT-PCR).....	69
3.10.1. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	69
3.10.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) segundo a Invitrogen.....	69
3.10.3. Quantificação dos níveis de expressão gênica.....	70
<b>Capítulo 4 Resultados.....</b>	<b>71</b>
4.1. Rastreamento das estirpes na descoloração de corantes têxteis.....	73
4.1.1. Efeito da concentração dos corantes RP5 e PR478 na descoloração.....	73
4.1.2. Efeito do pH na descoloração dos corantes.....	75
4.1.3. Efeito da adição de NaCl ao meio alcalino na descoloração dos corantes... ..	77
4.2. Descoloração de corantes têxteis em meio de cultura líquido (MCL).....	81
4.2.1. Descoloração de RP5 e PR478 em meio de cultura alcalino.....	81
4.2.2. Descoloração de RP5 em meio de cultura salino.....	92
4.2.3. Utilização da estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 imobilizada na descoloração de RP5.....	97
4.3. Descoloração de RP5 em reatores pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100.....	102
4.3.1. Reator contínuo de leito fixo.....	102
4.3.2. Estudos em condições fed-batch.....	108

---

---

4.4. Expressão gênica de lacase .....	111
<b>Capítulo 5</b> Discussão .....	115
5.1. Seleção de estirpes de Fpb na descoloração de corantes têxteis.....	117
5.2. Descoloração de corantes têxteis em Erlenmeyers .....	117
5.3. Utilização de células imobilizadas para descoloração de corantes.....	119
5.4. Descoloração de RP5 em reatores .....	120
5.5. Expressão gênica de enzimas ligninolítica .....	121
<b>Capítulo 6</b> Conclusão .....	123
6.1. Conclusões gerais .....	125
6.2. Perspectivas futuras .....	126
<b>Capítulo 7</b> Bibliografia .....	129



---

### *Lista de abreviaturas e siglas*

<b>AL7</b>	Ácido Laranja 7
<b>AAO</b>	Aril álcool-oxidase
<b>AV</b>	Álcool veratrílico
<b>CBR</b>	Reator biológico de contato rotativo
<b>CDH</b>	Celobiose-desidrogenase
<b>C.I.</b>	<i>Colour Index</i>
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>D.L.</b>	Decreto Lei
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EN</b>	Esponja de “nylon”
<b>EPO</b>	Espuma de poliuretano
<b>FS</b>	Fermentação submersa
<b>FES</b>	Fermentação em estado sólido
<b>GLOX</b>	Glioxal-oxidase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HBT</b>	1-hydroxibenzotriazole
<b>Lcc</b>	Lacase
<b>LIP</b>	Lignina-peroxidase
<b>MCS</b>	Meio de cultura sólido
<b>MCL</b>	Meio de cultura líquido
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MiP</b>	Manganês-independente-peroxidase
<b>MPA</b>	Meio de pré-adaptação
<b>MUM</b>	Micoteca da Universidade do Minho
<b>MnP</b>	Manganês-peroxidase
<b>OMC</b>	Oxidases multi-cobre azuis
<b>PR478</b>	Poli R-478
<b>QR</b>	quinona redutases
<b>RBBR</b>	Remazol Brilhante Azul R
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RP5</b>	Reativo Preto 5
<b>RSM</b>	Metodologia de superfície de resposta
<b>RT-PCR</b>	Reação de transcriptase reversa de cadeia de polimerase

---

<b>SDS</b>	Sulfato dodecil de sódio
<b>SML</b>	Sistema mediador de lacase
<b>SSC</b>	Solução salina citrato
<b>S.S.</b>	Sólidos suspensos
<b>VP</b>	Versátil-peroxidase

---

## Lista de figuras

- Figura 2.1.** Representação esquemática dos efeitos diretos e indiretos gerados por efluentes têxteis ao ecossistema (Adaptado Verma *et al.*, 2012). ..... 12
- Figura 2.2.** Representação esquemática da síntese de corantes azo bioacessíveis (Martins *et al.*, 2001). ..... 17
- Figura 2.3.** Representação esquemática da degradação de corantes azo: (A) Aeróbio e (B) Anaeróbio (vanderZee e Villaverde, 2005; Gonçalves *et al.*, 2008). .... 20
- Figura 2.4.** Estrutura de um segmento polimérico da lignina (Brunow, 2001). ..... 22
- Figura 2.5.** Diagrama esquemático da degradação da lignina pelo sistema enzimático de Fpb. Lcc: lacase; SML: sistema mediador de lacase; LiP: lignina-peroxidase; MnP: manganês-peroxidase; VP: versátil-peroxidase; H<sub>2</sub>O-GO: geração de oxidases; AAD; aril álcool desidrogenases; QR: quinona redutases (Adaptado de Dashtban *et al.*, 2010). ..... 24
- Figura 2.6.** Mecanismo de ação da Lcc em substratos fenólicos (A) e não fenólicos (B) (Brijwani *et al.*, 2010). ..... 30
- Figura 2.7.** Fluxograma das etapas de investigação do presente trabalho. .... 46
- Figura 3.1.** Reator contínuo de leito fixo operado com células livres e imobilizadas: (1) alimentação, (2) bomba peristáltica, (3) entrada da alimentação, (4) entrada de ar, (5) retirada da amostra, (6) saída do descarte, (7) descarte, (8) condensador. .... 58
- Figura 4.1.** Descoloração de RP5 por 4 estirpes de Fpb em condições extremas de pH e salinidade: 1: Controle; 2: NaCl 5,0 g·l<sup>-1</sup>; 3: NaCl 10,0 g·l<sup>-1</sup>; 4: NaCl 15,0 g·l<sup>-1</sup>; 5: NaCl 20,0 g·l<sup>-1</sup>; pH 9,0; 30 °C; 28 dias de incubação. .... 78
- Figura 4.2.** Descoloração de PR478 por 4 estirpes de Fpb em condições extremas de pH e salinidade: 1: Controle; 2: NaCl 5,0 g·l<sup>-1</sup>; 3: NaCl 10,0 g·l<sup>-1</sup>; 4: NaCl 15,0 g·l<sup>-1</sup>; 5: NaCl 20,0 g·l<sup>-1</sup>; pH 8,0; 30 °C; 28 dias de incubação. .... 79
- Figura 4.3.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 94.04. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 82
- Figura 4.4.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.100. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 83
- Figura 4.5.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.101. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 84

- 
- Figura 4.6.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *P. chrysosporium* MUM 94.15. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 85
- Figura 4.7.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *P. chrysosporium* MUM 94.15. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 86
- Figura 4.8.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *T. versicolor* MUM 94.04. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 87
- Figura 4.9.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *T. versicolor* MUM 04.100. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 88
- Figura 4.10.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *T. versicolor* MUM 04.101. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C. .... 89
- Figura 4.11.** Efeito da concentração de NaCl na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 94.04. Coluna 1: Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; Coluna 2: Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm durante 28 dias a 30 °C. .... 93
- Figura 4.12.** Efeito da adição de NaCl na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.100. Coluna 1: Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; Coluna 2: Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm durante 28 dias a 30 °C. .... 94
- Figura 4.13.** Efeito da adição de NaCl na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.101. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm, 30 °C por 28 dias. .... 95
- Figura 4.14.** Efeito da concentração de NaCl na descoloração de RP5 por *P. chrysosporium* MUM 94.15. Coluna 1: Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; Coluna 2: Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm durante 28 dias a 30 °C. .... 96
- Figura 4.15.** Imagens obtidas por MEV para os suportes EPO e EN: (a) corresponde aos suportes sem adesão fúngica e (b) suporte colonizado por *T. versicolor*, após 7 dias de incubação. .... 98

<b>Figura 4.16.</b> Descoloração de RP5 ao longo de cada ciclo fermentativo pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 imobilizada em EPO.....	100
<b>Figura 4.17.</b> Descoloração de RP5 ao longo de cada ciclo fermentativo pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 imobilizada em EN.....	101
<b>Figura 4.18.</b> Formação de biomassa ao longo de cada ciclo fermentativo pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 imobilizada nos suportes sintéticos EPO e EN..	101
<b>Figura 4.19.</b> Descoloração de RP5 pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 em reator contínuo de leito fixo. A: Meio de cultura renovado após 8 h de fermentação; B: Introdução da fonte de alimentação (3º dia); C: 4º dia de fermentação com fonte de alimentação. ....	102
<b>Figura 4.20.</b> Descoloração de RP5 por células livres da estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100. Meio alcalino ajustado a pH 9,5. ....	104
<b>Figura 4.21.</b> Descoloração de RP5 por células livres da estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100. Meio alcalino ajustado a pH 9,5 e concentração de NaCl de 15 g·l <sup>-1</sup> . ....	105
<b>Figura 4.22.</b> Descoloração de RP5 pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 imobilizada em EPO. Meio alcalino ajustado a pH 9,5 e concentração de NaCl de 15 g·l <sup>-1</sup> . ....	106
<b>Figura 4.23.</b> Descoloração de RP5 pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 imobilizada em EN. Meio alcalino ajustado a pH 9,5 e concentração de NaCl de 15 g·l <sup>-1</sup> . ....	107
<b>Figura 4.24.</b> Descoloração de RP5 em reator de bancada de 2 l pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100. <b>A:</b> Reator com MCL inoculado com a estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100; <b>B:</b> Reator após 4 h de fermentação. Condições: pH (8,0-9,5), 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.....	108
<b>Figura 4.25.</b> Descoloração de RP5 pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 em MCL com o pH ajustado a 8,0-9,5. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.109	
<b>Figura 4.26.</b> Descoloração de RP5 pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100 em MCL o pH ajustado a 8,0-9,5 e 15 g·l <sup>-1</sup> de NaCl. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.....	110
<b>Figura 4.27.</b> Membrana de <i>nylon</i> sem carga utilizada para a detecção da expressão gênica da Lcc da estirpe <i>T.versicolor</i> MUM 04.100, com diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos por Northern blot. Sendo (↓) o controle positivo. ....	111
<b>Figura 4.28.</b> Detecção da expressão gênica da Lcc sintetizada pela estirpe <i>T. versicolor</i> MUM 04.100, em diferentes condições por RT-PCR. Colunas (A) MCL sem ajuste de pH; (B) MCL a pH 9,5. Fontes de carbono analisadas - Colunas (1) glicose, (2) sacarose, (3) glicerol.....	112

---

**Figura 4.29.** Expressão da enzima Lcc da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 por RT-PCR, determinada por análise densitométrica. Fontes de carbono analisadas: (1) glicose, (2) sacarose, (3) glicerol, a valores de pH iniciais de 5,45 e 9,5.  
..... 113

---

## ***Lista de tabelas***

<b>Tabela 2.1.</b> Características típicas de efluentes de um processo de tingimento têxtil (Lau e Ismail, 2009).....	11
<b>Tabela 2.2.</b> Classificação e exemplos de alguns corantes, com base na estrutura química (Adaptado de Rodríguez Couto, 2009; Ali, 2010).....	14
<b>Tabela 2.3.</b> Classificação dos corantes de acordo com o método de aplicação (Adaptado de Gupta e Suhas, 2009; Ali, 2010; Sandhya, 2010).....	15
<b>Tabela 2.4.</b> Métodos físico-químicos para a remoção de corantes de efluentes têxteis (Adaptado Rodríguez Couto, 2009; Verma <i>et al.</i> , 2012).....	19
<b>Tabela 2.5.</b> Características dos dois principais grupos de LMEs de Fpb. (Adaptado de: Rodríguez Couto, 2009; Dashtban <i>et al.</i> , 2010; Maciel <i>et al.</i> , 2010).....	26
<b>Tabela 2.6.</b> Aplicações industriais de Lcc de Fpb .....	29
<b>Tabela 2.7.</b> Degradação de corantes sintéticos por Fpb .....	35
<b>Tabela 2.8.</b> Descoloração de corantes sintéticos por Fpb em diferentes reatores.....	43
<b>Tabela 3.1.</b> Características gerais dos corantes utilizados neste estudo .....	49
<b>Tabela 3.2.</b> Fungos selecionados para o estudo .....	50
<b>Tabela 3.3.</b> Condições dos ensaios realizados em reator contínuo de leito fixo .....	59
<b>Tabela 3.4.</b> <i>Primers</i> desenhados de <i>T. versicolor</i> MUM 04.100.....	62
<b>Tabela 3.5.</b> Parâmetros usados para a reação de PCR .....	63
<b>Tabela 3.6.</b> Componentes para síntese de cDNA .....	69
<b>Tabela 3.7.</b> Parâmetros usados para a reação de PCR .....	70
<b>Tabela 4.1.</b> Avaliação do efeito da concentração dos corantes RP5 e PR478 na descoloração por estirpes de Fpb.....	74
<b>Tabela 4.2.</b> Efeito do pH na descoloração dos corantes RP5 e PR478 por estirpes de Fpb .....	76
<b>Tabela 4.3.</b> Descoloração de RP5 e PR478 por 4 estirpes de Fpb em condições extremas de pH e salinidade .....	80
<b>Tabela 4.4.</b> Determinação da atividade enzimática de Fpb imobilizados em EPO e EN .....	99



---

## **Capítulo 1** *Introdução Geral*

---



## 1.1. Considerações gerais

A contaminação de ambientes aquáticos decorrente da emissão de compostos poluentes de diversos segmentos industriais é, atualmente, um grande desafio econômico, social e ambiental.

A água é um recurso natural renovável, mas finito. Leis ambientais que regem a preservação dos recursos hídricos, são cada vez mais restritivas e rígidas e, deste modo, conduzem às indústrias a encontrar alternativas eficientes quanto ao consumo e reutilização deste bem essencial, investindo em tratamentos adequados, que agreguem baixo custo e maior eficiência.

A indústria têxtil destaca-se como uma das indústrias que mais contribuem neste contexto. Visto que elimina, durante o processo de tingimento, elevados volumes de efluentes. Tais efluentes têm como principais características (1) a coloração intensa, decorrente da presença de corantes que não são fixados às fibras durante o processo de tingimento, (2) os elevados valores de pH e (3) de sais. A toxicidade associada aos efluentes industriais pode estar intimamente relacionada com a presença de compostos químicos recalcitrantes, nomeadamente corantes azo.

Devido ao fato destes compostos serem recalcitrantes, métodos físico-químicos e biológicos convencionais são aplicados. Porém, têm custo elevado e/ou geram elevados volumes de lodo ativado ou ainda, convertem o corante em compostos mais tóxicos que o de origem, tornando-se ineficientes.

A micorremediação é referenciada, em diversos segmentos de estudos, para o controle da poluição ambiental em solos e águas contaminadas por compostos xenobióticos e recalcitrantes. Dentre os fungos utilizados para aplicação no tratamento de efluentes contaminados, destacam-se os fungos da podridão branca da madeira (Fpb), que utilizam um complexo de enzimas ligninolíticas extracelulares e inespecíficas, capazes de degradar a lignina e compostos poluentes de estruturas complexas e similares a este polímero. Deste modo, os Fpb apresentam potenciais características para sua aplicação no tratamento destes efluentes.

O fungo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium* é um basidiomiceto ligninolítico, extensivamente estudado como eficiente na degradação da lignina. Muitas reacções bioquímicas e fisiológicas relacionadas com a degradação da lignina foram primeiramente detectadas em culturas de *P. chrysosporium* e, posteriormente, em

culturas de outros microrganismos pertencentes a este filo. Devido a esta capacidade de degradar este polímero fenólico de estrutura altamente complexa e recalcitrante, este microrganismo é muitas vezes integrado nos estudos de descoloração de compostos de estrutura semelhantes, que são responsáveis pela contaminação do meio ambiente. Contudo a investigação de novas estirpes promissoras, assim como a elucidação das enzimas ligninolíticas envolvidas no processo de descoloração, torna-se necessária.

Muito embora, um grande número de trabalhos seja desenvolvido neste segmento, os parâmetros adotados estão, muitas vezes, distantes da realidade das principais características das águas residuais da indústria têxtil que, para além de apresentarem uma coloração intensa, possuem em muitos casos elevados valores de pH e de concentração de sais.

Deste modo, a seleção e identificação de estirpes fúngicas com tal capacidade, assim como estudos aprofundados das enzimas envolvidas no processo degradativo, possibilitarão uma ampliação na aplicação de Fpb em processos de tratamento de efluentes têxteis.

## 1.2. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi identificar estirpes promissoras de fungos da podridão branca da madeira, para o tratamento de águas residuais da indústria têxtil.

A fim de cumprir o objetivo principal, os seguintes estudos desenvolvidos foram:

- Rastreamento e identificação de linhagens fúngicas com capacidade de degradação biológica de corantes *azo* provenientes da indústria têxtil;
- Estudo das condições ambientais (composição do meio, pH, agitação e oxigenação) que permitam às linhagens fúngicas o melhor desempenho na degradação biológica de corantes *azo*;
- Investigação do perfil enzimático envolvido na degradação do corante, com especial ênfase na lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase (Lcc) e glioxidase (GLOX);
- Caracterização da atividade enzimática de modo individual e estudo da sinergia destas enzimas inferindo sobre o papel na degradação;
- Estudo com célula fúngica imobilizada para tratamento de efluentes;
- Estudo em biorreatores;

- Estudo da expressão gênica da LiP, MnP e Lcc, em resposta a diferentes fontes de carbono com variadas concentrações, de modo a otimizar e maximizar as condições para a produção das enzimas responsáveis pela degradação de corantes.

### 1.3. Estrutura da tese

Esta tese foi organizada em 7 capítulos.

O **capítulo 1** apresenta os aspectos gerais nos quais se encontra a motivação para o desenvolvimento deste estudo. Em decorrência desta motivação, foram traçados objetivos que nortearam o desenvolvimento dos ensaios.

A revisão da literatura é apresentada no **capítulo 2**, cujo objetivo foi a introdução dos fundamentos teóricos e o estado da arte dos aspectos mais diretamente relacionados ao tema. Este capítulo inicia-se descrevendo aspectos gerais relacionados à indústria têxtil e seus efluentes, assim como as leis que regem a preservação da água. Posteriormente, aborda as diferentes classes de corantes, dando maior atenção aos corantes azo. São descritos diferentes tratamentos para estes efluentes, destacando-se a potencial utilização de Fpb. Neste contexto, ressalta-se a importância de estudos direcionados ao reconhecimento a nível molecular das enzimas produzidas por estes microrganismos (ênfase à lacase) devido a grande potencialidade na utilização desta enzima, não só neste setor, como em outros segmentos industriais. Por fim, são apresentados: métodos de seleção de estirpes promissoras, tipos de cultivo e ampliação de escala em biorreatores.

O **capítulo 3** descreve os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho. Este capítulo divide-se em duas partes, onde inicialmente estão descritos os procedimentos efetuados para a seleção e otimização do meio de cultivo para a degradação do corante e, posteriormente, os estudos moleculares destinados ao reconhecimento da expressão gênica das enzimas envolvidas na degradação do corante em diferentes fontes de carbono.

O **capítulo 4** apresenta a análise do conjunto dos resultados obtidos nas várias etapas do trabalho e, na sequência, os resultados são discutidos no **capítulo 5**.

O **capítulo 6** resume as principais conclusões obtidas no trabalho, e também apresenta perspectivas e sugestões para trabalhos futuros.

O **capítulo 7** contém as referências bibliográficas que serviram de apoio para o desenvolvimento deste estudo.

---

## **Capítulo 2** *Revisão da Literatura*

---



## 2.1. Indústria e efluentes têxteis

### 2.1.1. Setor têxtil em Portugal

A indústria têxtil e de vestuário nacional, permitiu a Portugal manter-se em uma posição relevante no *ranking* de exportadores da União Europeia (UE). Desde 2000, Portugal foi classificado entre os dez maiores exportadores de têxteis na UE, correspondendo a 4,3 % das exportações totais e 18,5 % das exportações nacionais. Em Portugal, a indústria têxtil está concentrada em três regiões: Norte, Centro e Lisboa. As maiores fábricas deste setor industrial estão concentradas por todos os Distritos do Porto e de Braga (Lucas, 2009).

Durante as diferentes etapas de tingimento, ocorre um grande consumo de água e são também produzidos, grandes volumes de efluentes de composição variada (Hessel *et al.*, 2007). Considerando tanto o volume como a composição dos efluentes gerados, a indústria têxtil é classificada como a mais poluente entre os setores industriais (Gomes *et al.*, 2005; Kumari e Abraham, 2007; Andleeb *et al.*, 2010). Os efluentes da indústria têxtil, que contenham corantes são altamente coloridos e, são portanto, visualmente identificáveis (Ali, 2010). Para além das questões estéticas, segundo uma pesquisa realizada pela *Ecological and Toxicological Association of the dyestuff* (ETDA) dentre mais de 90 % de 4000 corantes testados, os valores de Dose Letal 50 (DL50) obtidos, foram superiores a  $2.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de peso corporal (Ayed *et al.*, 2009).

Após a inserção da Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro, que entrou em vigor em 22 de Dezembro de 2000 (Diretiva Quadro da Água-DQA), uma política cada vez mais restritiva com relação a preservação da qualidade da água foi imposta (Implementação da directiva quadro da água 2000-2005). Inserida neste âmbito, a indústria do segmento têxtil vem recebendo cada vez mais pressões para se adequar a este contexto.

A legislação ambiental na UE evoluiu nas últimas três décadas. A adoção em toda UE da Diretiva 96/61/CE de 24 de setembro de 1996, relativa à prevenção e controle integrado da poluição (*Integrated Prevention Pollution Control* - PCIP ou IPPC) por meio de licenças ambientais, integrou uma abordagem quanto ao desempenho das instalações têxteis. Estas licenças foram baseadas no princípio da utilização de Melhores Técnicas Disponíveis (MTD) e documentos de referência para a indústria têxtil (BREF). As instalações abrangidas no Anexo I desta Diretiva Europeia, são obrigadas a obter

uma autorização concedida pelas autoridades dos Estados-Membros da UE. As atividades relacionadas com a indústria têxtil foram igualmente nesta Diretiva reunidas e inclui a obrigatoriedade de instalações de pré-tratamento (operações de lavagem, branqueamento, mercerização) ou ao tingimento de fibras ou têxteis cuja capacidade de tratamento excedesse 10 toneladas por dia. O Decreto-Lei n.º 194/2000, de 21 de Agosto, também conhecido como diploma PCIP, transpôs para o direito interno a Diretiva IPPC. Neste D.L. a categoria 6.2 do seu Anexo I sofreu entretanto algumas alterações (Cattoor, 2007).

O estabelecimento de normas de descarga de efluentes, especificamente aplicáveis às unidades industriais do setor têxtil, excluindo o subsector dos lanifícios é regulado pela Portaria Setorial n.º 423/97 de 25 de junho e pelo Anexo XVIII do D.L. n.º 236/98 de 01 de Agosto.

### **2.1.2. Efluentes têxteis**

A água é um bem raro e precioso, porém apenas uma ínfima parte das reservas ainda existentes (cerca de 0,03 %) se encontram disponíveis para o consumo humano. O crescimento da população mundial e da indústria resultam num consumo cada vez maior deste recurso natural, muito embora a oferta disponível permaneça constante (Prigione *et al.*, 2008).

As indústrias dos setores têxtil, papel, cosméticos, farmacêuticas e de alimentos têm contribuído substancialmente para a elevação da poluição ambiental, uma vez que corantes e outros compostos químicos são descartados como efluentes, sem prévio tratamento em rios e outras fontes naturais de água (Nozaki *et al.*, 2008; Aravind *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011). Porém, a crescente aplicação de legislações restritivas e rígidas combinadas com o aumento da consciência do impacto ambiental e da elevação do custo da água, obrigam cada vez mais as indústrias a investirem em tratamentos e também no reuso dos efluentes (Maier *et al.*, 2004; Vanhulle *et al.*, 2008).

A principal característica deste tipo de efluente é a sua intensa coloração, decorrente da presença de corantes em sua composição. A produção total de corantes no mundo é estimada em 800.000 toneladas por ano e geralmente 20 % dos corantes utilizados entram no meio ambiente na forma de resíduos (Ciullini *et al.*, 2012). Mesmo em pequenas quantidades ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) certos corantes são visualmente detectáveis (Zonoozi *et al.*, 2008).

Conforme apresentado na Tabela 2.1, os efluentes têxteis também são caracterizados por flutuações extremas em muitos parâmetros, tais como: demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), pH e salinidade. Além disso, possuem em sua composição agentes quelantes, surfactantes, sólidos suspensos (SS) entre outros componentes (Gao *et al.*, 2007; Dubé *et al.*, 2008; Kaushik e Malik, 2009; Faraco *et al.*, 2009a; Verma *et al.*, 2010; Yesilada *et al.*, 2010; Phugare *et al.*, 2011).

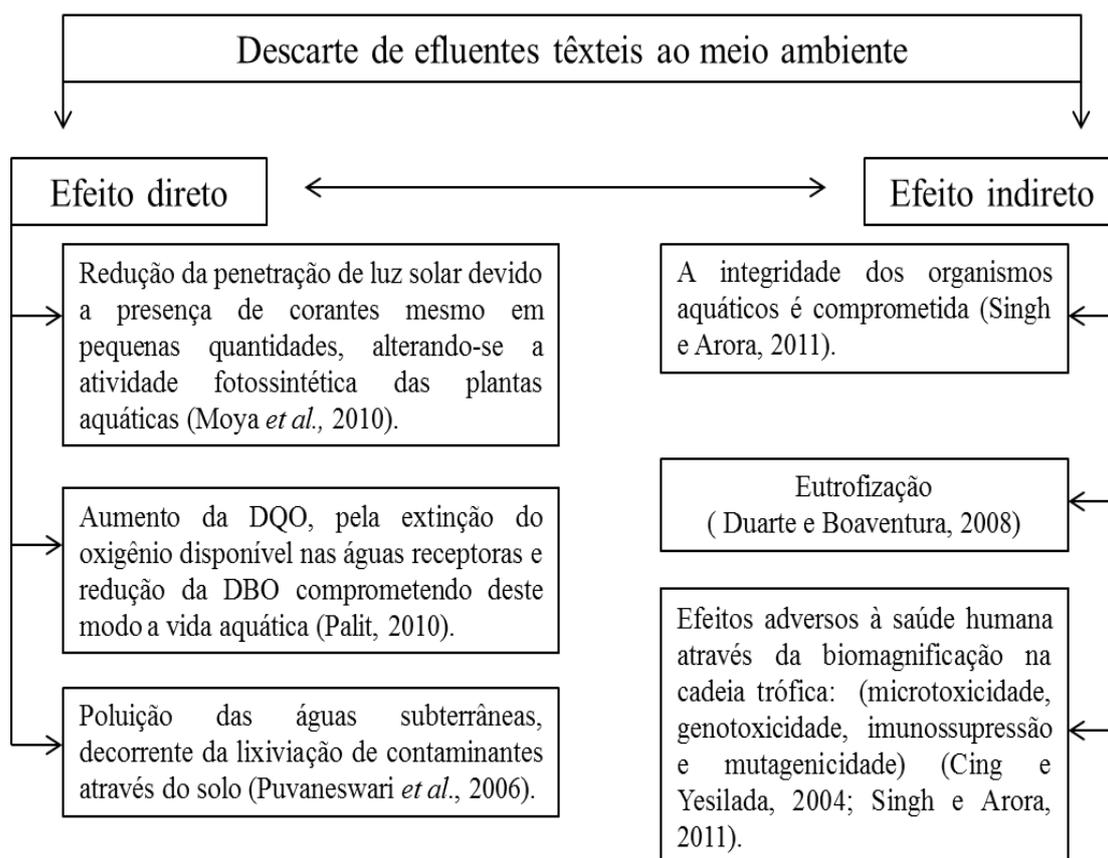
**Tabela 2.1.** Características típicas de efluentes de um processo de tingimento têxtil (Lau e Ismail, 2009).

Aspectos/Componentes	Valor
pH	2,0-10,0
Temperatura, °C	30-80
DQO, mg·l <sup>-1</sup>	50-5000
DBO, mg·l <sup>-1</sup>	200-300
SS (totais), mg·l <sup>-1</sup>	50-500
Nitrogênio orgânico, mg·l <sup>-1</sup>	18-39
Fósforo total, mg·l <sup>-1</sup>	0,3-15
Crômio total, mg·l <sup>-1</sup>	0,2-0,5
Cor, mg·l <sup>-1</sup>	> 300

Como referido na Tabela 2.1, para cada um dos parâmetros envolvidos, uma gama de valores é descrita, confirmando a grande variabilidade na composição dos efluentes gerados durante o processo de tingimento. Existem muitas classes de corantes utilizadas para o processo de tingimento e posteriormente serão descritas na Seção 2.2.1.

Dentre os corantes atualmente utilizados, os corantes reativos são os mais difundidos. De um modo geral, os corantes reativos em comparação com outras classes de corantes, apresentam uma fixação à fibra muito baixa, onde cerca de 5-50 % permanece no efluente (Lau e Ismail, 2009).

O descarte destes efluentes para o ecossistema aquático, sem tratamento prévio, não se limita a um problema estético. Estes efluentes geram efeitos nocivos de forma direta ou indireta (Figura 2.1) ao meio ambiente e conseqüentemente ao Homem (Verma *et al.*, 2012).



**Figura 2.1.** Representação esquemática dos efeitos diretos e indiretos gerados por efluentes têxteis ao ecossistema (Adaptado Verma *et al.*, 2012).

## 2.2. Corantes

A utilização de corantes pela humanidade tem ocorrido desde há milhares de anos. Acredita-se que o Homem de Neandertal foi o primeiro utilizador de corantes naturais, porém a primeira utilização reconhecida ocorreu a cerca de 4000 anos, quando o corante índigo azul foi encontrado nos invólucros de múmias em túmulos egípcios. Até a metade do século XIX, os corantes eram de origem natural, oriundos de plantas, insetos e moluscos; porém, a produção era em pequena escala (Gupta e Suhas, 2009). A grande ampliação na escala de produção de corantes ocorreu quando em 1856 o químico William H. Perkin produziu o primeiro corante orgânico sintético denominado malva.

Atualmente, mais de 10.000 diferentes corantes e pigmentos são utilizados em diversos segmentos industriais em todo o mundo. A produção total mundial de corantes é estimada em 800.000 toneladas por ano e pelo menos 10-15 % são descartados no meio ambiente como resíduos (Asgher *et al.*, 2009).

### 2.2.1. Classificação dos corantes

O sistema de classificação internacional dos corantes é o *Colour Index* (C.I.). Este sistema foi elaborado pela *Society of Dyers and Colourists* tendo sido publicado pela primeira vez em 1924. Nesta classificação, os corantes recebem um nome genérico determinado pela tecnologia de aplicação, seguido pelo número C.I. baseado em sua estrutura química (Hardin, 2007). A classificação dos corantes também pode ser de efetuada de acordo a estrutura química ou pela tecnologia de aplicação.

#### 2.2.1.1. De acordo com a estrutura química

Todas as moléculas absorvem energia eletromagnética, mas somente aquelas que absorvem luz com comprimento de onda na faixa visível (350-700 nm) são coloridas. A molécula de um corante pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo que é responsável pela cor e a estrutura responsável pela fixação à fibra denominada auxocromo. Os grupos cromóforos mais comuns são: azo (-N=N-), metino (-CH=), carbonil (-C=O), -nitro (-NO<sub>2</sub>) e anéis quinóides enquanto que os auxocromos são: amino (-NH<sub>3</sub>), carboxil (-COOH), sulfonato (-SO<sub>3</sub>H) e hidroxil (-OH) (Kunz *et al.*, 2002; Sandhya, 2010). Com base na estrutura química ou grupo cromóforo, 20-30 diferentes classes de corantes podem ser identificados. A Tabela 2.2 sumariza as classes mais comuns utilizando-se este critério de classificação. A Tabela 2.3, apresenta a classificação dos corantes de acordo com o método de aplicação.

Em acréscimo, deve-se ainda destacar que a utilização de corantes naturais em processamento têxtil é limitada. Estes corantes são geralmente utilizados em alimentos, algodão, lã, seda, poliéster, poliamida e poliácrlonitrilo.

**Tabela 2.2.** Classificação e exemplos de alguns corantes, com base na estrutura química (Adaptado de Rodríguez Couto, 2009; Ali, 2010).

Classe	Cromóforo	Exemplo
Azo	$\text{—N=N—}$	<p>Reativo Preto 5</p>
Antraquinona		<p>Poli R-478</p>
Ftaleína		<p>Fenolftaleína</p>
Índigo		<p>Índigo Carmim</p>
Nitro	$\text{—N=O}$	<p>Amarelo Ácido 24</p>
Nitroso	$\text{—N=O}$	<p>Verde Rápido</p>
Trifenilmetilênico		<p>Verde Malaquita</p>

**Tabela 2.3.** Classificação dos corantes de acordo com o método de aplicação (Adaptado de Gupta e Suhas, 2009; Ali, 2010; Sandhya, 2010).

Corantes	Principais características	Substrato	Cromóforo
<b>Ácidos</b>	São geralmente solúveis em água. A fixação às fibras é atribuída em parte à ligação entre grupos aniônicos dos corantes e grupos catiônicos das fibras.	“Nylon”, seda, lã, acrílicos modificados, mas também em certas condições em papel, tinta de impressão a jato, couro, alimentos e produtos cosméticos.	Azo (incluindo os pré-metalizados), azina, xanteno, antraquinona, nitro e nitroso, trifenilmetilênico.
<b>Básicos</b>	São altamente solúveis em solventes polares, tais como álcoois, glicóis e água. São compostos catiônicos utilizados para o tingimento de fibras que contém grupos ácidos.	Fibras sintéticas, papel e “nylon” modificado.	Triarilmetano e antraquinona, azo e diarilmetano.
<b>Diretos</b>	São solúveis em água. Apresentam maior resistência a luz em comparação aos reativos. O tingimento é normalmente efetuado em um banho de corante neutro ou ligeiramente alcalino	Celulose, viscose, algodão, ouro, papel, “nylon” e “rayon”.	Azo, ftalocianina e oxazina.
<b>Dispersos</b>	São insolúveis em água, sendo aplicados através de suspensão coloidal ou dispersão aquosa.	“Nylon”, poliéster, acetato.	Azo, nitro, antraquinona.
<b>Enxofre</b>	São insolúveis em água. Antes da aplicação necessitam de serem reduzidos a uma forma solúvel, passando a ter afinidade com as fibras. São resistentes à luz e à lavagem.	Algodão e “rayon”. Limitações no uso com fibras de poliamida, seda, couro, papel e madeira.	Azo
<b>Mordentes</b>	A capacidade de um corante em se ligar a um tecido pode ser melhorada utilizando-se um agente de fixação, denominado corante mordente. Os corantes mordentes são usados em uma combinação com sais de íons metálicos.	Lã, couro, seda e fibras de celulose modificadas.	Azo, oxazina e triarilmetano.
<b>Pigmentos</b>	São compostos insolúveis, não-iônicos ou são sais insolúveis que retêm a sua estrutura cristalina ou partículas ao longo da sua aplicação.	Tintas, plásticos e têxteis.	Ftalocianina de complexos metálicos e azo.
<b>Reativos</b>	São solúveis em água. Possuem grupos reativos capazes de formar uma ligação covalente entre um átomo de carbono da molécula do corante com os grupos -OH, -NH ou -SH das fibras.	“Nylon”, algodão, seda e lã.	Azo (incluindo os pré-metalizados), antraquinona, ftalocianina.
<b>Solventes</b>	São insolúveis em água. Não possuem polaridade ou são pouco polares. Estes corantes dissolvem o substrato ao qual se ligam.	Plástico, óleos, tintas, cêra gasolina e lubrificantes.	Azo, antraquinona, ftalocianina e triarilmetano.
<b>À Tina ou À Cuba</b>	São praticamente insolúveis em água sendo incapazes de serem aplicados as fibras diretamente. Na forma leuco do corante, produzido pela redução no licor alcalino (sal de metal alcalino), torna-se solúvel em água e atuando como agente de fixação para melhorar a solidez da cor.	Linho, algodão e “rayon”, viscose, lã e fibras de celulose.	Índigo e antraquinona.

### 2.2.2. Corantes azo

Os corantes têxteis são projetados para serem resistentes à perda de coloração por exposição a luz, à água e produtos químicos. São geralmente considerados ambientalmente como compostos xenobióticos e recalcitrantes (Pajot *et al.*, 2011).

Os corantes azo constituem a maior e mais versátil classe de corantes. Cerca de 60 a 70 % dos corantes sintéticos produzidos anualmente corresponde a esta classe de corantes. Mais de 2.000 diferentes corantes azo são utilizados em diferentes segmentos industriais como o têxtil, alimentício, farmacêutico, impressão e cosmético (Lu *et al.*, 2008; Diwaniyan *et al.*, 2010), sendo a maior quantidade desses corantes utilizadas no setor têxtil (Amoozegar *et al.*, 2011). Como anteriormente apresentado na Tabela 2.2, esta classe de corantes caracteriza-se por possuir uma estrutura química composta com pelo menos um grupo cromóforo (-N=N-) ligado a um sistema aromático (Dawkar *et al.*, 2009).

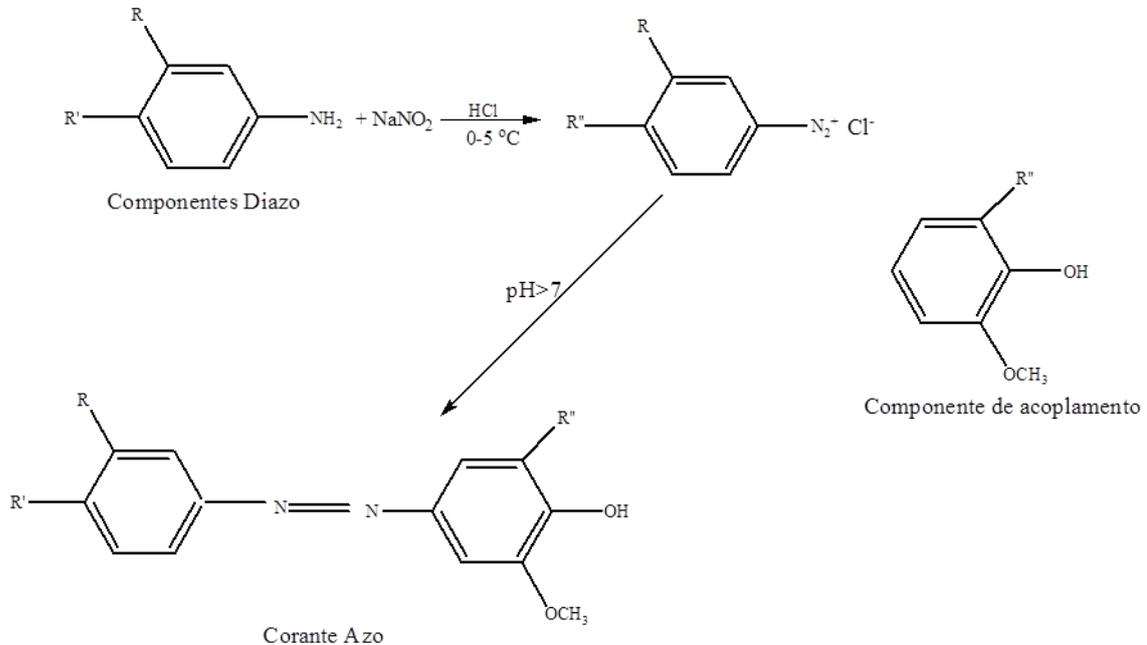
A síntese de corantes azo tanto pode ocorrer em condições ácidas ou alcalinas, dependendo do componente de acoplamento. Martins *et al.* (2001) sintetizaram 8 diferentes corantes azo com grupos bioacessíveis e avaliaram a capacidade da estirpe *Phanerochaete chrysosporium* MUM 95.01 (ATCC 24725) em degradar estes compostos (Figura 2.1).

Devido à estabilidade e natureza xenobiótica destes compostos os processos de tratamento de águas residuais convencionais que contém esta classe de corantes muitas vezes não são eficientes (Pajot *et al.*, 2007). Os tratamentos utilizados estão divididos em físico, químico ou biológicos, e estão descritos na Seção 2.3. A destruição de corantes azo pode ser realizada por via oxidativa ou redutiva, sendo que por redução incompleta podem ser geradas aminas aromáticas.

Os efluentes que contém corantes azo afetam negativamente os recursos hídricos, a fertilidade dos solos, os organismos aquáticos e a integridade do ecossistema. A toxicidade destes compostos (efeito letal, genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade) em organismos aquáticos (peixes, algas, bactérias, entre outros) e animais é descrita em alguns estudos (Puvaneswari *et al.*, 2006; Husain, 2010).

Segundo Novotný *et al.* (2006) a toxicidade aguda dos corantes azo, medida pelos critérios da UE para a classificação de substâncias perigosas é relativamente baixa, apresentando valores de LD50 entre 200 a 250 mg·kg<sup>-1</sup>. Porém, quando corantes pertencentes a esta classe não são completamente mineralizados, podem formar aminas

aromáticas, que são tóxicas e potencialmente carcinogênicas, devido à possível formação de metabólitos tóxicos após a hidroxilação ou oxidação com o citocromo P450 no interior das células de mamíferos (Mishra *et al.*, 2011), representando deste modo, para além de um problema ambiental uma questão de saúde pública (Rao *et al.*, 2010).



**Figura 2.2.** Representação esquemática da síntese de corantes azo bioacessíveis (Martins *et al.*, 2001).

A UE, por meio da Diretiva 2002/61/EC, transposta para a ordem jurídica interna pelo Decreto-Lei nº 208/2003, de 15 de setembro, e reformulada pela Diretiva 2004/21/CE, de 24 de fevereiro, limita a colocação no mercado e a utilização de algumas substâncias e preparações perigosas (corantes azo).

De acordo com a Diretiva 2004/21/CE, os corantes azo que, por clivagem redutora de um ou mais grupos azo, possam libertar uma ou mais das aminas aromáticas enunciadas nesta Diretiva, em concentrações superiores a 30 ppm nos artefatos acabados ou em quaisquer partes tingidas dos mesmos, não podem ser utilizados em artigos têxteis e de couro susceptíveis de entrarem em contato direto e prolongado com a pele humana ou a cavidade oral.

A agência internacional para pesquisa sobre câncer inclui apenas corantes baseados em benzidina em seu grupo 2A (provavelmente cancerígeno para humanos) e 8 no grupo 2B (possivelmente cancerígeno para os seres humanos) dos quais alguns são corantes azo (C.I. Ácido Vermelho 26, C.I. Solvente Amarelo 1 e C.I. Solvente

Amarelo 2). No sentido de dar uma resposta à essa restrição, uma lista de corantes azo que após redução do grupo azo formam aminas aromáticas, foi elaborada pela associação ecológica das indústrias transformadoras de corantes. Esta lista inclui mais de 500 corantes azo dos quais, pelo menos, 142 estão ainda disponíveis no mercado mundial. Os corantes azo Reativo Preto 5 e Reativo Violeta 33, são conhecidos por serem sensibilizantes, mas apenas na forma reativa (Singh e Arora, 2011).

### 2.3. Métodos de remoção de corantes de efluentes têxteis

A literatura disponível mostra um grande número de métodos convencionais (físicos, químicos, físico-químicos e biológicos) bem estabelecidos para a remoção de corantes de efluentes têxteis. Inserido neste contexto, o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o tratamento destes poluentes são também referenciados, destacando-se os processos oxidativos avançados (POAs) (Lucas e Peres, 2008; Guendy, 2009; El-Desoky *et al.*, 2010).

Os POAs têm sido descritos como uma alternativa para a remoção de poluentes persistentes e de efluentes com elevada carga orgânica, quando os tratamentos convencionais não alcançam a eficiência necessária. Esta tecnologia baseia-se em processos físico-químicos capazes de produzir alterações profundas na estrutura química dos poluentes (Amorim *et al.*, 2009). Entretanto, não existe um único método econômico e tecnicamente viável para eliminar estes poluentes (Arica e Bayramoglu, 2007; Sadhasivam *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2010).

Geralmente dois ou três métodos têm de ser combinados a fim de atingir um nível adequado de remoção da cor. De acordo com a Tabela 2.4, são apresentados alguns métodos de tratamento para este tipo de efluente com suas vantagens e desvantagens.

Os tratamentos biológicos convencionais são amplamente utilizados, pois reúnem baixo custo e fácil operação. São geralmente eficientes quanto a remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos, contudo não são eficientes na redução de cor.

Os métodos biológicos não convencionais têm sido considerados uma alternativa viável para os métodos convencionais, sendo considerada mais barata e ambientalmente mais “amigável” para a remoção da cor de efluentes têxteis. Estes métodos apresentam potencialidade para mineralizar corantes, convertendo-os em compostos inorgânicos, como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Husain, 2010).

Muitos estudos demonstram a parcial ou completa biodegradação de corantes por microrganismos. Culturas puras de bactérias (Ren *et al.*, 2006; Barragán *et al.*, 2007; Kolekar *et al.*, 2008; Kalyani *et al.*, 2009; Telke *et al.*, 2009; Amoozegar *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2011), fungos (Yang *et al.*, 2005; Khelifi *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2011; Martorell *et al.*, 2012) e mistas (Yang *et al.*, 2009a; Novotný *et al.*, 2011), têm sido referenciadas como promissoras em degradar corantes considerados anteriormente não degradáveis. Estes microrganismos são fáceis de manipular, têm velocidade de crescimento rápida e alta capacidade de adaptação (Barreto *et al.*, 2011).

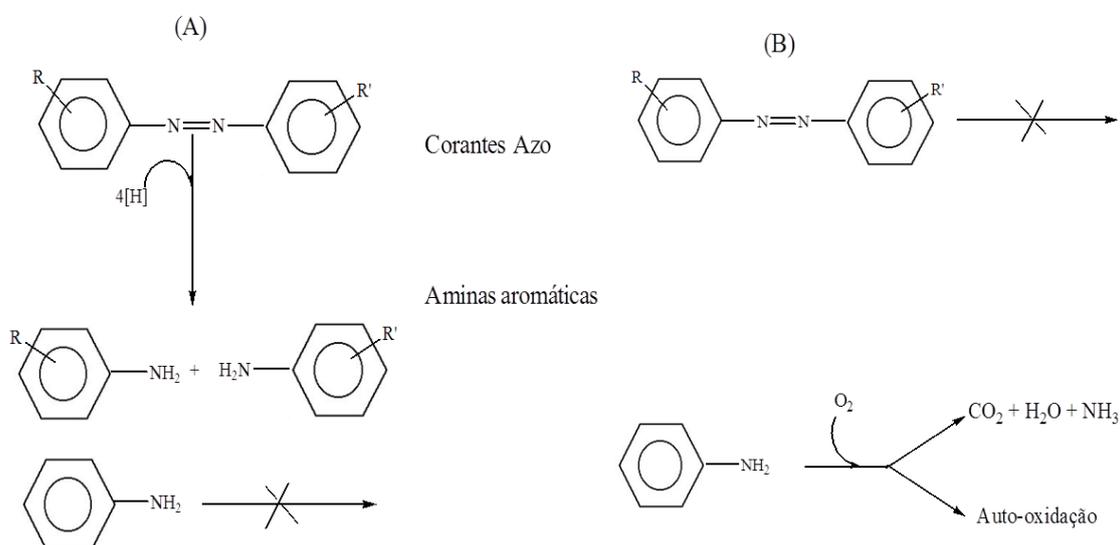
**Tabela 2.4.** Métodos físico-químicos para a remoção de corantes de efluentes têxteis (Adaptado Rodríguez Couto, 2009; Verma *et al.*, 2012).

Método	Descrição do método	Vantagens:	Desvantagens:	Referência:
<b>Adsorção</b>	Corante é removido por adsorção a um suporte sólido. Exemplo: turfa, zeólito, carvão ativado; lascas de madeira, sílica gel.	Descoloração efetiva de corantes solúveis e insolúveis.	Custo elevado.	Gozálvez-Zafrilla <i>et al.</i> , 2008.
<b>Coagulação/ Floculação</b>	Adição de coagulantes e floculantes.	Economicamente viável, a remoção de cor é excelente.	Produção de lama.	Sánchez-Martín <i>et al.</i> , 2010; Khouni <i>et al.</i> , 2011.
<b>Destruição eletroquímica</b>	Reação de oxidação utilizando eletricidade.	Após a degradação os compostos não são perigosos.	Auto custo de energia.	Bandara <i>et al.</i> , 2007.
<b>Eletrocoagulação</b>	Tratamento com base em ânodo e cátodo. A adição de FeSO <sub>4</sub> e FeCl <sub>3</sub> .	Boa remoção de corante.	Elevada produção de lama. Alto custo.	Merzouk <i>et al.</i> , 2010; Merzouk <i>et al.</i> , 2011.
<b>Irradiação</b>	Radição ionizante.	Oxidação eficaz em escala de laboratório	Não é efetivo para todos os corantes.	Hai <i>et al.</i> , 2007.
<b>Membrana de Filtração</b>	Separação física. Exemplo: Nanofiltração; Osmose reversa.	Remove todos os tipos de corantes.	Produção de lama.	Paździor <i>et al.</i> , 2009; Huang <i>et al.</i> , 2011.
<b>Oxidação NaOCl</b>	Reacção utilizando Cl <sup>+</sup> para atacar o grupo amino.	Iniciação e aceleração da clivagem da ligação azo.	Aminas aromáticas são liberadas.	Ho <i>et al.</i> , 2010.
<b>Oxidação Fotoquímica</b>	Oxidação utilizando-se principalmente H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -UV.	Não há produção de lama.	Formação de subprodutos.	Hai <i>et al.</i> , 2007.
<b>Ozonização</b>	Reação de oxidação utilizando-se ozônio.	Aplicação em estado gasoso sem alteração de volume.	Tempo de meia-vida curto (20 min). Auto custo.	Turhan e Turgut, 2009; Palit, 2010.
<b>Reagente Fenton</b>	Reação de oxidação utilizando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Fe (II).	Descoloração efetiva de corantes solúveis e insolúveis em água.	Produção de lama.	Sun <i>et al.</i> , 2009; Kusvuran <i>et al.</i> , 2010.
<b>Troca iônica</b>	Leito de resina de troca iônica.	Regeneração: sem perda de adsorvente.	Não é efetivo para todos os corantes. Elevado custo dos solventes orgânicos.	Liu <i>et al.</i> , 2007.

Os métodos biológicos não convencionais podem ser classificados, segundo a presença do oxigênio no processo, em aeróbicos ou anaeróbicos e apresentam grande

potencial, pois não têm custo elevado de operação (Barreto *et al.*, 2011). De um modo geral, o processo de biodegradação por bactérias de corantes azo ocorre em dois estágios. O primeiro estágio envolve a clivagem reductiva das ligações azo (N=N) dos corantes, resultando na formação de compostos geralmente isentos de cor, porém ainda potencialmente perigosos, que são as aminas aromáticas. Num segundo estágio ocorre a degradação dessas aminas aromáticas. Usualmente a degradação de corantes azo acontece em condições anaeróbias, enquanto a biodegradação de aminas aromáticas por bactérias é quase que exclusivamente um processo aeróbio, cujo modelo de degradação é apresentado na Figura 2.3.

Os fungos são organismos adequados para tratamentos de efluentes e têm sido extensivamente pesquisados. O micélio fúngico, devido à solubilização dos substratos insolúveis através da produção de enzimas extracelulares, tem uma vantagem adicional em comparação aos organismos unicelulares. Devido ao aumento da relação célula a superfície, ocorre um maior contato físico e enzimático com o meio ambiente (Kaushik e Malik, 2009). Dentre os fungos comumente avaliados, existem alguns relatos com actinomicetos e deuteromicetos, porém a maioria dos estudos estão concentrados nos basidiomicetos, pertencentes ao grupo dos fungos da podridão branca da madeira (Fpb).



**Figura 2.3.** Representação esquemática da degradação de corantes azo: (A) Aeróbio e (B) Anaeróbio (vanderZee e Villaverde, 2005; Gonçalves *et al.*, 2008).

## 2.4. Fungos da podridão branca da madeira (Fpb)

A biodegradação de materiais lignocelulósicos como a madeira, é um processo natural de reciclagem de matéria orgânica (Arantes e Milagres, 2009). Os materiais lignocelulósicos, são constituídos principalmente pela mistura de celulose ( $\approx 40\%$ ), hemicelulose (de 20 a 30%) e lignina (de 20 a 30%). A lignina (Figura 2.4) é um biopolímero heterogêneo complexo constituído por unidades fenilpropanóides, sendo considerada um dos constituintes da parede celular de mais difícil degradação (Fialho *et al.*, 2010).

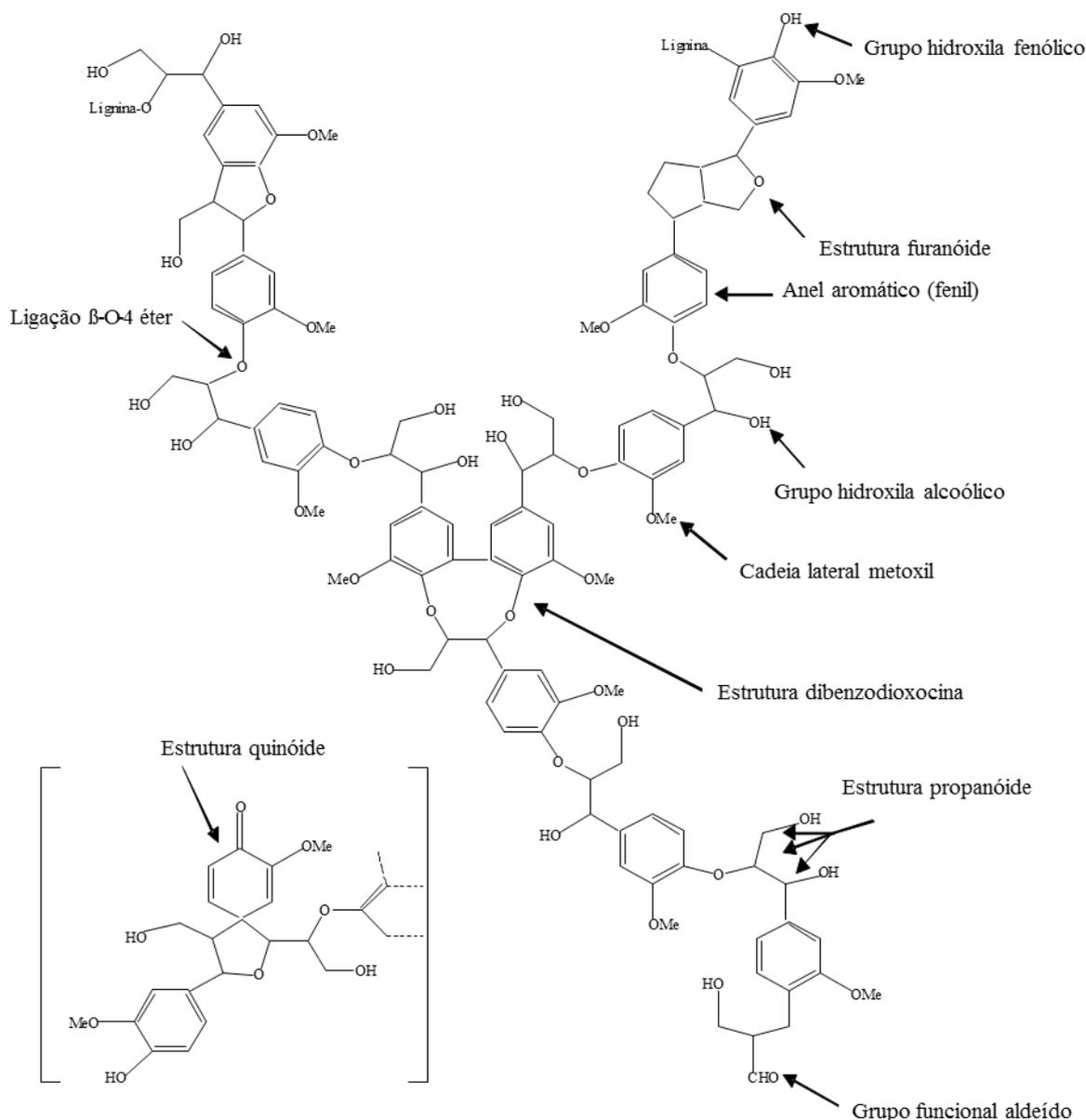
A lignina é resistente ao ataque da maioria dos microrganismos. Na natureza apenas os fungos basidiomicetos são capazes de degradar a lignina de forma eficiente (Wong, 2009). Estes microrganismos (cerca de 30 mil espécies) são descritos como fungos superiores com micélios multicelulares (Kulikova *et al.*, 2011). Dentre os basidiomicetos, os Fpb são os únicos microrganismos conhecidos por mineralizar completamente a lignina em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Gómez-Toribio *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009) através de um sistema enzimático extracelular inespecífico. Este sistema enzimático é constituído por enzimas referidas como modificadoras da lignina (LMEs).

As LMEs também são capazes de catalisar a transformação ou mineralização de uma ampla gama de poluentes que possuem uma semelhança estrutural à lignina (Cabana *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010a).

Devido a baixa especificidade das LMEs muitos Fpb como por exemplo, *Antracophyllum discolor* (Rubilar *et al.*, 2011), *Bjerkandera* sp. (Gomi *et al.*, 2011), *Dichomitus squalens* (Eichlerová *et al.*, 2006a), *Ganoderma* sp. (Murugesan *et al.*, 2007; Murugesan *et al.*, 2009; Zilly *et al.*, 2011), *Irpex lacteus* (Tavčar *et al.*, 2006), *Phanerochaete chrysosporium* (Mohammadi e Nasernejad, 2009; Diwaniyan *et al.*, 2010) *Pleurotus ostreatus* (Sen *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012), *Polyporus rubidus* (Dayaram e Dasgupta, 2008), *Trametes* sp. (Blánquez *et al.*, 2007; Minussi *et al.*, 2007a; Saritha *et al.*, 2011), têm sido exaustivamente estudados e referenciados como capazes em degradar diversos compostos recalcitrantes e xenobióticos tais como, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs), corantes têxteis entre outros.

A utilização de Fpb e suas enzimas ligninolíticas no tratamento de efluentes da indústria têxtil apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de descoloração microbiano, obtendo-se a total remoção da cor, em alguns casos em

poucas horas (Ramya *et al.*, 2007). Dentre os Fpb referenciados, destacam-se *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* (Levin *et al.*, 2010).



**Figura 2.4.** Estrutura de um segmento polimérico da lignina (Brunow, 2001).

### 2.4.1. *Phanerochaete chrysosporium*

*Phanerochaete chrysosporium* é um fungo ligninolítico, saprófito, causador da podridão branca na madeira. Este microrganismo foi o primeiro Fpb a ter a sequência total do genoma descrita (Martinez *et al.*, 2004) e também a apresentar capacidade em degradar corantes sintéticos (Lucas *et al.*, 2008). É considerado um microrganismo modelo de estudo, devido à sua capacidade em degradar lignina e também outros

compostos xenobióticos pela ação das enzimas extracelulares manganês-peroxidase e lignina-peroxidase (Lacina *et al.*, 2003; Vigneshwaran *et al.*, 2006; Pakshirajan e Kheria, 2012). Existem relatos de que este microrganismo produz lacase, contudo investigações recentes têm demonstrado que o genoma de *P. chryso sporium* não codifica qualquer lacase convencional (Bohlin *et al.*, 2008).

#### **2.4.2. *Trametes versicolor***

Segundo Nyanhongo *et al.* (2007) o gênero *Trametes* é possivelmente o mais ativamente investigado no filo dos basidiomicetos. O Fpb *Trametes* (sin. *Coriolus*, *Polyporus*) *versicolor*, tal como o nome indica, apresenta diversas cores, cresce em diversos climas e é encontrado por todo o mundo. É utilizado na Ásia como alimentos e para fins medicinais (Standish *et al.*, 2008). Este fungo produz as enzimas ligninolíticas lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e é reconhecido como sendo um dos maiores produtores da enzima lacase (Levin *et al.*, 2010; Stoilova *et al.*, 2010) cuja potencial aplicação tem sido investigada em diversos segmentos industriais e será descrita na Seção 2.5.3.

### **2.5. Enzimas modificadoras de lignina (LMEs)**

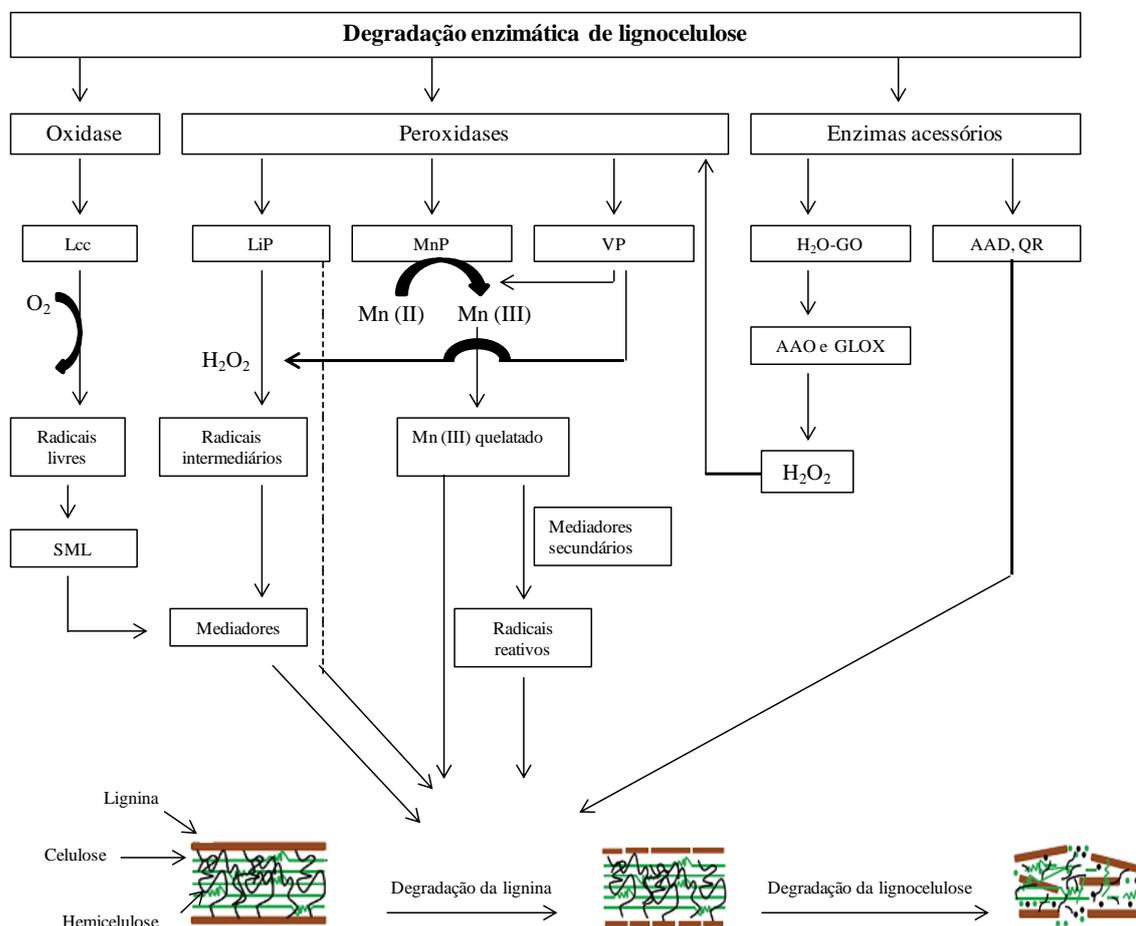
A capacidade dos Fpb em degradar a lignina e outros compostos recalcitrantes e xenobióticos depende da ação das enzimas extracelulares produzidas pelo sistema ligninolítico destes microrganismos (Figura 2.5).

De forma geral, é possível classificar as enzimas envolvidas na degradação de lignina em pelo menos duas classes distintas, fenoloxidasas e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

As fenoloxidasas compreendem um grupo característico de enzimas por pertencerem às metaloproteínas. Entre as fenoloxidasas, ainda se podem descrever dois subgrupos, um que contém as enzimas dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxidase): lignina-peroxidase (LiP - EC 1.11.1.14), manganês-peroxidase (MnP - EC 1.11.1.13), versátil-peroxidase (VP - EC 1.11.1.16); e o outro subgrupo (oxidase), lacase (Lcc - EC 1.10.3.2), que são cuproproteínas independentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para atuarem (Aguiar e Ferraz, 2011).

O processo é ainda reforçado pela ação cooperativa de diversas enzimas acessórias, podendo-se incluir: glioxal-oxidase (GLOX - EC 1.2.3.5), aril álcool oxidase (AAO - EC 1.1.3.7), piranose 2-oxidase (glicose 1-oxidase; EC 1.1.3.4), celobiose/quinona

oxidoreductase (EC 1.1.5.1), celobiose-desidrogenase (EC 1.1.99.18) entre outras (Tabela 2.5) (Rodríguez Couto, 2009; de Oliveira *et al.*, 2009; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009; Wong, 2009; Anastasi *et al.*, 2010).

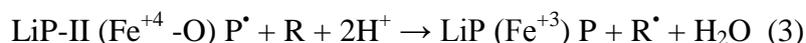


**Figura 2.5.** Diagrama esquemático da degradação da lignina pelo sistema enzimático de Fpb. Lcc: lacase; SML: sistema mediador de lacase; LiP: lignina-peroxidase; MnP: manganês-peroxidase; VP: versátil-peroxidase; H<sub>2</sub>O-GO: geração de oxidases; AAD; aril álcool desidrogenases; QR: quinona redutases (Adaptado de Dashtban *et al.*, 2010).

### 2.5.1. Lignina Peroxidase (LiP)

A enzima LiP foi descrita pela primeira vez por Tien e Kirk (1984), em culturas do Fpb *P. chrysosporium*. Desde então, a LiP e suas várias isoformas foram também detectadas em outros Fpb. A LiP é uma heme-proteína glicosilada extracelular, que possui um alto potencial de oxidação, sendo capaz de oxidar substratos aromáticos fenólicos e não fenólicos utilizando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cofator.

O ciclo catalítico consiste em três passos, como se segue:



Onde: R é um substrato orgânico e P é porfirina.

O ciclo catalítico inicia-se com a oxidação do  $\text{Fe}^{+3}$  da enzima nativa para  $\text{Fe}^{+4}$ , pela ação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando-se o composto I (LiP-I). A redução do composto I pela transferência de 1 elétron, promove a formação do composto II (LiP-II) que ainda possui  $\text{Fe}^{+4}$ . Normalmente o substrato utilizado como agente redutor é o álcool veratrílico. A última etapa deste ciclo ocorre quando 1 elétron reduz a enzima ao seu estado nativo (Wong, 2009; Yadav *et al.*, 2009a; Dashtban *et al.*, 2010).

Algumas potenciais aplicações desta enzima são: deslignificação de materiais lignocelulósicos que são vistas como alternativa devido ao esgotamento das reservas petrolíferas, biopolpação e biobranqueamento na indústria de papel, remoção de poluentes recalcitrantes orgânicos e na polimerização enzimática em polímeros industriais (Yadav *et al.*, 2009b).

### 2.5.2. Manganês Peroxidase (MnP)

A enzima MnP foi descoberta posteriormente à LiP, em culturas do Fpb *P. chrysosporium*. Estudos posteriores demonstraram uma maior presença desta enzima e suas isomorfias em comparação à LiP em Fpb. As MnPs são heme-proteínas glicosiladas extracelulares e possuem um ciclo catalítico semelhante à LiP necessitando do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como co-substrato e catalisa a oxidação de  $\text{Mn}^{+2}$  a  $\text{Mn}^{+3}$  (Dashtban *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2010).

As MnPs apresentam potencial de redução suficiente para retirar elétrons somente de estruturas fenólicas, embora na presença de mediadores apropriados sua ação possa ser estendida também para estruturas não fenólicas (Carvalho *et al.*, 2009).

O ciclo catalítico consiste em três passos, como se segue:



**Tabela 2.5.** Características dos dois principais grupos de LMEs de Fpb. (Adaptado de: Rodríguez Couto, 2009; Dashtban *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2010).

Enzima	Reação	Cofator	Mediador	Subunidades, massa molecular (kDa)	Intervalo pH ótimo	Fpb	Referência
LiP	Anel aromático oxidado para um radical catiônico.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Álcool veratrílico.	Monomérica, 37 - 50.	1-5	<i>Pleurotus sajor caju</i>	Yadav <i>et al.</i> , 2009a.
MnP	Mn (II) é oxidado a Mn (III); Mn (III) quelatado oxida compostos fenólicos para radicais fenoxil; outras reações na presença de compostos adicionais.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mn, ácidos orgânicos como agentes quelantes, tióis e ácidos gordos insaturados.	Monomérica, 32- 62,5.	2,5-6,8	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2009.
VP	Mn (II) é oxidado a Mn (III); oxidação de compostos fenólicos, não fenólicos e corantes.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mn, álcool veratrílico, compostos similares a LiP e MnP.	Monomérica, 42-45.	3-5	<i>Bjerkandera</i> sp.	Taboada-Puig <i>et al.</i> , 2011.
Lcc	Fenóis são oxidados a radicais fenoxil; outras reações na presença de mediadores.	O <sub>2</sub>	Fenol, ABTS, anilina hidroxibenzotriazol, seringaldazina.	Monomérica, 43-100. Dimérica, trimérica e oligomérica. Exemplo: tetrameros com ≈ 390.	2-10	<i>Trametes versicolor</i>	Pazarlioglu <i>et al.</i> , 2010.
GLOX	Glioxal é oxidado a ácido glioxal; produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .		Glioxal, metil-glioxal.	68	4,5-8,5	<i>Phanerochaete crassa</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Takano <i>et al.</i> , 2010. Roncal <i>et al.</i> , 2012.
AAO	Álcoois aromáticos são oxidados a aldeídos; produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .		Álcoois aromáticos (álcool veratrílico).		4,0-6,5	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus eryngii</i>	Kumar e Rapheal, 2011. Hernández-Ortega <i>et al.</i> , 2012.
Outras enzimas produtoras de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> reduzido para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Muitos compostos orgânicos.				

Mn = Manganês; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; ABTS = Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

O ciclo catalítico das MnPs inicia-se com a sua oxidação por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou peróxidos orgânicos, que levam a enzima nativa a um estado de oxidação deficiente em dois elétrons, denominado composto I. A redução da enzima até à forma nativa ocorre através de dois passos sucessivos, por meio da formação de um intermediário denominado composto II. Enquanto o composto I pode ser convertido em composto II tanto na presença de Mn<sup>+2</sup> quanto de outros doadores de elétrons com potencial redox apropriado, a conversão do composto II até a enzima nativa ocorre somente na presença de Mn<sup>+2</sup>.

O Mn<sup>+3</sup> formado durante a catálise, estabilizado por ácidos orgânicos produzidos pelo próprio fungo, pode retirar elétrons de vários compostos orgânicos (incluindo fenóis, amins aromáticas, compostos sulfurados e ácidos graxos insaturados) de maneira inespecífica, levando à formação de radicais bastante reativos que podem atacar estruturas recalcitrantes com alto potencial de redução (Carvalho *et al.*, 2009).

A enzima MnP apresenta potencial aplicação biotecnológica podendo ser utilizada na biodegradação: da lignina, de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHA), de ácidos húmicos, corantes sintéticos e bifenilos policlorados (PCB) (Oliveira *et al.*, 2009).

### 2.5.3. Lacase (Lcc)

A enzima Lcc é uma das mais importantes enzimas, pertencente a pequena família das oxidases multi-cobre azuis (OMC) (Piscitelli *et al.*, 2010). Devido a sua baixa especificidade ao substrato, estas oxidoreduases são consideradas uma alternativa atrativa para aplicações biotecnológicas e ambientais (Gianfreda *et al.*, 2010). Estas enzimas catalisam a oxidação de vários compostos fenólicos (fenóis, difenóis, polifenóis, diaminas, amins aromáticas) e também compostos não fenólicos na presença de mediadores, convertendo o oxigênio molecular a água.

A Lcc é uma enzima comum na natureza, sendo amplamente encontrada em plantas superiores, fungos, bactérias, insetos e líquens (Piscitelli *et al.*, 2010; Kocyigit *et al.*, 2012). O primeiro relato referente da presença desta enzima ocorreu em 1883 por Yoshida ao observar que o latex da árvore de laca japonesa *Rhus vernicifera*, enrijecia na presença de ar (Kunamneni *et al.*, 2008). Em 1896 pela primeira vez foi demonstrada a presença de lacase em fungos, por trabalhos desenvolvidos por Bertrand e Laborde. Desde então, Lcc tem sido encontrada em ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos, sendo particularmente abundante nos Fpb (Kunamneni *et al.*, 2007).

Atualmente, a maioria dos estudos estão focados nas Lcc de origem fúngica e de plantas, contudo, as Lcc fúngicas ainda atraem maior atenção devido ao maior rendimento associado às suas produções. As Lcc fúngicas ocorrem frequentemente como isoenzimas múltiplas expressas em diferentes condições de cultivo. Embora os centros de cobre sejam similares para todas as lacases de fungos, diferenças significativas são observadas nas propriedades termodinâmicas e cinéticas em função do microrganismo de origem (Oliveira *et al.*, 2009).

A ampla ocorrência da enzima Lcc em várias espécies de fungos e sua versatilidade, contribuem para uma maior investigação de novas fontes de obtenção desta enzima (Haibo *et al.*, 2009). As Lcc fúngicas são de particular interesse no que diz respeito a potenciais aplicações industriais, devido à sua capacidade de oxidar uma ampla gama de substratos tóxicos e ambientalmente poluentes. Reações de oxidação são exaustivamente utilizadas em processos industriais (Tabela 2.6), podendo-se citar as indústrias têxteis, alimentos, processamento da madeira, farmacêutica e química (Rodríguez Couto e Toca-Herrera 2006; Viswanath *et al.*, 2008a; Osma *et al.*, 2010a; Kudanga *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

A oxidação enzimática é um potencial substituto para métodos químicos, uma vez que estas enzimas são especificamente eficientes e ecologicamente sustentáveis.

A maioria das Lcc são monoméricas e o sítio ativo destas enzimas contém 4 átomos de cobre por molécula da enzima, distribuídos em diferentes sítios de ligação, sendo classificados em três tipos: cobre tipo 1 (T1) é responsável pela cor azul intensa destas enzimas e são detectáveis em UV/visível (600 nm) e por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (ERPE). O cobre tipo 2 (T2) é incolor, mas detectável por ERPE. O cobre tipo 3 (T3) é constituído por um par de íons de cobre que apresentam uma absorbância fraca próxima do espectro UV e nenhum sinal por ERPE (Viswanath *et al.*, 2008a). Os substratos fenólicos são oxidados pelo cobre T1, sendo considerado por definição o principal sítio de oxidação. Os elétrons são então transferidos para os sítios de cobre T2 e T3 formando um centro trinuclear onde ocorre a redução de oxigênio molecular e liberação de água (Baldrian, 2006; Mikolasch e Schauer, 2009; Arora e Sharma, 2010; Cañas e Camarero, 2010).

A enzima Lcc, com seu relativo baixo potencial redox (cerca de 0,6-0,8 V) está restrita a reagir somente com substâncias facilmente oxidáveis, como fragmentos fenólicos de lignina. Apesar disto, a inclusão de substâncias oxidáveis de baixa massa

molar, conhecidas como mediadores (Figura 2.6), expandem a atividade oxidativa desta enzima (Arantes e Milagres, 2009).

**Tabela 2.6.** Aplicações industriais de Lcc de Fpb.

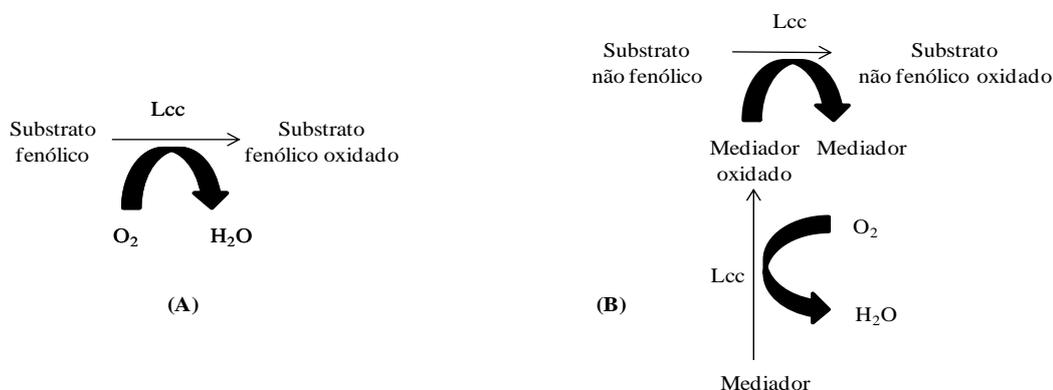
<b>Aplicação</b>	<b>Fpb</b>	<b>Referência</b>
Alimentos	<i>Trametes</i> sp.	Castillo <i>et al.</i> , 2009.
	<i>Trametes hirsuta</i>	Flander <i>et al.</i> , 2008.
	<i>Trametes versicolor</i>	Minussi <i>et al.</i> , 2007b.
Biobranqueamento	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Fillat <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Trametes villosa</i>	Moldes <i>et al.</i> , 2008.
Biopolpação	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Camarero <i>et al.</i> , 2007.
Biosensor	<i>Trametes versicolor</i>	Di Fusco <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Trametes hirsuta</i>	
	<i>Trametes versicolor</i>	Montealeali <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Trametes versicolor</i>	Sezgintürk <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Gil <i>et al.</i> , 2009.
	<i>Rigidoporus lignosus</i>	Vianello <i>et al.</i> , 2006.
Degradação de xenobióticos	<i>Pseudotrametes gibbosa</i>	Gao <i>et al.</i> , 2010.
Descoloração de corante	<i>Polyporus</i> sp.	Hadibarata <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Trametes hirsuta</i>	Moilanen <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Cerrena unicolor</i>	
	<i>Funalia (Trametes) trogii</i>	Ciullini <i>et al.</i> , 2008.
	<i>Stereum ostrea</i>	Viswanath <i>et al.</i> , 2008b.
	<i>Trametes versicolor</i>	Minussi <i>et al.</i> , 2007b.
	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Lu <i>et al.</i> , 2007.
Síntese orgânica	<i>Coriolus hirsutus</i>	Kunamneni <i>et al.</i> , 2008.
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	
	<i>Trametes versicolor</i>	
	<i>Trametes villosa</i>	
	<i>Trametes hirsuta</i>	
	<i>Trametes pubescens</i>	
	<i>Trametes hirsuta</i>	Kim <i>et al.</i> , 2007.
Tratamento de efluentes	<i>Trametes trogii</i>	Khelifi <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Lentinus tigrinus</i>	Viswanath <i>et al.</i> , 2008a.
	<i>Trametes trogii</i>	

Diferenças fisiológicas entre as culturas de fungos e também das condições de cultivo à que as estirpes são expostas afetam a produção de Lcc. Além disto, a maioria destas enzimas são extracelulares indutíveis e portanto, os indutores desempenham um papel importante no aumento da produção desta enzima (Kocyigit *et al.*, 2012).

A rápida detecção de Lcc é feita por método colorimétrico. Os substratos comumente utilizados são o 2-metoxi-fenol (guaiacol), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), seringaldazina e Remazol Brilhante Azul R (Kumar *et al.*, 2011).

A síntese de Lcc por Fpb é estritamente influenciada por diversos parâmetros, podendo-se destacar: o microrganismo e estadio de desenvolvimento; o tipo de cultivo (agitado ou estático) e o tempo; a adição de diferentes indutores ao meio de cultura. Entretanto, os fatores mais críticos são as fontes de carbono e nitrogênio e a proporção

existente entre estas fontes concentração na composição do meio de cultura (Colao *et al.*, 2009; Majeau *et al.*, 2010; Piscitelli *et al.*, 2011).



**Figura 2.6.** Mecanismo de ação da Lcc em substratos fenólicos (A) e não fenólicos (B) (Brijwani *et al.*, 2010).

O efeito destes fatores no nível de transcrição do gene da Lcc tem sido demonstrado em muitas espécies de Fpb. Na maioria dos relatos, a expressão de Lcc é regulada por um conjunto de fatores, muitas vezes agindo de forma sinérgica (Giardina *et al.*, 2010). Estas enzimas são predominantemente extracelulares, são sintetizadas e secretadas durante o metabolismo secundário dos Fpb em pequenas quantidades de forma constitutiva, porém podem também ser sintetizadas de forma indutiva.

A seleção de microrganismos produtores da enzima e meios de cultura mais adequados para procedimentos reprodutíveis de baixo custo, viabilizarão a otimização no processo de produção e aplicação desta enzima (Böhmer *et al.*, 2011; Tišma *et al.*, 2012). Zhuo *et al.* (2011) sugerem uma investigação sobre a regulação da expressão do gene desta enzima, que pode ser regulada por íons metálicos, compostos aromáticos relacionadas à lignina e derivados, nitrogênio e carbono.

A utilização de Lcc depende de uma melhor compreensão das suas propriedades em níveis moleculares e cinéticos.

A otimização na produção de Lcc de *T. versicolor* foi descrita por Tavares *et al.* (2006). Um conjunto de ensaios foi delineado na forma de projeto de experimento e conduzidos em um biorreator de capacidade de 1 l operado em “batch”. Os melhores resultados obtidos ocorreram quando o meio de cultura foi ajustado a pH 5,2 e a concentração inicial de glicose foi de  $11 \text{ g l}^{-1}$ . Consideraram ainda que a velocidade de agitação não afetou a produção da enzima.

Roriz *et al.* (2009) otimizaram o processo de descoloração do corante RP5 utilizando Lcc bruta do Fpb *Trametes pubescens* na presença do mediador redox 1-hydroxybenzotriazole (HBT), por metodologia de superfície de resposta (RSM). Neste estudo foi obtida a máxima descoloração do corante (cerca de 60 % em 20 min) nas concentrações ideais de 1,17 mM, 150 mg·l<sup>-1</sup> e 500 U·l<sup>-1</sup> para HBT, RP5 e Lcc, respectivamente.

De acordo com os resultados de um estudo, conduzido por Stoilova *et al.* (2010) a utilização de Lcc bruta de *T. versicolor* proporcionou a descoloração de até 100 % dos corantes Índigo Carmim, Remazol Brilhante Azul R (RBBR), Laranja II e Vermelho Congo, no intervalo de tempo de 4 h e 13 dias.

A detecção e caracterização de várias isomorfias de LiP, MnP e Lcc em Fpb sugerem que pelo menos parte desta diversidade bioquímica ocorre devido a um número proporcional de genes correspondentes ao genoma fúngico (Goudopoulou *et al.*, 2010). A descrição do genoma de *P. chrysosporium* proporcionou uma ampliação na investigação de estudos, incluindo estudos da proteômica extracelular (Aguiar e Ferraz, 2011) direcionados a esta espécie e estendendo-se a outros Fpb.

#### 2.5.4. Glioxal-oxidase (GLOX)

A enzima GLOX é uma glicoproteína de 68 kDa com duas formas isoenzimáticas (pI 4,7 e 4,9) (Kersten e Cullen, 2007). Estas enzimas são sintetizadas por fungos filamentosos, destacando-se ao grupo dos Fpb. Dentre os Fpb, é reconhecida a síntese desta enzima pelo microrganismo *P. chrysosporium* (Hernández-Ortega *et al.*, 2012) e mais recentemente por *Phanerochaete crassa* (Takano *et al.*, 2010).

As GLOX é considerada essencial na via de degradação da lignina, fornecendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular como co-substrato para as peroxidases LiP, MnP e VP (Dashtban *et al.*, 2010). A enzima GLOX catalisa a oxidação enzimática de uma variedade de substratos, incluindo aldeídos simples e compostos α-hidroxicarbonil e α-dicarbonil (formaldeído, acetaldeído, glicolaldeído, glioxal, ácido glioxílico, di-hidroxi-acetona, gliceraldeído e metil-glioxal) para ácidos carboxílicos (Leuthner *et al.*, 2005; Roncal *et al.*, 2012).

Recentemente, Roncal *et al.* (2012) descreveram a potencial capacidade desta enzima em converter o glicerol excedente gerado durante a produção de biodiesel em gliceraldeído e ácido glicérico, por uma única reação de oxidação realizada em dois

passos. Tal resultado propicia a resolução do problema com o acúmulo deste material e também gera a oportunidade de sua utilização na produção de novos compostos.

## 2.6. Seleção de Fpb para tratamento de efluentes têxteis

Muitos estudos são desenvolvidos para selecionar Fpb capazes de descolorir e degradar corantes provenientes da indústria têxtil, porém não é frequente realizar-se uma pré-adaptação do microrganismo ao corante.

Segundo Martins *et al.* (2002) a utilização de um meio de pré-adaptação (MPA) de composição igual ou semelhante ao meio de estudo, induz o microrganismo a sintetizar as enzimas constituintes de seu sistema enzimático. O corante existente no MPA, será o co-substrato que irá antecipar a síntese destas enzimas. Conseqüentemente, o meio de cultivo de estudo inoculado com MPA, apresentará uma descoloração e ou degradação do corante num menor tempo e com maior eficiência.

A seleção de microrganismos capazes de descolorir e degradar corantes, usualmente ocorre em meio de cultura sólido (MCS). A descoloração do corante em MCS permite uma avaliação visual, baseada no desaparecimento da cor na placa medindo-se o halo de descoloração e crescimento micelial por um determinado período. Diversos trabalhos foram conduzidos baseados neste procedimento (Minussi *et al.*, 2001; Chander *et al.*, 2004; Dhouib *et al.*, 2005; Eichlerová *et al.*, 2007; Gomaa *et al.*, 2008; Faraco *et al.*, 2009b; Diwaniyan *et al.*, 2010).

Durante um determinado período, a estirpe é exposta a diferentes concentrações do corante selecionado para o estudo. Este procedimento permite avaliar a capacidade do microrganismo em se adaptar e descolorir o corante e, por outro lado, delimita a concentração máxima do composto recalitrante que não seja tóxica. Uma vez que elevadas concentrações reduzem ou inibem o sistema enzimático fúngico envolvido (Selvam *et al.*, 2003).

Novotný *et al.* (2001) conduziram um estudo, onde os dois primeiros passos de trabalho foram realizados em MCS. Inicialmente 103 estirpes de Fpb foram avaliadas quanto a capacidade de descolorir os corantes antraquinônicos Poli R-478 (PR478) e Remazol Brilhante Azul R (RBBR) em concentração de 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Deste total de estirpes avaliadas *Irpex lacteus* e *Pleurotus ostreatus* atingiram a máxima descoloração após 10 dias de incubação à temperatura de 28 °C. Estas estirpes foram posteriormente

utilizadas na degradação de 6 diferentes grupos de corantes. Os resultados obtidos indicaram a possível existência de diferentes mecanismos ou o uso distinto de mecanismos similares de acordo com o tipo de corante a que as duas estirpes foram expostas.

Eichlerová *et al.* (2006a) delinearão a primeira parte de um experimento avaliando a capacidade da estirpe *Dichomitus squalens* em descolorir oito diferentes corantes em MCS, onde a concentração variou entre 0,05 e 2,0 g·l<sup>-1</sup>. Na concentração máxima de 2,0 g·l<sup>-1</sup> os corantes azo Laranja G e Amaranço foram os únicos totalmente descoloridos pela estirpe em menor tempo (14 dias). Apesar de pertencer a mesma classificação de acordo com o grupo cromóforo, o corante Laranja I não foi descolorido por *Dichomitus squalens* em concentrações superiores a 1,0 g·l<sup>-1</sup>. Na máxima concentração, os corantes RBBR e PR478 (antraquinona) e ftalocianina azul (ftalocianina) foram totalmente descoloridos pela estirpe, porém, o tempo variou entre 21 e 24 dias. Verde Malaquita e Cristal Violeta (trifenilmetano) foram apenas descoloridos na concentração de 0,05 g·l<sup>-1</sup> em 24 dias de cultivo. Os resultados obtidos nestes estudos demonstram que para além do efeito da concentração, a estrutura química do corante é determinante na atividade descolorativa/degradativa do microrganismo.

Barrasa *et al.* (2009) isolaram e identificaram trinta basidiomicetos de acordo com características morfológicas. Utilizando dois corantes RP5 e Azul Reativo 38 (azo e ftalocianina, respectivamente) em diferentes concentrações (75 e 150 mg·l<sup>-1</sup>) selecionaram novas estirpes aptas a descolorir corantes recalcitrantes. Nestas concentrações apenas três estirpes *Calocera cornea*, *Lopharia spadicea*, *Polyporus alveolari* foram capazes de descolorir ambos os corantes.

Diwaniyan *et al.* (2010) avaliaram 8 estirpes de Fpb capazes de descolorir 6 corantes sintéticos e 2 efluentes têxteis (A-pH 8,9; B-pH 2,5). A concentração final dos corantes e efluentes têxteis no MCS foram de 0,02 % p/v e 1 % v/v, respectivamente, sendo o tempo de incubação de 12 dias. A estirpe *Phanerochaete chrysosporium* K3 apresentou o melhor conjunto de resultados, descolorindo 5 corantes sintéticos e os 2 efluentes têxteis selecionados, em diferentes intensidades. Neste mesmo estudo, a descoloração dos corantes e efluentes têxteis também foi avaliada com as 8 estirpes em meio de cultura líquido (MCL). Os resultados obtidos denotaram diferentes perfis de descoloração para cada estirpe avaliada, assim como os sistemas enzimáticos envolvidos.

### **2.6.1. Alguns fatores que influenciam o desempenho dos Fpb na descoloração de corantes têxteis**

A performance dos Fpb durante o processo de descoloração e/ou degradação de corantes dependerá de muitos fatores, podendo-se destacar: as condições de cultivo, as características específicas de cada estirpe, a idade do inóculo, a composição e pH do meio de cultura entre outros fatores (Machado *et al.*, 2006; Rigas e Dritsa, 2006; Revankar e Lele, 2007; Erden *et al.*, 2009; Yemendzhiev *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010a; Kalpana *et al.*, 2011).

Na Tabela 2.7 são apresentadas as diferentes capacidades de descoloração de várias estirpes de Fpb quando submetidos a diferentes condições de pH, meio de cultura e corantes.

#### **2.6.1.1. Composição do meio de cultura**

A composição do meio de cultura possui um efeito significativo sobre o crescimento dos fungos e a produção de um sistema de descoloração efetivo (Sanghi *et al.*, 2009). Os efluentes industriais reais possuem composição variada e, em muitos casos, são extremamente complexos. Estes efluentes normalmente apresentam falta de nutrientes em comparação aos meios de cultura utilizados em estudos em escala laboratorial. Portanto, deve-se ter atenção focada no fornecimento de fontes de carbono e nitrogênio, juntamente com outros nutrientes minerais e aditivos.

Uma fonte de carbono é normalmente necessária para o crescimento de fungos. A glicose é a fonte de carbono mais utilizada na maioria das investigações. Também existem relatos quanto à boa assimilação das fontes de carbono: sacarose, frutose, maltose, xilose, glicerol, amido e xilana (Pavko, 2011).

A quantidade de nitrogênio disponível na natureza ou no meio de cultura exerce uma grande influência na produção das enzimas ligninolíticas extracelulares produzidas pelos Fpb e constitui um fator essencial para um processo eficiente de descoloração de corantes por estes microrganismos (Levin *et al.*, 2010).

Mendez-Paz *et al.* (2003) relataram que a presença de fontes de carbono externas que favoreceriam o aumento da taxa de remoção do corante azo Ácido Laranja 7 (AL7) destacando a glicose como um bom co-substrato.

Tabela 2.7. Degradação de corantes sintéticos por Fpb.

Fungo	Concentração do Corante (mg·l <sup>-1</sup> )	Descoloração Máxima %	Tipo de Cultivo	pH inicial	Enzima	Referência
<i>Daedalea flavida</i>	Amaranto (50)	99	MCL (a) (b).	4,0-6,5	Lcc	Rani <i>et al.</i> , 2012.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>						
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Remazol Brillhante Azul R (200)	95	MCS	ND	ND	Ang <i>et al.</i> , 2011.
<i>Pycnoporus sanguineus</i>		32				
<i>Phlebia radiata</i>		28,9				
<i>Pleurotus sajor-caju</i>		19,2				
<i>Bjerkandera adusta</i>	Efluente simulado W1 (100) de cada corante.	96,5 ± 0.5	MCL (a)	5,0	MnP	Anastasi <i>et al.</i> , 2011.
	Efluente simulado W2 (1250) de cada corante.	91,0 ± 6.5	MCL (a)	10,0	MiP	
	Efluente simulado W3 (1000) de cada corante.	89,7 ± 1.5	MCL (a)	9,0		
	Efluente simulado W4 (100) de cada corante.	91,4±2.5	MCL (a)	5,0		
	Efluente Têxtil WR	63,0	MCL (a)	8,5		
<i>Trametes versicolor</i>	Preto Dycem TTO (150)	86-94	MCS; MCL(a)	4,5	Lcc	Baccar <i>et al.</i> , 2011.
<i>Ganoderma lucidum</i>		90				
<i>Irpex lacteus</i>		76				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Amarelo Ouro Solar R (100 – 500)	90,32	MCL (a)	3,0-5,0	MnP	Jilani <i>et al.</i> , 2011.
	Vermelho Brillhante Solar BA (100)	70,3		4,5		
	Laranja Solar RSN (100)	59,44		4,5		
<i>Irpex lacteus</i>	Azul-Escuro Isolan 2S-GL01 (50 – 250)	100	MCL (a)	5,0-9,0	ND	Kalpana <i>et al.</i> , 2011.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Azul Drimaren K2RL (10 – 200)	97	MCL (a)	3,0-5,0	MnP	Noreen <i>et al.</i> , 2011.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Direto Vermelho 80 (10-100)	100	MCL (a)	4,5	MnP	Pakshirajan <i>et al.</i> , 2011.
	Mordante Azul 9 (10-100)	100			LiP	
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Reativo Preto 5 (10)	84	MCL (ND)	4,5	LiP	Singh <i>et al.</i> , 2011.
	Reativo Laranja 16 (25)	80,9				
	Disperso Azul 79 (25)	32,1				
	Disperso Vermelho 60 (25)	47,2				
	Disperso Azul 56 (25)	5,9				

MCL = (a) agitado e (b) estático.

ND = Não definido. MiP = Manganês independente-peroxidase; CDH = Celobiose-desidrogenase.

\* Não ocorreu descoloração, mas sim adsorção ao suporte.

Tabela 2.7. Degradação de corantes sintéticos por Fpb (Continuação).

Fungo	Concentração do Corante (mg·l <sup>-1</sup> )	Descoloração Máxima %	Tipo de Cultivo	pH inicial	Enzima	Referência
<i>Ganoderma sp.</i>	Verde Malaquita (25-200)	98,9 ± 1.27	MCL (a)	5,5	Lcc	<i>Zhuo et al.</i> , 2011.
	Metil Laranja (25-200)	96,7 ± 1.22		5,5		
	Cristal Violeta (25-200)	92,4 ± 2.4		5,5		
	Bromofenol Azul (25-200)	98,3 ± 4.01		5,5		
	Efluente Simulado I	91,3 ± 2.74		4,5		
	Efluente Simulado II	90,9 ± 6.34		4,5		
	Efluente Têxtil	91,38 ± 3.09		9,2		
<i>Lentinus crinitus</i>	Reativo Azul 220 (100-5000)	95	MCL (b)	2,0-9,0	Lcc	<i>Niebisch et al.</i> , 2010.
	Reativo Vermelho 198 (100)	-				
	Reativo Laranja 107 (100)	-				
<i>Dratronia sp.</i>	Remazol Brilhante Azul R (200-1000)	90	MCL (a)	3,0- 9,0	Lcc MnP	<i>Vaithanomsat et al.</i> , 2010a.
	Reativo Preto 5 (200-1000)	90				
<i>Ganoderma sp.</i>	Reativo Azul 19 (150)	94,89	MCL (a)	5,5-6,5	Lc	<i>Fazli et al.</i> , 2010.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Direto Vermelho 80 (50)	100	MCL (a)	ND	LiP	<i>Singh et al.</i> , 2010b.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Amarelo Ouro Solar R (10-100)	83,78 ±5	MCL (a)	3,0-5,0	MnP	<i>Bibi et al.</i> , 2009.
	Laranja Solar RSN (10-100)	43 ±3				
	Vermelho Brilhante Solar BA (10-100)	77,5 ±4				
<i>Trametes versicolor</i>	Ácido Verde 16 (150)	99	MCL(a)	4,5	Lcc	<i>Casas et al.</i> , 2009.
	Fucsina Ácida (150)	99				
	Metil Verde (150)	78				
	Verde Brilhante 1 (150)	92				
	Fucsina Básica (150)	79				
<i>Trametes pubescens</i>	Remazol Brilhante Azul R – (133)	100	MCL (b).	ND	Lcc CDH	<i>Enayatzamir et al.</i> , 2009a.
	Metil Verde (33)	90				
	Xilidina Ponceau (22)	80				
	Direto Violeta 51 (15)	84				
	Marrom Bismark R (22)	40				
	Poli R-478 (ND)	24				
<i>Trametes sp.</i>	Verde Malaquita (5-200)	97	MCL(a)	2,0-8,0	Lcc	<i>Maalej-Kammoun et al.</i> , 2009.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Laranja II (50-250)	85	MCL (a)	3,0-7,0	MnP	<i>Sharma et al.</i> , 2009.
<i>Trametes versicolor</i>	Reativo Laranja -16 (79-920)	94,5	MCL (a)	4,5	ND	<i>Srinivasan e Murthy</i> , 2009.
	Vermelho Reativo-35 (79-920)	90,7				
<i>Trametes versicolor</i>	Ácido Vermelho 66 (10-100)	95,7	MCL (a) (b).	5,0-10,0	ND	<i>Sukumar et al.</i> , 2009.

Tabela 2.7. Degradação de corantes sintéticos por Fpb (Continuação).

Fungo	Concentração do Corante (mg·l <sup>-1</sup> )	Descoloração Máxima %	Tipo de Cultivo	pH inicial	Enzima	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Direto Violeta 51 (65)	> 85	MCL (a)	ND	MnP	Enayatizamir <i>et al.</i> , 2010.
	Reativo Preto 5 (120)	> 85				
	Xilidina Ponceau (100)	~ 100				
	Bismark Castanho (1000)	*				
<i>Trametes sp.</i>	Vermelho Congo (100)	100	MCL (a)	3,0-6,0	Lcc	Yang <i>et al.</i> , 2009b.
	Rápido Azul RR (100)	100				
	Ácido Vermelho (100)	100				
	Amido Preto 10B (100)	100				
	Laranja G – (100)	100				
	Verde Malaquita (100)	70				
	Cristal Violeta (20-200)	70				
	Vermelho Cresol (100)	70				
	Azul Brilhante Comassie G 250 (100)	70				
	Bromofenol Azul(100)	100				
	Remazol Brilhante Azul R (20-200)	100				
<i>Trametes versicolor</i>	Reativo Azul 4 (50; 125)	90	MCL (a)	6,5	Lcc	Yemendzhiev <i>et al.</i> , 2009.
<i>Irpex lacteus</i>	Reativo Laranja 16 (150)	88,5 ± 6,7	MCL (a)	ND	Lcc MnP	Svobodová <i>et al.</i> , 2008.
	Naftol Azul Preto (150)	76,2				
	Remazol Brilhante Azul R (150)	98,6 ± 0,2				
	Ftalocianina de cobre II (150)	43,2 ± 2,8				
	Bromofenol Azul (150)	24,4 ± 7,4				
<i>Ganoderma sp</i>	Amaranto (100)	96	MCL (a) e (b)	5,5	ND	Revankar e Lele 2007.
	Reativo Laranja 16 (100)	ND				
	Vermelho Brilhante Cibracon 3B-A (100)	50				
	Vermelho Ácido 16 (100)	ND				
	Laranja II (100)	ND				
	Remazol Brilhante Azul R (100)	73				
<i>Ischnoderma resinosum</i>	Laranja G (500-1000)	95,4	MCL (a) (b)		Lcc/MnP	Eichlerová <i>et al.</i> , 2006b.
	Amaranto(500-1000)	99,1				
	Remazol Brilhante Azul R (500-1000)	94,8				
	Ftalocianina de cobre II (500-1000)	92,2				
	Poli R-478 (500-1000)	27,2				
	Verde Malaquita (50-100)	97,0				
	Cristal Violeta (50-100)	99,6				
<i>Trametes trogii</i>	Remazol Brilhante Azul R (50-400)	97	MCL (a)	3,0-8,0	Lcc	Mechichi <i>et al.</i> , 2006.

Em outro estudo Mendez-Paz *et al.* (2005) utilizando o mesmo corante (AL7) conduziram diferentes ensaios obtendo novamente uma maior taxa de descoloração quando adicionada glicose como co-substrato.

Moldes *et al.* (2004) descrevem a forte influência da fonte de nitrogênio empregue, na quantidade e tipo de enzimas ligninolíticas sintetizadas por vários Fpb. Neste mesmo estudo, constataram que a proporção das isoenzimas de Lcc secretadas pelo Fpb *T. versicolor* era diferente de acordo com o material lignocelulósico empregue, sendo que esta proporção desempenhava um papel importante na descoloração de corantes.

Conclusões semelhantes ocorreram em um estudo conduzido por Mikiashvili *et al.* (2005). De acordo com os autores, a síntese de enzimas ligninolíticas é regulada pelas fontes de carbono e nitrogênio existentes no meio de cultura. A estirpe *T. versicolor* 775 foi considerada eficiente na produção de Lcc e MnP em meio de cultura contendo substrato lignocelulósico.

Rodríguez Couto *et al.* (2006a) avaliaram o efeito da adição de diferentes fontes de carbono na produção de Lcc. O experimento foi conduzido em um reator *air lift* de 6 l com a estirpe *Trametes hirsuta*. A atividade máxima da enzima Lcc ( $19\ 400\ \text{U l}^{-1}$ ) foi obtida quando ao 24º dia de fermentação foi adicionado glicerol.

O Fpb *Schizophyllum commune* foi utilizado em um estudo de biodegração do corante Vermelho Cibracon FN-2BL desenvolvido por Bhatti *et al.* (2008). Segundo os autores, nas condições de pH 4,5, temperatura 30 °C e adição de 1,5 % de glicose na composição do meio de cultura, o microrganismo foi capaz de remover 98 % do corante. As enzimas ligninolíticas LiP e MnP foram descritas como as principais responsáveis no processo de biodegradação do corante supracitado.

Asgher *et al.* (2009) avaliaram a capacidade do Fpb *Coriolus versicolor* IBL-04 no tratamento de um efluente têxtil. O método clássico de otimização do processo foi adotado, variando-se um parâmetro (temperatura, pH e adição de fontes de carbono e nitrogênio complementares). De acordo com os resultados obtidos, a otimização dos parâmetros: pH, temperatura e a utilização de amido como fonte de carbono, proporcionou uma maior síntese da única enzima ligninolítica detectada (MnP) e, conseqüentemente, um melhor desempenho do Fpb *C.versicolor* na descoloração deste efluente atingindo uma taxa de 84,4 %.

Elisashvili e Kachlishvili (2009) descrevem a possível influência de alguns carboidratos na regulação da expressão da enzima Lcc sintetizada por Fpb. Os mesmos

autores destacam a necessidade da elucidação da expressão desta enzima utilizando-se diferentes fontes de carbono para o aumento da síntese desta enzima.

Niebisch *et al.* (2010) avaliaram o efeito de 6 diferentes fontes de carbono, pH, temperatura e concentração de sais na descoloração de Azul Reativo 220 (AR220) por *Lentinus crinitus*. Neste estudo concluíram que a descoloração do corante estava fortemente associada a composição do meio de cultura e condições de cultivo. A enzima envolvida na descoloração de AR220 foi uma putativa Lcc de baixo peso molecular e que apresentava boa tolerância a uma ampla gama de pH e temperatura.

Kumar *et al.* (2012) relataram uma maior atividade da enzima Lcc purificada de *Pleurotus ostreatus* em 10 mM de glicerol, aumentando 1,99 vezes a atividade da enzima.

### **2.6.1.2. Concentração inicial do corante**

O efeito da concentração inicial do corante é um fator importante na decisão sobre a taxa e extensão de descoloração. Os corantes são normalmente tóxicos para os microrganismos. A faixa de concentração de corantes descrita na maioria dos estudos, varia geralmente de 50 a 1000 mg·l<sup>-1</sup> (Pavko, 2011).

A toxicidade depende do tipo de corante e em maiores concentrações os corantes são geralmente tóxicos (Sanghi *et al.*, 2011).

### **2.6.1.3. pH**

A maioria dos estudos referente ao crescimento e produção de enzimas são realizados em “batch” e geralmente sem um controle do pH durante o cultivo. Dentre os fungos filamentosos, os Fpb apresentam melhor taxa de crescimento em meio ácido. Dependendo do substrato utilizado ocorrem alterações no pH durante o período de cultivo. O crescimento contendo carboidratos geralmente provoca acidificação do meio de cultura. No que se refere à descoloração de corantes, os experimentos podem ser conduzidos com o caldo de fermentação (micélio e enzimas) ou enzimas isoladas. Valores distintos podem ser detectados para um pH ótimo de crescimento e produção de enzima, assim como para a ação de enzimas isoladas e degradação de corantes. Deste modo, o pH ótimo dependerá do meio de cultura, do fungo e do sistema enzimático (Pavko, 2011).

A capacidade da estirpe *P. chrysosporium* MTCC 4955 em descolorir o corante azo Laranja II nas concentrações de 50 e 100 mg·l<sup>-1</sup> foi avaliada por Sharma *et al.* (2009). Neste estudo, os autores ajustaram o meio de cultura a pH inicial 5,0. Nestas condições uma ligeira redução na capacidade do microrganismo em descolorir o corante foi observada após a elevação da concentração do corante para 100 mg·l<sup>-1</sup>, muito embora a descoloração tenha chegado a uma taxa de 85 % no 5º dia do ensaio.

Ao estudarem a descoloração de RP5 utilizando a estirpe *Funalia trogii* ATTC 200800 em diferentes valores de pH (4,78; 5,0; 5,5 e 6,0) Mazmanci e Unyayar (2010) obtiveram uma maior descoloração de RP5 em pH 4,78.

Vaithanomsat *et al.* (2010b) utilizaram a estirpe *Dratronia sp.* KAPI0039 para um estudo do efeito do pH na descoloração de Remazol Brilhante Azul R (RBBR) e RP5. A maior taxa de descoloração foi obtida com o corante RBBR em valores de pH que variaram entre o neutro e alcalino. Em contrapartida os melhores resultados de descoloração de RP5 ocorreram em condições ácidas.

#### **2.6.1.4. Estado morfológico do microrganismo**

O estado morfológico do microrganismo durante o processo fermentativo influencia diretamente a obtenção dos produtos microbianos de interesse, por diminuir o tempo de cultivo e aumentar o rendimento do processo. Os fungos, por exemplo, apresentam uma morfologia bastante complexa com estruturas celulares diferentes em cada etapa do seu ciclo de vida (Covizzi *et al.*, 2007).

Neste contexto, a tecnologia de imobilização celular (TIC) através do uso de diferentes tipos de suportes possibilita dentre outras vantagens a reutilização celular, a proteção aos danos causados por cisalhamento e uma maior estabilidade durante longos períodos aumentando a eficiência nos processos fermentativos (Bergmaier *et al.*, 2005). A utilização de células imobilizadas em vários processos biológicos tem sido descrita como promissora, uma vez que em estado natural os microrganismos encontram-se aderidos a diferentes tipos de superfícies (Akdogan e Pazarlioglu, 2011).

A imobilização de microrganismos pode ser definida como qualquer técnica que limita a livre migração de células. Basicamente, existem dois tipos de imobilização celular: o aprisionamento e adesão (*attachment*). No primeiro caso, os organismos são aprisionados no interior dos interstícios de materiais fibrosos ou porosos e são contidos

fisicamente por uma matriz sólida e porosa. No segundo, os microrganismos aderem à superfície ou a outros organismos de auto-adesão ou ainda por ligação química (Rodríguez Couto e Toca-Herrera, 2007; Mussato *et al.*, 2009; Saratale *et al.*, 2011).

Urra *et al.* (2006) destacam que a imobilização de células tem demonstrado ser um recurso eficiente, uma vez que a produção contínua de enzima durante o metabolismo secundário é restrita a condições fisiológicas e morfológicas do fungo. O crescimento desordenado do micélio pode reduzir o rendimento do processo após um curto período de tempo. Muitos estudos descrevem uma melhor performance do microrganismo imobilizado em diferentes suportes quando comparado a células livres, uma vez que o sistema assegura uma maior transferência de oxigênio, reduzindo o crescimento micelial excessivo.

Segundo Covizzi *et al.* (2007) a maior concentração de células microbianas em um suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação. Além disso, facilita a recuperação dos produtos do metabolismo de interesse na fase de “*downstream*” e ajuda na manutenção dos fermentadores, uma vez que não apresenta problemas de adesão e obstrução aos eletrodos e tubos. Nas operações industriais, o sistema de imobilização de células microbianas pode fornecer vantagens adicionais sobre células livres, podendo-se citar a reutilização de biomassa, maior facilidade na separação entre líquidos e sólidos e redução na possibilidade de obstrução em sistema de fluxo contínuo (León-Santiestebán *et al.*, 2011).

A utilização de células ou enzimas imobilizadas, no tratamento de efluentes têxteis depende da seleção do suporte (inerte ou natural) mais adequado à cada estirpe e condições de operação. Em muitos casos os suportes inertes são considerados mais adequados para fermentações que ocorrem por longos períodos.

Vários estudos têm empregado diferentes materiais para a imobilização, podendo-se citar: espumas de poliuretano (Rodríguez Couto *et al.*, 2004; Pavko e Novotný, 2008), esponja de “*nylon*” (Rodríguez Couto *et al.*, 2004; Enayatizamir *et al.*, 2011), alginado de cálcio (Domínguez *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2007; Enayatizamir *et al.*, 2010), esponja vegetal *Luffa cylindrica* (Mazmanci e Ünyayar, 2005).

Osma *et al.* (2010b) utilizaram Lcc imobilizada do Fpb *Trametes pubescens*. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a descoloração do corante ocorreu principalmente pela ação da enzima Lcc. Além disso, os produtos da degradação do RBBR apresentaram menor fitotoxicidade do que o corante de origem.

## 2.7. Tipos de fermentação

O tipo de fermentação adotado influenciará diretamente no desempenho do microrganismo e conseqüentemente na síntese das enzimas envolvidas. O processo fermentativo pode ocorrer em MCL denominado de fermentação submersa (FS) e em MCS, denominado de fermentação em estado sólido (FES) (Stajic *et al.*, 2004; Majeau *et al.*, 2010).

A FS envolve o crescimento de microrganismos em um meio líquido rico em nutrientes e com uma concentração elevada de oxigênio (condições aeróbias). A água possui diversas funções em um bioprocessamento, tais como, a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos; e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, da estabilidade da estrutura lamelar e da conservação da permeabilidade da membrana plasmática (de Castro e Pereira Jr, 2010).

A produção industrial de enzimas é realizada principalmente por FS (Rodríguez Couto e Toca-Herrera, 2007) enquanto que, na FES, as condições são muito semelhantes às existentes na natureza e ocorre na ausência ou quase ausência de água livre.

Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias, afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimatação celular (de Castro e Pereira Jr, 2010).

## 2.8. Reatores

A seleção de um reator apropriado é essencial para a obtenção de uma maior eficiência e redução de custos no processo. Um reator em condições ideais de operação deve assegurar grande produção enzimática por longos períodos e proporcionar o crescimento controlado do microrganismo.

Atualmente, o uso de Fpb para a descoloração/biodegradação de diferentes classes de corantes e efluentes têxteis, têm sido relativamente bem sucedida utilizando-se vários tipos de reatores (Tabela 2.8), incluindo os de solo em suspensão, leito fixo de fluxo contínuo, membrana submersa, contador biológico rotativo entre outros (Gao *et al.*, 2010). A concepção do sistema de operação mais adequado dependerá sempre de um conjunto de fatores.

Tabela 2.8. Descoloração de corantes sintéticos por Fpb em diferentes reatores.

Fungo	Tipo de reator/ Volume de trabalho (l)	Tipo de cultivo	Concentração do Corante (mg·l <sup>-1</sup> )	Enzima/ Atividade Máxima	Indutor	pH inicial	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	Ar Pulsado (1,5)	Células livres.	Preto Dycem TTO (150)	Lcc/70 AU l <sup>-1</sup>	-	4,5	Baccar <i>et al.</i> , 2011.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Leito Fixo (0,2)	Célula imobilizada em EN. Casca de semente de girassol	Preto Reativo 5 (15-100)	LiP/ND MnP/ND	AV	4,4	Enayatizamir <i>et al.</i> , 2011.
<i>Irpex lacteus</i>	Filtro Biológico (0,2)	Célula imobilizada em EPO.	Remazol Brilhante Azul R (150) Bromofenol Azul (150) Ftalocianina de cobre (II) (150) Reativo Laranja 16 (150) Disperso Azul 3 (150) Metileno Azul (150) Efluente Têxtil	MnP 23,3 ± 3 U·l <sup>-1</sup> Lcc 9 ± 2 U·l <sup>-1</sup>	-	4,5      ND	Novotný <i>et al.</i> , 2011.
<i>Bjerkandera adusta</i>	Leito Fixo (0,3; 1,0)	Espunja de aço inoxidável	Efluente simulado W1 (Azul Ácido 62, Ácido Amarelo 49, Ácido Vermelho 266) (100) Efluente Têxtil OMO	MnP/451 AU l <sup>-1</sup> MiP/149 AU l <sup>-1</sup>	-	5,0  9,3	Anastasi <i>et al.</i> , 2010.
<i>Irpex lacteus</i>	Biológico de Contato Rotativo (1,5)	Célula imobilizada em madeira de pinho; Espuma de poliéster.	Remazol Brilhante Azul R (100) Reativo Laranja 16 (100)	Lcc/9 U·l <sup>-1</sup>	-	4,5	Pocedič <i>et al.</i> , 2010.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Leito Fluidizado (1,5)	Esporos imobilizados em esferas de alginato de cálcio.	Reativo Laranja 16 (40)	MnP/96±8 U·l <sup>-1</sup>	-	4,0	Zahmatkesh <i>et al.</i> , 2010.
<i>Tramete pubescens</i>	Leito fixo (0,2)	Espunja de aço inoxidável	Reativo Preto 5 (30)	Lcc/1025 U·l <sup>-1</sup>	Cu <sup>+2</sup>	4,5	Enayatizamir <i>et al.</i> , 2009.
<i>Irpex lacteus</i>	"Trickle-bed biofilter"	Espuma de poliéter macrorreticulada; Espunja vegetal <i>Luffa</i> ; Espunja de poliamida.	Remazol Brilhante Azul R (150) Reativo Laranja 16 (150)	Lcc/6,0 U·dm <sup>-3</sup> MnP/40 U·dm <sup>-3</sup>	-	ND	Pocedič <i>et al.</i> , 2009.

Aril álcool-oxidase = (AAO)

EPO = Espuma de poliuretano; EN = Espunja de "nylon". AV = Álcool veratrílico.

ND = Não definido; - Não ocorreu adição.

Tabela 2.8. Descoloração de corantes sintéticos por Fpb em diferentes reatores (continuação).

Fungo	Tipo de reator (volume de trabalho)	Tipo de cultivo	Concentração do Corante (mg·l <sup>-1</sup> )	Enzima/ Atividade Máxima	Indutor	pH inicial	Referência
<i>Tramete pubescens</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Quimiostato (0,25)	Célula imobilizada em EPO.	Reativo Azul 49 (200-2000) Reativo Vermelho 243(200-2000) Remazol Brilhante Azul R(200-2000)	Lcc 15 333 nkat/l MnP 1687 nkat/l MiP 417 nkat/l LiP 567 nkat/l AAO 583 nkat/l	-	ND	Casieri <i>et al.</i> , 2008.
<i>Bjerkandera sp.</i>	Biológico de Contato Rotativo (0,4)	Madeira de bétula.	Reativo Preto 5 (100) Reativo Laranja 13 (100) Reativo Azul 21(100) Reativo Amarelo 206 (100)	ND	-	6,0	Nordström <i>et al.</i> , 2008.
<i>Trametes hirsuta</i>	“Air-liff” (6,0)	Células livres.	-	Lcc/19400 U·l <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub> Glicerol	4,5	Rodríguez Couto <i>et al.</i> , 2006a.
<i>Trametes versicolor</i> <i>Pleurotus flabellatus</i>	Leito Fixo (1,0; 1,5) Biológico de Contato Rotativo (1,0)	Esponja vegetal <i>Luffa</i> . Madeira de Bétula.	Reativo Vermelho 2 (500) Reativo Azul 4 (500-200) Efluente têxtil real (ND)	ND	-	3,0-4,0 3,0	Nilsson <i>et al.</i> , 2006.
<i>Trametes versicolor</i>	Biológico de Contato Rotativo (5,3) Reator de Tanque Agitado (1,8)	Fio de juta.	Amaranto (15-28) Amaranto (25-100)	ND	-	ND	Ramsay <i>et al.</i> , 2006.
<i>Irpex lacteus</i>	“Trickle-bed” (0,1; 1,0) Biológico de Contato Rotativo (1,0)	Células imobilizada em EPO.	Reativo Laranja 16 (150-600)	MnP/32,9 U·l <sup>-1</sup> Lcc/2,3 U·l <sup>-1</sup>	-	ND	Tavčar <i>et al.</i> , 2006.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	“Packed-Bed” (0,203)	Célula imobilizada em EPO.	Preto Ácido 1 (25-400) Azul Básico 41 (25-100) Preto Reativo 5 (25-400) Laranja Reativo 16 (25-400)	MnP/106 U·l <sup>-1</sup>	Mn <sup>+2</sup>	4,5	Urta <i>et al.</i> , 2006.

Borchert e Libra (2001) estudaram a capacidade de utilizar células livres de *T. versicolor* em descolorir os corantes RP5, Reativo Vermelho 198 e RBBR. Os experimentos foram conduzidos simultaneamente em Erlenmeyers e reatores de tanque agitado operados em “batch” a pH 5,0. Para ambos os sistemas adotados os resultados obtidos apresentaram uma taxa de descoloração estável e elevada entre 91-99 %. Estes autores sugeriram a possibilidade de reutilização da cultura celular por longo tempo sem diminuição da atividade das enzimas extracelulares envolvidas.

A descoloração de corantes azo e antraquinônicos em concentração de  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , foi descrita por Kim *et al.* (2004) utilizando um biorreator de membrana, onde o Fpb *T. versicolor* apresentou uma descoloração destes corantes de até 99 % em 48 h. Também utilizando o Fpb *T. versicolor* imobilizado em fio de juta Ramsay *et al.* (2006) avaliaram a capacidade deste microrganismo em descolorir o corante Amarantho. Os experimentos foram conduzidos em um reator biológico de contato rotativo (CBR) operado em “batch” (modo contínuo). As maiores taxas de descoloração obtidas ocorreram quando o reator foi operado em “batch”.

Tavčar *et al.* (2006) avaliaram a capacidade da estirpe *Irpex lacteus*, imobilizada em EPO, em descolorir o corante Reativo Laranja 16 utilizando três diferentes tipo de reatores. Os melhores resultados obtidos foram em um reator *trickle bed* pequeno, onde a maior taxa de descoloração foi de 90 % em 3 dias. O suporte EPO, apresentou-se como adequado para a imobilização desta estirpe

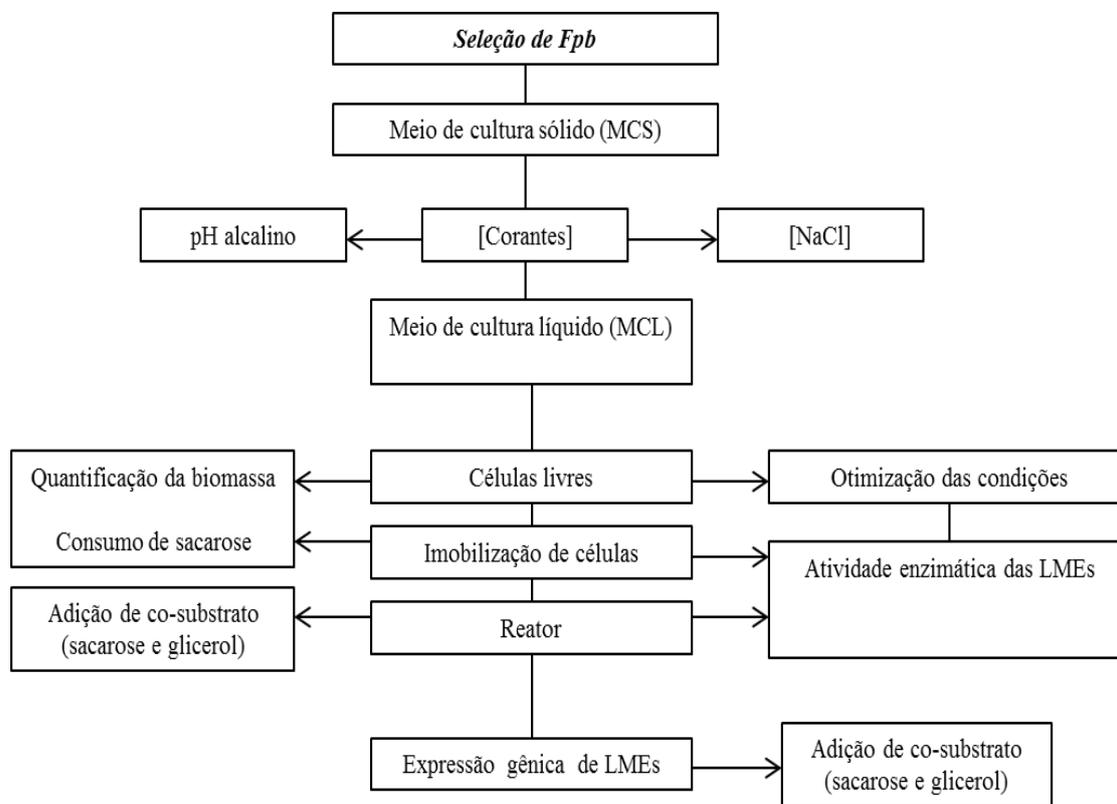
Um estudo desenvolvido por Casas *et al.* (2007) em biorreator de 1,5 l operado com biomassa fluidizada de *T. versicolor* proporcionou uma descoloração de 97 % do corante Laranja G em apenas 20 h. A atividade da enzima Lcc foi detectada entretanto, não houve detecção da atividade da enzima MnP.

A capacidade da estirpe *Trametes pubescens* em decolorir o corante RP5 (concentração 60 ppm) por quatro ciclos sucessivos em um reator de leito fixo, pH 4,5, foi relata por Enayatzamir *et al.* (2009b).

Baccar *et al.* (2011) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a capacidade de três diferentes estirpes de Fpb em descolorir o corante Preto Dycem TTO utilizado na indústria de curtume. Os melhores resultados de descoloração foram obtidos com a estirpe *T. versicolor*. A estirpe *T. versicolor* apresentou uma taxa de descoloração de 94 % em Erlenmeyers sob agitação e 86 a 89 % em bioreator de ar pulsado com reuso de biomassa. Neste estudo contatou-se que a enzima Lcc foi a principal responsável principal na descoloração do corante, mesmo quando detectada em baixa atividade.

## 2.9. Etapas da investigação

Considerando toda a informação descrita neste capítulo, o presente trabalho seguiu a estratégia apresentada no fluxograma da Figura 2.7.



**Figura 2.7.** Fluxograma das etapas de investigação do presente trabalho.

Como indicado no fluxograma, e como será descrito pormenorizadamente no Capítulo 3, os ensaios incidiram sobre as várias possibilidades para o tratamento de efluentes contaminados com o corante azo RP5, visando uma otimização do processo. Assim, foram feitos ensaios que permitiram a seleção de Fpb mais adequadas ao processo, bem como o estudo das características do substrato, nomeadamente no que se refere ao pH e a salinidade. Posteriormente, foram feitos ensaios em reatores de modo a verificar quais as condições onde se obtinham resultados mais significativos, levando em consideração o tipo de reator, o tipo de substrato e as características do inóculo (células livre ou células imobilizadas). A expressão gênica de LME's também foi realizada de modo a otimizar e maximizar as condições para a produção das enzimas responsáveis pela degradação de corantes.

---

## **Capítulo 3** *Materiais e Métodos*

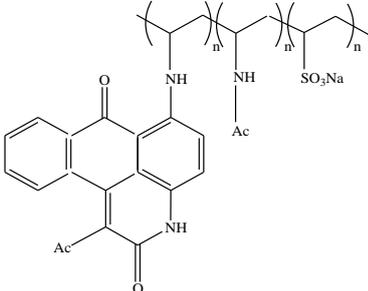
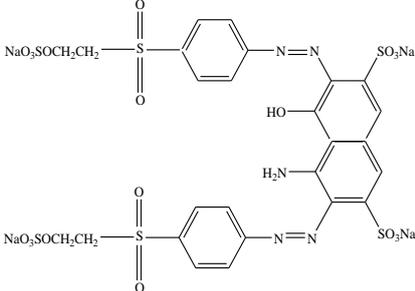
---



### 3.1. Corantes têxteis

Os corantes Poli-R478 (PR478) e Reativo Preto 5 (RP5) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Informações referentes aos corantes são fornecidas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Características gerais dos corantes utilizados neste estudo.

Características	Poli-R478	Reativo Preto 5
Nome e número (CAS)	Poli R-478 (68550-77-6)	Reativo Preto 5 (17095-24-8)
Nome e número (CI)	-	Reativo Preto 5 (20505)
Nome comercial	Poli R-478	Reativo Preto 5/Remazol Preto B
Sinônimo	-	Remazol Preto B
Abreviação	PR478	RP5
Cor	Rosa	Azul
$\lambda_{\text{máx}}$	523 nm	592 nm
Grupo cromóforo	Antraquinona	Diazo
Fórmula molecular	ND	$C_{26}H_{21}N_5Na_4O_{19}S_6$
Peso molecular	$40000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$991,82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Estrutura química		

CAS (*Chemical Abstracts Service*) = número atribuído a cada produto químico descrito na literatura.

CI (*Colour Index*) = número atribuído em função da classe química ou aplicação, a que o corante ou pigmento pertencem.

$\lambda_{\text{máx}}$  = comprimento de onda máximo de absorvância.

ND = não definido.

## 3.2. Microrganismos e meios de cultura

### 3.2.1. Microrganismos

Doze estirpes de fungos ligninolíticos da podridão branca da madeira (Fpb), provenientes da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal), foram selecionadas (Tabela 3.2). A manutenção da viabilidade dos microrganismos foi realizada em placas de TWA-celulose, sendo mantidas a 4 °C e com renovação das culturas mensalmente.

**Tabela 3.2.** Fungos selecionados para o estudo.

Estirpes	
<i>Bjerkandera adusta</i>	MUM 99.04
<i>Fomes fomentarius</i>	MUM 04.102
<i>Ganoderma applanatum</i>	MUM 04.103
<i>Irpex lacteus</i>	MUM 98.04
<i>Pleurotus ostreatus</i>	MUM 94.08
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MUM 94.15 (ATCC 24725)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MUM 95.01
<i>Trametes versicolor</i>	MUM 94.04
<i>Trametes versicolor</i>	MUM 04.100
<i>Trametes versicolor</i>	MUM 04.101
<i>Trametes versicolor</i>	MUM 04.104
<i>Trametes versicolor</i>	MUM 04.105

### 3.2.2. Meios de cultura

#### 3.2.2.1. Meio agarizado de água da torneira com celulose (TWA-celulose)

Composição final (por litro de água da torneira): agar (15,0 g). O meio foi autoclavado por 15 min à temperatura de 121 °C e 1 bar. Durante o plaqueamento do meio, incorporou-se como fonte de carbono uma tira de papel de filtro estéril de 1 cm<sup>2</sup> ao centro da placa.

### **3.2.2.2. Meio de pré-adaptação (MPA)**

Composição final (por litro): sulfato de amônio (0,5 g), sacarose (5,0 g), base nitrogenada de levedura (YNB) sem aminoácidos (1,70 g), L-asparagina (1,0 g), agar (15,0 g), PR478 ou RP5 (0,05-0,20 g). A adição de NaCl (entre 5,0 a 20,0 g) ao meio ocorreu somente em situações pontuais e serão mencionadas ao longo do texto. A esterilização de sulfato de amônio, sacarose, agar e cloreto de sódio foi realizada em autoclave a 121 °C e 1 bar durante 15 min.

As soluções estoque de: YNB (10 ×), L-asparagina (10 ×) e de cada corante (100 ×) foram previamente preparadas em água desionizada e, posteriormente, filtradas em filtro estéril Millipore de 0,45µm.

O ajuste do pH (8,0-10,0) foi efetuado com adição de NaOH (10 M) e ocorreu anteriormente à esterilização, com o auxílio de um medidor de pH (WTW pH 526).

Os meios de cultura sólidos (MCS) e meios de cultura líquidos (MCL) possuíam, respectivamente, a mesma composição que os meios MPA e MPA com ausência de agar.

### **3.2.2.3. Meio de extrato de malte, glicose, extrato de levedura e peptona (MGLP)**

Composição final (por litro): extrato de malte (3,0 g), glicose (10,0 g), extrato de levedura (3,0 g) e peptona (5,0 g), autoclavado por 15 min à temperatura de 121 °C e 1 bar.

### **3.2.3. Inóculo**

O procedimento padrão para a obtenção do inóculo em forma de discos foi realizado com o auxílio de um fura rolhas estéril de 8 mm de diâmetro. Assim, um disco retirado da área periférica da colônia, crescida em placa de TWA-celulose, foi colocado no centro de uma placa de 90 mm com meio de pré-adaptação (MPA), cuja composição foi idêntica a cada condição de estudo. Estas placas de MPA foram incubadas por um período de 7 dias à temperatura de 30 °C e, então, utilizadas para obtenção de novos discos como fonte de inóculo para os ensaios realizados ao longo deste trabalho.

### 3.3. Suportes sintéticos

#### 3.3.1. Espuma de poliuretano (EPO) e esponja de “nylon” (EN)

Dois suportes sintéticos foram usados neste trabalho: espuma de poliuretano (EPO) e esponja de “nylon” (EN), fornecido pela empresa (Scotch Brite, 3M Espanha, SA). O pré-tratamento da EPO ocorreu conforme o método de Rodríguez Couto *et al.* (2004). Cubos desta espuma ( $1\text{ cm}^3$ ) foram lavados uma vez em metanol (P.A.) e duas vezes em água destilada esterilizada. Após o término deste procedimento, os cubos secaram à temperatura ambiente, por 24 h. Para o pré-tratamento da EN, o método usado foi adaptado de Gupta e Kar (2008). Cubos da esponja ( $1\text{ cm}^3$ ) foram lavados em água destilada por duas vezes e, posteriormente, transferidos (10,0 g) para Erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 100 ml de água destilada. Depois de autoclavados (121 °C, 1 bar, durante 15 min) foram secos numa estufa a 60 °C, por 24 h.

#### 3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A observação da estrutura morfológica dos suportes escolhidos para imobilização celular, assim como a colonização efetuada pelo micélio fúngico, foi feita por MEV, num microscópio (Leica/Cambridge) S360. As amostras com fungo aderido foram lavadas por duas vezes em água destilada para retirar o possível excesso de micélio. A seguir, as amostras foram desidratadas por sucessivas lavagens em crescentes concentrações de soluções aquosas de etanol e finalmente etanol puro (10, 30, 60, 70, 100 %) armazenadas num dessecador até ao momento da análise. As amostras foram revestidas com ouro antes da observação microscópica.

### 3.4. Métodos analíticos

#### 3.4.1. Quantificação dos corantes

A concentração de cada corante foi determinada por espectrofotometria de UV-visível entre (200-900 nm) pelo decréscimo da intensidade da banda de absorção no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). Utilizou-se um espectrofotômetro UV/VIS Jasco V-560, onde os espectros foram obtidos pela análise de 5 ml do sobrenadante das amostras. O valor de absorvância obtido em MCL contendo a concentração inicial de cada corante correspondeu a 100 %. Diante da variabilidade de valores de pH em que o

trabalho foi delineado, foram construídas curvas padrão em todas as concentrações de realização dos ensaios.

### **3.4.2. Quantificação da biomassa**

A biomassa foi filtrada a vácuo utilizando-se um filtro Millipore 0,45 µm, previamente seco em estufa a 105 °C e pesado. A concentração da biomassa foi então determinada através da diferença do valor do respectivo peso seco depois de filtrada neste filtro e seca por 24 h em estufa a 105 °C.

### **3.4.3. Quantificação da sacarose**

A concentração de sacarose existente no meio de cultura líquida (MCL) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)-JASCO. As condições analíticas usadas envolveram um fluxo de 0,7 ml·min<sup>-1</sup> de uma solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,005 M como fase móvel, numa coluna MetaCarb 67H (300 x 6,5 mm) à temperatura de 60 °C e por um detector *Refractive Index Detector* (JASCO RI 830). O volume de amostra injetado para análise foi de 20 µl. Para obter a concentração de sacarose, a curva padrão foi construída com o mesmo açúcar e a concentração inicial foi igual à do MCL correspondente a 100 %.

### **3.4.4. Quantificação das atividades enzimáticas**

Os ensaios enzimáticos foram efetuados colorimetricamente à temperatura ambiente, utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS Jasco 560. Excepcionalmente, no caso do ensaio da LiP usou-se um espectrofotômetro rainbow Biotech Sinergy HT ELISA seguindo-se um procedimento miniaturizado em placas de 96 poços. Em cada ensaio enzimático a mesma mistura reacional, contendo as amostras fervidas, foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de causar uma alteração de absorvância de 0,01 por minuto, sob as condições do respectivo ensaio.

#### **3.4.4.1. Lacase (Lcc)**

A atividade da Lcc (EC 1.10.3.2) foi determinada através da oxidação de seringaldazina (Givaudan *et al.*, 1993) pelo aumento da absorvância a 525 nm. A reação ocorreu a partir da mistura de: 10 µl de sobrenadante das amostras recolhidas, 90 µl de solução de seringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído azina, Sigma) a 0,11 mM em etanol absoluto (Merck) e 200 µl de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenosfosfato de sódio de pH 6,0.

#### **3.4.4.2. Manganês Peroxidase (MnP)**

A atividade de MnP (E.C. 1.11.1.13) foi determinada através da oxidação de MBTH (3-metil-2-benzotiazolina hidrazona, Sigma) pelo aumento da absorvância a 590 nm (Castillo *et al.*, 1994). A reação ocorreu a partir da mistura de: 10 µl de sobrenadante das amostras recolhidas, 10 µl de uma solução 0,23 g·l<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio a 30 % (Merck), 120 µl de solução aquosa de MBTH a 0,07 mM, 10 µl de solução aquosa de manganês (Merck) a 0,3 mM e 150 µl de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio de pH 4,4.

#### **3.4.4.3. Lenhina peroxidase (LiP)**

A atividade de LiP (EC 1.11.1.14) foi determinada através da oxidação do álcool veratrílico, pelo aumento da absorvância a 310 nm (Tien e Kirk, 1984). A reação ocorreu a partir da mistura de: 1 ml de sobrenadante das amostras recolhidas, 0,33 ml de solução aquosa de álcool veratrílico (3,4-dimetoxi-benziálcool, Sigma-Aldrich) a 2 mM, 0,33 ml de uma solução 0,15 g·l<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio (Merck) e 1,34 ml de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio de pH 4,4.

#### **3.4.4.4. Glioxaloxidase (GLOX)**

A atividade da GLOX (EC 1.2.3.5) foi determinada através da oxidação da metilglioxal (Kersten e Kirk, 1987) pelo aumento da absorvância a 436 nm. A reação ocorreu a partir da mistura de: 10 µl de sobrenadante das amostras recolhidas, 10 µl de solução estoque (100x) de guaiacol (Sigma-Aldrich) a 2,8 mM, 10 µl de solução de peroxidase (Merck) a 1 mg·l<sup>-1</sup>, 50 µl de metilglioxal (acetilformaldeído, Sigma) e 120 µl de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio de pH 6,0.

#### **3.4.4.5. Proteases**

A atividade das proteases (EC 3.4.) foi determinada através da hidrólise de azoproteína (Sarath *et al.*, 1989) pelo aumento da absorvância a 440 nm. A reação ocorreu a partir da mistura de: 10 µl de sobrenadante das amostras recolhidas, 30 µl de uma solução de azoproteína (azoalbumina-ácido sulfanílico, Sigma) a 2 % e 100 µl de uma solução de ácido tricloroacético (TCA, Riedel-de-Häen) a 10 % em 160 µl de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio a 90 mM a pH 6,0.

#### **3.4.4.6. Detecção da atividade das fenoloxidasas - Teste de Scháněl**

A detecção da atividade das fenoloxidasas (EC 1.10) extracelulares foi baseada na aplicação do teste qualitativo de Scháněl (1967). A reação ocorreu a partir da mistura de: 1 ml de sobrenadante das amostras recolhidas, 1 ml de solução de hidroquinona (Merck) a 0,01 M, 1 ml de glicina (Merck) a 0,2 M e 2 ml de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio a pH 5,6. Depois de agitação vigorosa e obtenção de coloração intensa, procedeu-se ao registro final dos resultados. Nos casos onde se verificaram ausência ou baixa intensidade de cor, a solução permaneceu a 30 °C durante 24 h.

### **3.5. Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos**

#### **3.5.1. Rastreio para a seleção de estirpes**

As estirpes de Fpb (Tabela 3.2) foram inicialmente avaliadas quanto à capacidade de decoloração dos corantes RP5 e PR478 em MCS. As placas com os MCS foram incubadas por um período de 14 dias a 30 C. Durante este período, foram efetuados registros diários do diâmetro de crescimento, diâmetro de decoloração e intensidade de decoloração.

#### **3.5.2. Decoloração dos corantes em Erlenmeyers sob agitação**

As estirpes de Fpb que apresentaram os melhores desempenhos em MCS foram avaliadas em MCL com os dois corantes RP5 e PR478 numa concentração de 0,1 g·l<sup>-1</sup>. Erlenmeyers de 250 ml de capacidade com 100 ml de MCL, sob agitação de 150 rpm e

a 30 °C, foram inoculados com 5 cilindros de 8 mm de diâmetro retirados da periferia do respectivo MPA (Secção 3.2.2.2), após 7 dias de incubação.

A concentração dos corantes, a formação de biomassa e o consumo de sacarose foram determinados a partir do tempo zero pela recolha de amostras do MCL, sem NaCl na sua composição, nos dias 1, 3, 5 e 7 e com diferentes concentrações de NaCl na sua composição nos dias 7, 14, 21 e 28.

Os controlos foram efetuados a partir de Erlenmeyers esterilizados contendo: a) MCL com os corantes sem inóculo; b) MCL sem qualquer corante e c) MCL inoculado e autoclavado.

Os ensaios enzimáticos foram efetuados a partir das amostras recolhidas nos diferentes experimentos. Os sobrenadantes das referidas amostras foram congelados e mantidos a -20 °C para posteriores análises.

#### **3.5.2.1. Utilização da estirpe *Trametes versicolor* MUM 04.100 imobilizada na descoloração do corante RP5**

A quarenta e dois Erlenmeyers de 250 ml de capacidade foram vertidos 100 ml de MCL. Cinco cilindros de 8 mm de diâmetro, retirados da área periférica do MPA colonizado pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, foram adicionados a cada Erlenmeyer. Em ambas soluções as concentrações finais de RP5 e de NaCl foram de 0,1 e 15 g·l<sup>-1</sup>, respectivamente, e o pH do meio foi ajustado para 9,5. A cada Erlenmeyer foram adicionados 10 suportes cúbicos de EN ou de EPO, previamente esterilizados e pesados. As culturas permaneceram sob agitação de 150 rpm e a 30 °C por um período de 7 dias.

Após 7 dias de incubação os suportes de EN ou de EPO foram transferidos para um sistema de filtração estéril e lavados cuidadosamente com 150 ml de água destilada esterilizada para a remoção da biomassa não aderida aos suportes. De cada 10 suportes devidamente tratados, 5 foram secos em estufa a 120 °C por 8 h para a quantificação da biomassa aderida. Os outros 5 suportes foram adicionados a um novo MCL e incubados em Erlenmeyers sob as mesmas condições apresentadas acima.

Por um período de 7 dias, 3 Erlenmeyers foram retirados diariamente para que fossem procedidas a medida de adesão da biomassa aos suportes e, aos sobrenadantes, a medida da taxa de descoloração do meio de cultura, o consumo de sacarose e atividade enzimática.

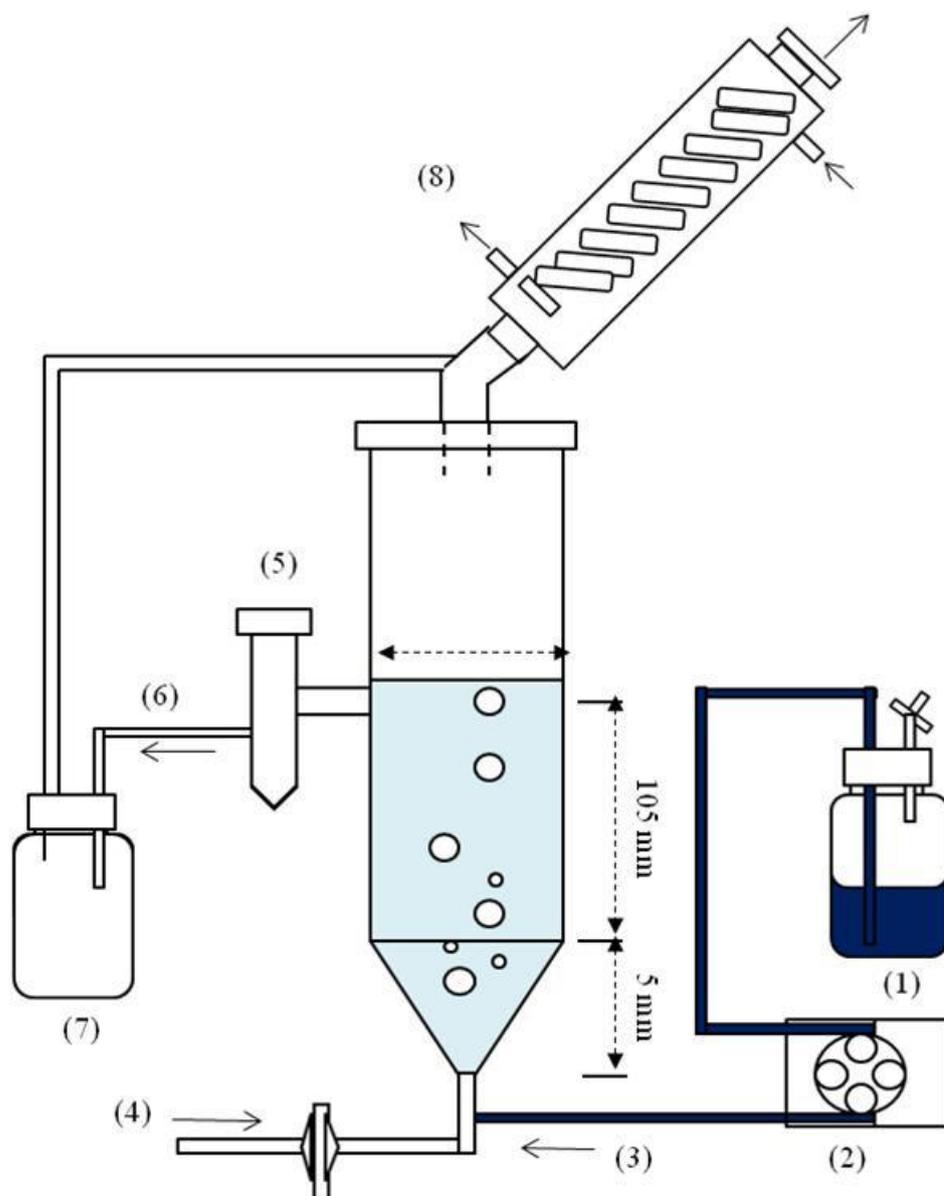
Um novo ensaio independente foi efetuado com os dois suportes. Iguais quantidades de cada suporte devidamente colonizados como referido acima, foram adicionadas a dois Erlenmeyers de 250 ml de capacidade com 100 ml do MCL de mesma composição ao ensaio anterior. A cada 3 dias os suportes foram transferidos para um novo MCL de igual composição. Neste caso e, a exemplo dos procedimentos analíticos apresentados acima, os ensaios para a medida de adesão da biomassa foram realizados com os suportes e a taxa de descoloração do meio de cultura, o consumo de sacarose e a atividade enzimática foram efetuados com o sobrenadante do MCL.

### **3.5.3. Utilização de diferentes reatores na descoloração do corante RP5**

#### **3.5.3.1. Reator contínuo de leito fixo**

Treze discos de MPA colonizados pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, incubados por 7 dias a 30 °C, foram transferidos para um frasco com tampa azul de 500 ml de capacidade (Labbox SBG3-500-010) contendo 260 ml de MCL. Os 13 discos foram incubados por um período de 9 dias no MCL em um agitador rotativo, sob agitação de 150 rpm e a 30 °C. Transcorrido este período, em ambiente asséptico, a biomassa foi filtrada a vácuo e transferida para um reator contínuo de leito fixo de 300 ml de capacidade (Figura 3.1), operado com um volume de 260 ml, à temperatura ambiente e assistido por uma bomba peristáltica. Neste reator a descoloração do RP5 foi estudada com células livres e imobilizadas da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100.

Para a imobilização das células foram usados 15 cubos de suportes de EN e EPO de 1 cm<sup>3</sup> de volume, de acordo com o procedimento apresentado na Tabela 3.3. O sistema foi continuamente agitado por arejamento. Após o término do período de carga, iniciou-se a introdução da solução de RP5 a um caudal fixo de 2,14 mg·dia<sup>-1</sup> (correspondente a uma taxa de diluição de 0,14 dia<sup>-1</sup>). O arejamento do reator foi estabelecido pelo grau de agitação do meio evitando a formação excessiva de espuma. Para os ensaios com células livres, a biomassa foi mantida dentro do reator, tendo sido feita purga quando necessário. A descoloração do RP5, o pH e as atividades enzimáticas foram avaliadas pela análise do sobrenadante. As condições de operação foram variadas em função de cada ensaio realizado, como sumarizado na Tabela 3.3.



**Figura 3.1.** Reator contínuo de leito fixo operado com células livres e imobilizadas: (1) alimentação, (2) bomba peristáltica, (3) entrada da alimentação, (4) entrada de ar, (5) retirada da amostra, (6) saída do descarte, (7) descarte, (8) condensador.

**Tabela 3.3.** Condições dos ensaios realizados em reator contínuo de leito fixo.

Ensaio	MCL	Composição da fonte de alimentação	<i>T.versicolor</i> MUM 04.100	Fonte de carbono	Informações complementares
1°	Seção 3.2.2.2	Solução de RP5 ajustada ao pH 10,0. Concentração final de RP5 no MCL: 0,1 g·l <sup>-1</sup> .	Células livres	Soluções de sacarose e glicerol. Concentração final de sacarose e glicerol no MCL: 5,0 g·l <sup>-1</sup> .	Após a inoculação no reator, o sistema permaneceu em “batch” até a completa descoloração do corante. Terminado este período, uma fonte de alimentação contínua, foi introduzida ao reator.
2°	Seção 3.2.2.2 (15 g·l <sup>-1</sup> de NaCl)	Solução de RP5 e NaCl ajustada ao pH 10,0. Concentração final de RP5 e de NaCl no MCL: 0,1 e 15 g·l <sup>-1</sup> , respectivamente.	Células livres	Soluções de sacarose e glicerol. Concentração final de sacarose e glicerol no MCL: 5,0 g·l <sup>-1</sup> .	Pulsos de sacarose e glicerol foram efetuados com o intuito de manter as funções metabólicas fúngicas por um período mais extenso, ocorrendo sempre que a taxa de descoloração foi igual ou inferior a 85%.
3°	Seção 3.2.2.2 (15 g·l <sup>-1</sup> de NaCl)	Solução de RP5 e NaCl ajustada ao pH 10,0. Concentração final de RP5 e de NaCl no MCL: 0,1 e 15 g·l <sup>-1</sup> , respectivamente.	Imobilizado em EPO	Soluções de sacarose e glicerol. Concentração final de sacarose e glicerol no MCL: 5,0 g·l <sup>-1</sup> .	
4°	Seção 3.2.2.2 (15 g·l <sup>-1</sup> de NaCl)	Solução de RP5 e NaCl ajustada ao pH 10,0. Concentração final de RP5 e de NaCl no MCL: 0,1 e 15 g·l <sup>-1</sup> , respectivamente.	Imobilizado em EN	Soluções de sacarose e glicerol. Concentração final de sacarose e glicerol no MCL: 5,0 g·l <sup>-1</sup> .	Os ensaios decorreram durante um período de 28 dias para células livres e 40 dias para células imobilizadas, sendo recolhidas amostras diariamente para monitorização do processo.

### 3.5.3.2. Reator agitado com capacidade de 2 litros (“*fed-batch*”)

Cinquenta cilindros de 8 mm de diâmetro colonizados pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 foram transferidos para um frasco com tampa azul de 2 l de capacidade (Labbox SBG3-2K0-001) contendo 1 l de MCL e incubados por 9 dias, sob agitação de 150 rpm a 30 °CC. Após este período de incubação, o material foi filtrado em condições estéreis e a biomassa transferida para o reator agitado de bancada.

No reator agitado de bancada com capacidade de 2 l (Biongeering AG, CH-8636 Wald, Switzerland) foram realizados dois ensaios independentes. Este reator foi operado com um volume de 1 l de MCL (Seção 3.2.2.2), ajustado a diferentes valores de pH numa escala de 8,0 a 9,5, pela adição automática de solução aquosa de NaOH a 30 %. O ajuste do pH foi realizado em função da capacidade de descoloração do corante RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100. Em ambos ensaios a concentração do corante foi de 0,1 g·l<sup>-1</sup>. Contudo, apenas no segundo ensaio fez-se adição de NaCl (15 g·l<sup>-1</sup>) ao MCL.

Em ambos ensaios o reator foi envolvido por um cilindro de vidro que permitiu a circulação de água de aquecimento, mantendo sob agitação de 150 rpm, a 30 °C. O tempo total de cultivo foi de 7 dias e duas vezes ao dia retiraram-se amostras para análises. A formação de espuma foi controlada através da adição de 0,5 ml de dimetilpolisiloxano, quando necessário.

Durante o tempo de fermentação, foram adicionados ao reator pulsos da solução do corante e de sacarose de acordo com atividade metabólica apresentada pelo microrganismo. A concentração final dos pulsos foi mantida igual àquela usada no meio de cultivo. Finalmente, as amostras foram analisadas quanto à taxa de descoloração, consumo de sacarose e atividades enzimáticas.

### 3.6. Efeito da influência do pH e de diferentes fontes de carbono na expressão gênica da lacase em *T. versicolor* MUM 04.100

#### 3.6.1. Isolamento do DNA genômico

A extração do DNA genômico de *T. versicolor* MUM 04.100 decorreu utilizando-se micélio congelado conforme o método de Raeder e Broda (1985). Após o crescimento fúngico em meio líquido MGLP (Seção 3.2.2.3) por 120 h, o micélio foi coletado e transferido para um almofariz, no qual foi congelado por duas vezes em nitrogênio líquido e triturado até à obtenção de um pó fino. Aproximadamente 1 g de biomassa foi transferido para um tubo de centrifugação estéril de 50 ml de capacidade. Na sequência, foram adicionados ao tubo de centrifugação 5 ml de tampão de extração de composição: Tris-HCl a 50 mM, pH 8.0, EDTA a 100 mM, NaCl a 100 mM, SDS a 1 % (p/v) e Proteinase K na concentração final de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a mistura foi então incubada por 3 h a 50 °C. Decorrido este tempo, a amostra foi centrifugada (Centrífuga, Sigma 4K15) a 10000 g durante 20 min. A cada microtubo de capacidade de 1,5 ml, foram adicionados os volumes de 500  $\mu\text{l}$  do sobrenadante. Um volume igual de fenol foi adicionado a estas amostras, tendo sido incubadas à temperatura ambiente por 30 min. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (Microcentrífuga, Sigma 112) a 10000 g durante 15 min e transferidas para microtubos estéreis de 1,5 ml.

As amostras foram então incubadas em solução de fenol/clorofórmio (350  $\mu\text{l}$ :150  $\mu\text{l}$ ) a temperatura ambiente por 10 min e centrifugadas a 10000 g durante 1 h. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 ml de capacidade e foram extraídos pela adição de igual volume de clorofórmio, após a incubação à temperatura ambiente por 10 min. Finalizado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 15 min. As fases aquosas foram transferidas para microtubos de 1,5 ml de capacidade, seguido da adição de 0,54 volumes de etanol a 4 °C. As misturas foram incubadas a - 20 °C por 15 min e centrifugadas a 10000 g durante 15 min. A fase líquida foi removida e o sedimento foi ressuspensão em uma solução de etanol/acetato de sódio 70:30 (v/v). As misturas foram incubadas durante a noite a - 80 °C. Após centrifugação a 10000 g durante 30 min, os sobrenadantes foram removidos e o sedimento lavado com uma solução aquosa de etanol (70 %) a 4 °C e centrifugado novamente a 10000 g durante 15 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi seco ao ar livre. Finalmente, o sedimento foi então ressuspensão num volume adequado de água MilliQ estéril.

### 3.6.2. Desenho dos primers

Os oligonucleotídeos foram desenhados por nós, com base na análise das sequências da Lacase (Y18012.1) e da  $\beta$ -Tubulina (AY944858.1) publicadas no GenBank para fungo da espécie *T. versicolor*. Uma solução estoque de  $100 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$  de concentração dos primers liofilizados foi preparada em água estéril. Aliquotas de  $100 \text{ }\mu\text{l}$  de soluções de trabalho numa concentração de  $10 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$  foram mantidas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  durante a realização dos trabalhos. As demais soluções dos primers foram armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os primers desenhados e usados neste trabalho, estão apresentados na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4.** Primers desenhados de *T. versicolor* MUM 04.100.

Sequências 5' → 3'	Foward (F)	Reverse (R)
Lacase (Lcc)	ATGTCGAGGTTTCACTCTCTTC	GCGACCCGAGCGACCAGTAA
Lignina peroxidase (LiP)	ATGGCTTTCAAGTCTCTCTTTC	CCGCCGTCGCCCCCGTGTA
Manganês peroxidase (MnP)	ATGGCGTTCAAGCTCCTGGC	CCCCTGTCCCCCTTCTTAA
$\beta$ -Tubulina	CGGTGAGAGGCGTCGGACAC	CATTGGTACACGCAGGAGGG

### 3.6.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram efetuadas reações de PCR em diferentes condições em termociclador (Bio-Rad, MyCycler), consoante o objetivo e os primers escolhidos. As reações PCR foram realizadas num volume de  $50 \text{ }\mu\text{l}$  contendo:  $0,5 \text{ }\mu\text{l}$  do DNA de *T. versicolor* a  $97 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (Seção 3.6.1),  $1 \text{ }\mu\text{l}$  de nucleotídeos a  $200 \text{ }\mu\text{M}$  (dNTP, Promega),  $3 \text{ }\mu\text{l}$  de solução de  $\text{MgCl}_2$  a  $25\text{mM}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{l}$  de tampão GoTaq Flexi (10x),  $1 \text{ }\mu\text{l}$  de cada par de primers a  $10 \text{ }\mu\text{M}$  (Tabela 3.4),  $0,25 \text{ }\mu\text{l}$  da enzima Polymerase Hot Start GOTAQ (Promega) e água MilliQ para perfazer o volume final de  $50 \text{ }\mu\text{l}$ . Os parâmetros utilizados para a reação de PCR estão condensados e descritos na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Parâmetros usados para a reação de PCR.

Número de ciclos	Passo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94 °C	2 min
35	Desnaturação	94 °C	45 s
	Hibridização	*---°C	30 s
	Extensão	72 °C	2 min. (1kb 60s <sup>-1</sup> )
1	Extensão final	72 °C	4 min
1	Conservação	4 °C	∞

\*Temperaturas (°C) avaliadas para: Lcc = 45, 47, 48, 52, 53, 54, 55 e 58; LiP: 50, 52, 57 e 58; MnP = 45; β-Tubulina = 47.

### 3.6.3.1. Eletroforese em gel de agarose para DNA

Dependendo do tamanho do fragmento de DNA que foi isolado, ou analisado, um gel de eletroforese foi preparado numa concentração de agarose entre 0,7 - 2,0 % (p/v) em solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE, 1 ×). A solução estoque do tampão TAE (50 ×) têm a seguinte composição: Tris-base a 2M, ácido acético glacial a 2M, EDTA a 50mM e ajustado a pH 8,0. Salvo indicações contrárias, os géis foram acrescidos de 5 µl de EtBr (1 mg·ml<sup>-1</sup>) por 50 ml de agarose fundida. A eletroforese foi realizada de acordo com as condições descritas por Sambrook *et al.* (1989). Antes do carregamento, para cada 8 µl das amostras de DNA, foram adicionados 2 µl do corante de carregamento 6x concentrado, composto por: azul de bromofenol a 0,25 % (p/v), xilencianol a 0,25 % (p/v) e sacarose a 40 % (p/v) em H<sub>2</sub>O. Num dos poços do gel foram adicionados 5 µl do marcador (Quick-Load 2-Log DNA Ladder, 100 pb a 10 kb) e as amostras de eletroforese foram fotodocumentadas em um aparelho Gel Doc XR System (Bio-Rad).

### 3.6.3.2. Isolamento e sequenciamento

Para o isolamento das sequências de interesse foi corrido um mini-gel de agarose a 2,0 % (Seção 3.6.3.1.) com corrente a 80 V. Visualizou-se a banda de interesse em transiluminador. A banda foi cortada e purificada com o Kit Qiaquick gel extraction (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.6.3.3. Sequenciamento do DNA, análise da sequência, modelagem molecular e bioinformática**

O sequenciamento dos genes foi realizado pela Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemanha. A análise das sequências foi realizada utilizando Entrez (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Os dados da sequência foram alinhados e comparados utilizando os programas BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local). O ClustalW foi usado para criar alinhamentos de sequências múltiplas ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)).

## **3.7. Isolamento do RNA genômico**

Cinco discos de 8 mm de diâmetro de MPA, colonizados por *T. versicolor* MUM 04.100, foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 ml de capacidade contendo 100 ml de MGLP previamente incubados por um período de 5 dias a 150 rpm 30 °C. A biomassa foi separada e lavada cuidadosamente, por filtração a vácuo e em condições estéreis, por três vezes com 150 ml água estéril. A biomassa foi então transferida para um Erlenmeyer que continha 100 ml do MCL (Seção 3.2.2.2) sem ajuste de pH e também ajustado a pH 9,5. Com o intuito de verificar o efeito indutor de diferentes fontes de carbono na expressão das enzimas do sistema ligninolítico, efetuou-se o mesmo procedimento para obtenção de biomassa e alterou-se a fonte de carbono do MCL para glicose ou glicerol. Adicionalmente, efetuou-se o mesmo procedimento com MCL sem fonte de carbono em sua composição. A biomassa foi então incubada pelo período de 48, 72, 96, 120 e 144 h, a 150 rpm 30 °C.

### **3.7.1. Tratamento para eliminação das nucleases**

Todos os utensílios de vidro, assim como todas as soluções foram previamente tratados com a diluição de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1 % (v/v) em H<sub>2</sub>O MilliQ estéril. Tanto os materiais quanto as soluções ficaram em repouso durante a noite e no dia seguinte foram autoclavados para inativar o DEPC.

### **3.7.2. Extração do RNA fúngico**

Após o crescimento da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em diferentes substratos indutores (glicose, sacarose e glicerol) em tempos distintos (48, 72, 96, 120 e 144 h),

fez-se a extração do RNA total utilizando-se o micélio correspondente a cada condição e tempo de cultivo.

O micélio foi filtrado em gaze estéril e transferido para um almofariz, sendo convertido em pó por maceração na presença de nitrogênio líquido. A biomassa foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 50 ml de capacidade. Na sequência, foi adicionado ao tubo de centrifugação, 10 ml de uma solução de tiocianato de guanidina a pH 7,0 (tiocianato de guanidina a 4 M, citrato de sódio a 25 mM, sarcosil a 0,5 % (p/v) e EDTA a 0,5 mM) e agitou-se por 5 min. Posteriormente, adicionou-se 72 µl de 2-mercaptoetanol a 14,3 M à mistura anterior, obtendo-se uma concentração final de 0,1 M de 2-mercaptoetanol para o volume de solução de tiocianato de guanidina utilizado. Após a homogeneização, a mistura foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 50 ml de capacidade no qual foram adicionadas soluções na seguinte sequência: 1 ml de NaOAc a 2 M, 10 ml de tampão saturado de fenol, 2 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

A cada adição de um reagente à mistura efetuou-se uma agitação branda e, no final deste processo, agitou-se o meio vigorosamente por 1 min. A mistura foi então incubada em gelo por 25 min e centrifugada a 10000 g durante 20 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 50 ml de capacidade e a seguir adicionou-se isopropanol em volume igual à da fase aquosa. A solução foi deixada por 1 h a - 80 °C e então centrifugada a 10000 g durante 20 min a 4 °C. O sedimento foi lavado por agitação em vórtex com etanol a 70 % e centrifugado a 10000 g durante 10 min a 4 °C.

Ressuspendeu-se o sedimento obtido em 3 ml de solução de cloreto de lítio de composição: (cloreto de lítio a 3 M, uréia a 6 M, EDTA a 1 mM, pH 7,6) por grama de micélio. A suspensão obtida foi agitada vigorosamente por 1 min em vórtex e então mantida em movimento constante em superfície móvel a 40 rpm por 3 h, a 4 °C. Centrifugou-se a suspensão a 10000 g durante 10 min a 4 °C. Decorrido este período, o sedimento foi cuidadosamente umedecido com 1 ml da solução de cloreto de lítio. A adição de 1 ml de etanol a 70 % ao sedimento ocorreu por duas vezes, onde primeiramente agitou-se vigorosamente por 1 min em vórtex e centrifugou-se a suspensão a 10000 g por 10 min a 4 °C.

O sedimento foi dissolvido em 1,5 ml da solução tampão Tris-EDTA (TE, Tris-HCl a 1 M; EDTA a 0,5 M, pH 8,0)/SDS a 0,5 % (p/v) ajustada a pH 7,6 e agitado em vórtex por 1 min. Em microtubos estéreis de capacidade de 1,5 ml, foi adicionado o volume

750 µl da suspensão. As amostras foram mantidas em movimento constante em superfície móvel a 40 rpm por 20 min a 4 °C.

Descartou-se o sobrenadante e, ao sedimento, foram adicionados 750 µl de clorofórmio e igual volume de fenol. A mistura foi mantida em movimento constante em superfície móvel a 40 rpm por 15 min, em temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,05 volumes de cloreto de sódio a 4 M foi adicionada e a solução foi agitada por 2 min em vórtex seguida por centrifugação em microcentrífuga a 14000 g durante 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi então extraída com um volume igual de clorofórmio e, em seguida, incubada com isopropanol durante a noite a - 20 °C. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 14000 g durante 10 min. O sedimento foi lavado com solução aquosa de etanol a 70 % (v/v) sob agitação em vórtex e centrifugado a 14000 g durante 10 min a 4 °C. O sedimento voltou a ser lavado com etanol P.A. e centrifugado a 14000 g por 10 min a 4 °C. O sedimento foi finalmente seco à temperatura ambiente por 10 min e ressuspenso em um volume adequado de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril, previamente tratada com DEPC.

A quantificação das amostras de DNA e RNA foi obtida por espectrofotometria (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) em uma relação de absorvância entre 260 e 280 nm.

A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em mini-gel de agarose a 0,8 % (p/v) com composição como descrito na Seção 3.6.3.1. Os poços foram carregados com 10 µl de uma mistura de: 1 µl de amostras de RNA, 2 µl do corante de carregamento e 7 µl H<sub>2</sub>O tratada com DEPC. A eletroforese em gel ocorreu a 150 V por 10 min, em solução tampão TAE.

### **3.8. Sondas DIG**

Para a marcação da sonda de DNA por digoxigenina (DIG) esta foi adquirida da Roche, Londres, Reino Unido e o *kit* de síntese da sonda de PCR DIG foi adquirido da Roche, Mannheim, Alemanha. Em ambos os casos seguiram-se as instruções dos fabricantes.

### **3.9. Eletroforese com gel MOPS/Formaldeído de RNA**

A integridade das amostras dos RNA totais extraídos foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante com composição: 1,2 % de agarose (p/v), formaldeído 2,2 M,

1,0 × MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico a 20 mM, NaOAc a 5 mM, EDTA a 1 mM, pH 7,0), sendo realizada de acordo com as condições descritas por Sambrook *et al.* (1989).

As amostras foram preparadas da seguinte forma: 10 µg de RNA, solução de formamida a 50 % (v/v), formaldeído a 2,2 M e MOPS (0,5 ×) para um volume final de 20 µl. Todas as amostras foram desnaturadas à temperatura de 55 °C durante 15 min. A cada amostra foram adicionados 2 µl de corante de carregamento de composição descrita na Seção 3.6.3.1 e 2 µl de EtBr (1 mg·ml<sup>-1</sup>). A eletroforese do RNA foi efetuada em solução tampão MOPS (1 ×) a 80 V por 180 min. Os géis de agarose foram analisados no sistema Gel Doc XR System (Bio-Rad).

### **3.9.1. Northern blot**

Dez microgramas de RNA total do micélio de *T. versicolor* MUM 04.100 foram separados em gel de eletroforese específico (Seção 3.9). Uma imagem do gel foi capturada em fotografia pelo sistema Gel Doc XR System (Bio-Rad). O gel foi lavado quatro vezes em água tratada com DEPC. Foi utilizado vácuo *blotting*, de acordo com as instruções do fabricante, como método de transferência de RNA para uma membrana de “nylon” (Hybond N, Amersham Biosciences ) sem carga utilizando SSC (10 × - NaCl 1,5 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7,0) por 120 min, a uma pressão de 0,17 atm. As membranas foram incubadas a 80 °C por 30 min, a fim de fixar o RNA.

#### **3.9.1.1. Pré-hibridização**

A pré-hibridização da membrana Hybond N (Amersham Biosciences) foi realizada em tampão de pré-hibridização: SSC (5 ×), N-lauroylsarcosine a 0,1 % (p/v), SDS a 0,02 % (p/v), reagente bloqueador (Roche, Mannheim, Alemanha) a 1 % (p/v) num tubo de hibridização, posteriormente incubada a 68 °C por 30 min.

#### **3.9.1.2. Hibridização**

O tampão e as temperaturas de hibridização foram idênticas às descritas para as condições de pré-hibridização. As sondas de DNA marcadas com DIG (Seção 3.8), em concentração de 15 ng·ml<sup>-1</sup> de tampão, foram desnaturadas a 95 °C por 5 min. O volume

de tampão de hibridização utilizado foi de 2,5 ml por 100 cm<sup>2</sup> de filtro. A hibridização decorreu durante a noite com agitação constante em tubo de hibridização a 50 °C.

### **3.9.1.3. Lavagens pós-hibridização**

As membranas contendo RNA foram lavadas duas vezes à temperatura ambiente com SSC/SDS(2 ×) a 0,1 % (p/v) durante 5 min, seguido de duas lavagens com SSC/SDS (0,5 ×) a 0,1 % (p/v) por 15 min a 50 °C.

### **3.9.1.4. Detecção das bandas de hibridização**

Utilizando-se o kit NBT/BCIP Stock Solution (Roche, Mannheim, Alemanha), foram efetuados os procedimentos para a detecção das bandas de hibridização, de acordo com as recomendações do fabricante.

A membrana foi mergulhada por 1 min em 100 ml de solução tampão de lavagem composta de: ácido málico a 0,1 M, NaCl a 0,15 M, Tween 20 a 0,3 % (v/v) ajustada a pH 7,5. Posteriormente a membrana foi incubada durante 30 min em solução bloqueadora (1×). De seguida a membrana foi incubada por 30 min em 20 ml de uma solução de anticorpo Anti-Dig-AP de 1:10000 (75 mU·ml<sup>-1</sup>) em solução bloqueadora (1×). Na sequência, lavou-se a membrana por duas vezes durante 15 min com 100 ml de solução tampão de lavagem. Incubou-se então a membrana em 20 ml de solução tampão de detecção (Tris-HCl a 0,1 M, NaCl a 0,1 M, pH 9,5) durante 5 min. Todos os procedimentos anteriormente descritos ocorreram sobre agitação constante.

Por fim, a membrana foi incubada em um saco plástico com 10 ml de uma solução corante (1 comprimido em 10 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril) recém preparada na ausência de luz. O saco foi selado e a reação ocorreu em repouso e na ausência de luz por 16 h.

Transcorrido o período de incubação a reação foi interrompida com 50 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril desionizada.

### 3.10. Reação de transcriptase reversa de cadeia de polimerase (RT-PCR)

#### 3.10.1. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Na síntese do cDNA foram utilizados microtubos de 500 µl previamente tratados com DEPC, sendo adicionados aos mesmos, os componentes descritos na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6.** Componentes para síntese de cDNA.

Componentes	Volume (µl)
RNA total (5 µg)	X
Primer Oligo (dT) <sub>20</sub> (50 µM)	1
dNTP mix em pH neutro (10 µM)	1
Completar o volume para 10 µl com H <sub>2</sub> O MilliQ estéril desionizada tratada com DEPC	X

As misturas foram mantidas a 65 °C por 5 min e na sequência incubadas em gelo por 1 min. Uma breve centrifugação “*spin down*” foi efetuada. A cada microtubo adicionou-se 4 µl de solução tampão Thermo-X™ RT (5×, Invitrogen), 1 µl de Thermo-X™ RT (Invitrogen), 2 µl de EDTA a 50 mM e H<sub>2</sub>O MilliQ estéril desionizada e tratada com DEPC, até perfazer o volume de 20 µl. Após um *spin down* por centrifugação, a mistura foi incubada à uma temperatura de 60 °C por 30 min. A inativação da reação ocorreu a 90 °C por 5 min. O cDNA foi armazenado a - 20 °C, até a amplificação por PCR.

#### 3.10.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) segundo a Invitrogen

Os *primers* desenhados e utilizados para a Lacase e β-Tubulina encontram-se previamente descritos na Tabela 3.4.

As reações de PCR ocorreram em um termociclador (Bio-Rad, MyCycler). Em um microtubo de 500 µl previamente tratado com DEPC foram adicionados: 2 µl do cDNA das referidas amostras, 1 µl de nucleotídeos a 200 µM (dNTP, Promega), 3 µl de solução de MgCl<sub>2</sub> a 25mM, 10 µl Tampão GoTaq Flexi (10 ×), 1 µl de cada par de *primers*, 0,25 µl da enzima Polymerase Hot Start GOTAQ (Promega) e água Milli Q para perfazer o volume final de 50 µl. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 3.7.

**Tabela 3.7.** Parâmetros usados para a reação de PCR.

Número de ciclos	Passo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94 °C	2 min
35	Desnaturação	94 °C	45 s
	Hibridização	*---°C	30 s
	Extensão	72 °C	2 min.(1kb 60s <sup>-1</sup> )
1	Extensão final	72 °C	4 min
1	Conservação	4 °C	∞

\*Temperaturas ( °C): Lcc: 52, β-Tubulina: 47.

Um gel de eletroforese foi preparado em uma concentração de agarose a 1,0 % (p/v) de acordo com os procedimentos descritos anteriormente na Seção 3.6.3.1, A eletroforese dos produtos do PCR foi conduzida a 100 V por 40 min. Utilizando-se o aparelho Gel Doc XR System (Bio-Rad) foi possível visualizar o gel e fotodocumentar as imagens obtidas.

### 3.10.3. Quantificação dos níveis de expressão gênica

As análises para a quantificação dos níveis de expressão do gene de interesse foi realizada por densitometria. As imagens fotodocumentadas das ampliações foram tratadas com o auxílio do programa ImageJ 1.44f. Disponível em: <<http://www.macoxfreeware.com/imagej-1-44f-scriptable-java-app-for-scientific-image-processinganalysis/>>. Acesso em: 14 jun. 2011.

Os resultados obtidos por densitometria foram normalizados de acordo com a expressão do gene constitutivo β-Tubulina. Deste modo, foi possível estabelecer a razão entre a expressão gênica da Lacase em relação à β-Tubulina nas diferentes condições estudadas, sendo os resultados apresentados em unidades arbitrárias.

---

## **Capítulo 4** *Resultados*

---



## 4.1. Rastreio das estirpes na descoloração de corantes têxteis

### 4.1.1. Efeito da concentração dos corantes RP5 e PR478 na descoloração

Doze estirpes de Fpb da madeira (Tabela 3.2) foram selecionadas para o estudo da descoloração dos corantes têxteis PR478 e RP5 em meio de cultura sólido (MCS) de composição previamente descrita na Seção 3.2.2.2. A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos ao longo de 14 dias de incubação a 30 °C, para diferentes concentrações dos corantes adicionados ao meio de cultura sem o ajuste de pH.

As maiores taxas de descoloração para ambos corantes ocorreram quando os mesmos encontravam-se em uma concentração entre 0,05 e 0,1 g·l<sup>-1</sup>. As estirpes que apresentaram resultados de descoloração iguais ou superiores a 50 % na concentração de 0,1 g·l<sup>-1</sup> de corante foram: *Trametes versicolor* MUM 94.04, *Pleurotus ostreatus* MUM 94.08, *T. versicolor* MUM 04.100 e *T. versicolor* MUM 04.101 (para RP5); e: *T. versicolor* MUM 94.04, *Pleurotus ostreatus* MUM 94.08, *Phanerochaete chrysosporium* MUM 94.15, *T. versicolor* MUM 04.100, *T. versicolor* MUM 04.101 e *T. versicolor* MUM 04.105 para PR478.

Em MCS com qualquer um dos dois corantes selecionados, cuja concentração foi igual ou superior a 0,15 g·l<sup>-1</sup>, a descoloração não passou dos 25 %. Neste meio com RP5 ou PR478 na concentração de 0,2 g·l<sup>-1</sup> os únicos fungos lignolíticos que apresentaram crescimento em tais condições foram *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 01.100, MUM 01.101 e *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725), porém com ausência de descoloração.

Os parâmetros de seleção das estirpes capazes de descolorir tais corantes foram: (1) raio de crescimento; (2) descoloração; (3) intensidade de descoloração; e, (4) tempo de crescimento.

**Tabela 4.1.** Avaliação do efeito da concentração dos corantes RP5 e PR478 na descoloração por estirpes de Fpb.

Estirpes MUM	[RP5]												[PR478]											
	A				B				C				A				B				C			
	0,05				0,10				0,15				0,05				0,10				0,15			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>94.04</b>	90	90	++++	5	90	90	++++	7	90	90	+	11	90	90	++++	9	90	90	++++	7	90	90	+	13
<b>94.08</b>	90	90	++++	9	90	90	++	13	90	90	+	9	90	90	++	12	90	90	++	14	60	80	+	12
<b>94.15</b>	90	90	+++	8	50	70	+	12	60	70	+	8	90	90	++	13	90	90	++	12	90	90	+	14
<b>95.01</b>	90	90	++	8	-	-	-	-	-	-	-	-	85	90	+	10	75	-	-	14	55	-	-	-
<b>98.04</b>	90	90	+	12	90	90	+	12	50	70	+	14	90	90	+	14	90	90	+	9	35	65	+	14
<b>99.04</b>	60	80	+	11	40	-	-	-	-	-	-	-	70	85	++	10	50	70	+	14	25	-	-	-
<b>04.100</b>	90	90	++++	7	90	90	++++	7	90	90	+	12	90	90	++++	7	90	90	++++	7	30	50	+	14
<b>04.101</b>	90	90	+++	10	90	90	+++	10	90	90	+	14	90	90	++++	9	70	90	+++	12	80	90	+	14
<b>04.102</b>	80	90	++	9	50	-	-	-	-	-	-	-	75	85	+	14	60	-	-	14	65	70	+	12
<b>04.103</b>	40	60	+	14	20	-	-	-	-	-	-	-	80	90	+	12	30	-	-	14	80	-	-	-
<b>04.104</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90	90	++	14	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>04.105</b>	80	90	++	10	50	60	+	14	50	-	-	-	85	90	++	14	70	90	++	14	80	90	+	14

A, B e C: Concentração dos corantes ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 1. Diâmetro de crescimento em placas de Petri de 90 mm (mm); 2. Descoloração (mm); 3. Intensidade de descoloração (+ 25%; ++50%; +++75%; ++++ 100%); 4. Tempo de crescimento (dias); pH inicial do meio: RP5 (5,45) PR478 (6,74). Todos os resultados correspondem à média de duas réplicas.

## 4.1.2. Efeito do pH na descoloração dos corantes

### 4.1.2.1. Avaliação em meio de cultura sólido (MCS)

A Tabela 4.2 apresenta o conjunto de resultados obtidos da avaliação dos perfis das estirpes de Fpb com os corantes RP5 e PR478 nas mesmas condições experimentais descritas na Seção 4.1.1. Os MCS (Seção 3.2.2.2) foram previamente ajustados aos valores de pH 8,0-10,0 e avaliados por um período de 14 dias a 30 °C.

Na presença de RP5, mesmo nas condições de extrema alcalinidade (pH 10,0) as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram 100 % de descoloração e intensidade de descoloração. *P. chrysosporium* MUM 94.15 e *T. versicolor* MUM 04.101 obtiveram valores de descoloração superiores a 75 % em pH 8,0 e 9,0. Contudo, a intensidade da descoloração não ultrapassou 50 %. A pH 10,0 observou-se 33,3 % e 66,7 % de crescimento fúngico, com ausência de descoloração para *P. chrysosporium* MUM 94.15 e *T. versicolor* MUM 04.101, respectivamente.

A descoloração do PR478 ocorreu apenas na presença de *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 a pH 8,0. Neste caso a descoloração e a intensidade de descoloração foram de 100 %. Neste mesmo valor de pH, *T. versicolor* MUM 04.101 e MUM 94.15 apresentaram níveis de descoloração de 88,9 % e de 61,1 %, respectivamente. Contudo, a intensidade de descoloração não ultrapassou 50 % para *T. versicolor* MUM 04.101 e 25 % para *T. versicolor* MUM 94.15.

Ao contrário dos resultados obtidos para o corante RP5, no caso do PR478, o aumento do pH resultou na diminuição da capacidade descolorativa de todas as estirpes. Em condições alcalinas (pH 9,0) os melhores resultados encontrados foram para as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100, que atingiram o valor máximo de descoloração de 88,9 %. Por outro lado, a intensidade de descoloração foi reduzida a 50 %. Adicionalmente, a estirpe *T. versicolor* MUM 04.101 atingiu 66,7 % de descoloração com intensidade de descoloração de 50 % e a estirpe *T. versicolor* MUM 94.15 descoloriu PR478 em valores inferiores a 35 %. Neste último caso a intensidade desta descoloração não ultrapassou 25 %.

Tabela 4.2. Efeito do pH na descoloração dos corantes RP5 e PR478 por estirpes de Fpb.

Estirpe	RP5												PR478											
	pH 8,0				pH 9,0				pH 10,0				pH 8,0				pH 9,0				pH 10,0			
MUM	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>94.04</b>	90	90	++++	8	90	90	++++	8	90	90	++++	8	90	90	+++	9	70	80	++	10	50	75	++	12
<b>94.08</b>	60	-	-	14	50	-	-	13	50	-	-	12	55	80	+	14	30	-	-	14	-	-	-	-
<b>94.15</b>	70	80	++	14	60	65	+	14	30	-	-	14	40	55	+	14	20	30	+	14	-	-	-	-
<b>95.01</b>	50	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>98.04</b>	60	70	+	14	60	-	-	8	20	-	-	12	40	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>99.04</b>	30	50	+	14	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>04.100</b>	90	90	++++	9	90	90	++++	9	90	90	++++	9	90	90	+++	9	70	80	++	11	70	80	+	14
<b>04.101</b>	60	80	++	14	40	55	+	14	60	-	-	11	60	80	++	14	45	60	++	14	30	50	+	14
<b>04.102</b>	40	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>04.103</b>	10	-	-	10	20	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>04.104</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>04.105</b>	50	-	-	9	10	-	-	14	-	-	-	-	20	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-

1. Diâmetro de crescimento em placas de Petri de 90 (mm); 2. Descoloração (mm); 3. Intensidade de descoloração (+ 25%; ++50%; +++75%; ++++ 100%), 4. Tempo de crescimento (dias); Concentração dos corantes: 0,1g.l<sup>-1</sup>. Todos os resultados correspondem a média de duas réplicas.

A pH 10,0 apenas as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 04.100 e MUM 04.101 obtiveram uma taxa de descoloração superior a 75 %, porém a intensidade de descoloração não ultrapassou 50 %. Nestas condições, a estirpe *T. versicolor* MUM 94.15 (ATCC 24725) não apresentou viabilidade.

A estirpe *Phanerochaete chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725) não apresentou desempenho a níveis consideráveis quando avaliada em condições alcalinas. No entanto, a mesma foi mantida no passo seguinte de estudo, como estirpe de padrão comparativo.

Ao ser analisada a influência do pH alcalino e da concentração dos corantes em MCS, observou-se uma redução no número de estirpes promissoras na degradação dos corantes avaliados. Neste caso, as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 04.100 e MUM 04.101 apresentaram os melhores resultados para ambos os corantes, contudo a descoloração foi mais rápida quando utilizado RP5 em comparação ao PR478.

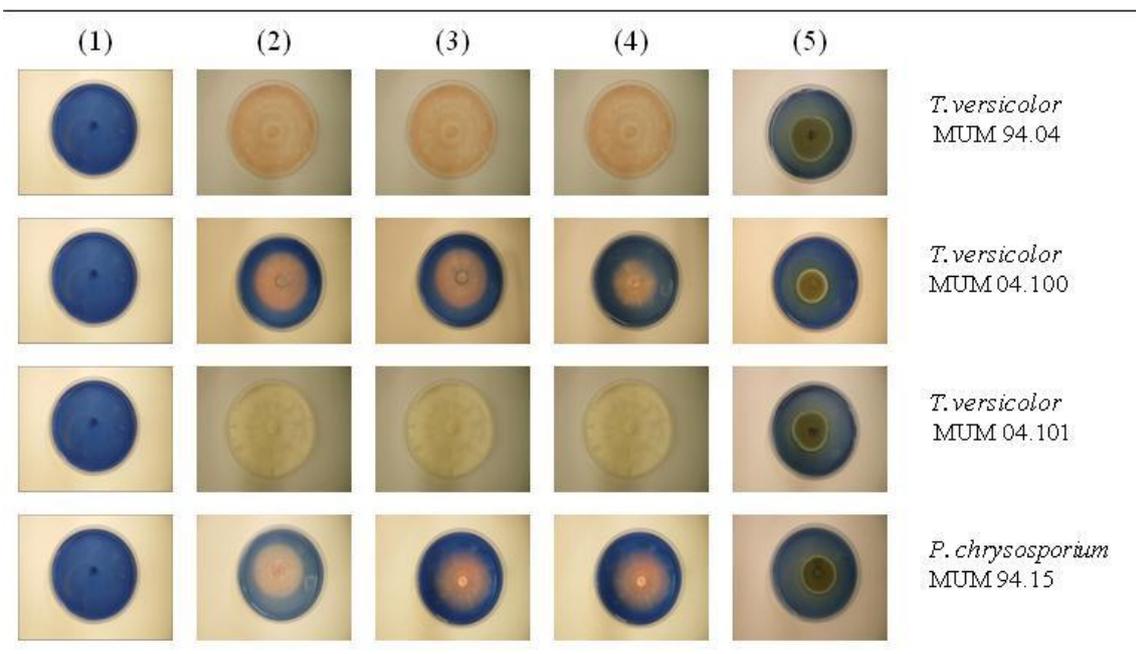
#### **4.1.3. Efeito da adição de NaCl ao meio alcalino na descoloração dos corantes**

Avaliou-se a eficiência das estirpes *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 04.100 e MUM 04.101 e *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725) na descoloração de PR478 e RP5, em diferentes concentrações de NaCl adicionadas ao MCS (Seção 3.2.2.2) em condições alcalinas, durante um período de 28 dias a 30 °C. Para este procedimento seguiram-se os mesmos critérios de avaliação adotados na Seção 4.1.1.

O corante RP5 foi completamente descolorido a pH 8,0 e concentração máxima de NaCl de 15 g·l<sup>-1</sup> pelas quatro estirpes selecionadas. Nestas condições, todas as estirpes apresentaram 100 % de descoloração num período de incubação de 9 a 14 dias. As intensidades de descoloração foram distintas entre as estirpes e superiores a 50 %. O aumento do pH para 9,0 restringiu o desempenho destes microrganismos. Neste caso *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 foram as únicas estirpes a apresentar 100 % de descoloração. A intensidade de descoloração foi distinta em função de cada estirpe, tendo sido igual ou superior a 75 % ao 14º dia de incubação. Adicionalmente, nestas condições as estirpes *P. chrysosporium* MUM 94.15 e *T. versicolor* MUM 04.101 apresentaram uma taxa de descoloração de 33,3 % e intensidade de descoloração de 25 %, após o período máximo de incubação de 28 dias.

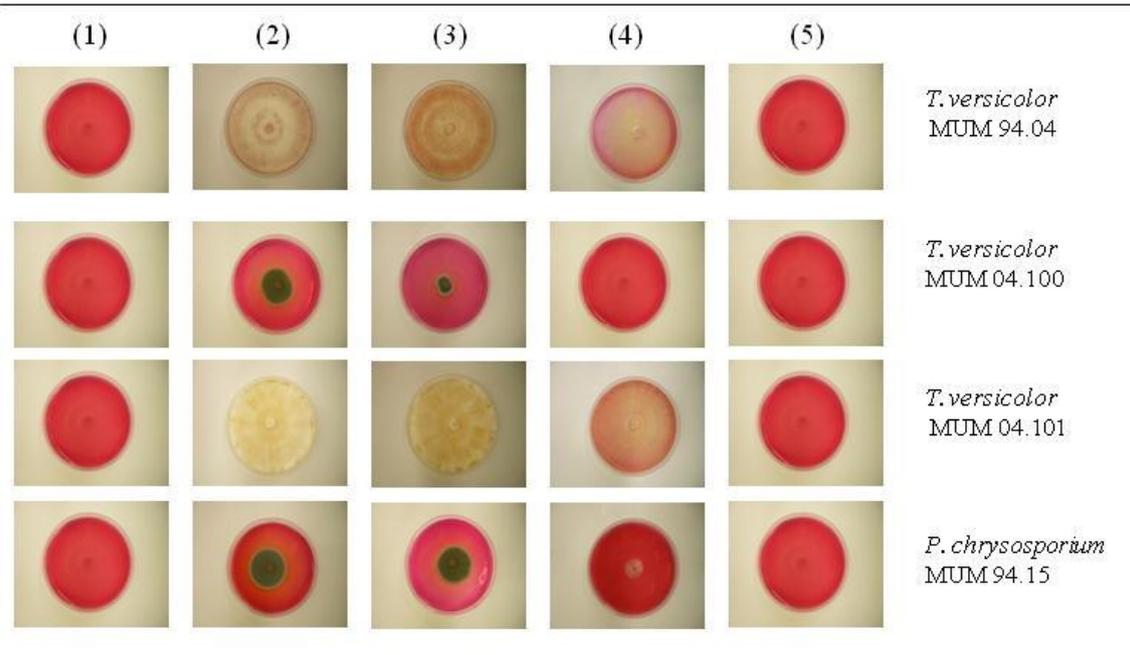
No valor máximo de alcalinidade estudado (pH 10,0) e numa concentração de NaCl de 10 g·l<sup>-1</sup>, *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 descoloriram RP5 com uma taxa

de descoloração de 55,6 % e com uma intensidade de descoloração de 25 % independentemente da concentração de sal adicionado ao meio de cultura. Nestas condições, as estirpes *P. chrysosporium* MUM 94.15 e *T. versicolor* MUM 04.100 não foram capazes de se adaptarem aos parâmetros restritivos, como pode ser verificado na Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Descoloração de RP5 por 4 estirpes de Fpb em condições extremas de pH e salinidade: 1: Controle; 2: NaCl 5,0 g·l<sup>-1</sup>; 3: NaCl 10,0 g·l<sup>-1</sup>; 4: NaCl 15,0 g·l<sup>-1</sup>; 5: NaCl 20,0 g·l<sup>-1</sup>; pH 9,0; 30 °C; 28 dias de incubação.

Conforme apresentado na Figura 4.2, o tipo de corante (PR478), o pH (> 8,0) e a concentração de NaCl (> 10 g·l<sup>-1</sup>) foram fatores que desfavoreceram a adaptação do fungo e conseqüentemente a descoloração dos corantes. *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 foram as únicas estirpes que, a pH 8,0 e com valor limite de NaCl fixado em 10 g·l<sup>-1</sup>, alcançaram uma taxa de descoloração e intensidade de descoloração de 100 % e 75 %, respectivamente. Em contrapartida, as estirpes *P. chrysosporium* MUM 94.15 e *T. versicolor* MUM 04.101 não apresentaram resultados significativos em quaisquer condições avaliadas. O aumento do pH a valores superiores a 8,0 restringiu a taxa de descoloração e intensidade de descoloração pelas estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e *T. versicolor* MUM 04.101.



**Figura 4.2.** Descoloração de PR478 por 4 estirpes de Fpb em condições extremas de pH e salinidade: 1: Controle; 2: NaCl 5,0 g·l<sup>-1</sup>; 3: NaCl 10,0 g·l<sup>-1</sup>; 4: NaCl 15,0 g·l<sup>-1</sup>; 5: NaCl 20,0 g·l<sup>-1</sup>; pH 8,0; 30 °C; 28 dias de incubação.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.1 e Figura 4.2 na Tabela 4.3, observa-se que as concentrações de NaCl superiores a 15,0 g·l<sup>-1</sup> restringiram a capacidade decolorativa das quatro estirpes selecionadas, independentemente do pH e corante adotados para o estudo.

**Tabela 4.3.** Descoloração de RP5 e PR478 por 4 estirpes de Fpb em condições extremas de pH e salinidade.

Estirpe MUM	[NaCl]	RP5												PR478											
		pH 8,0				pH 9,0				pH 10,0				pH 8,0				pH 9,0				pH 10,0			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>94.04</b>	<b>5,0</b>	90	90	+++	10	90	90	+++	12	50	70	+	14	90	90	+++	19	70	80	+	22	50	60	+	24
	<b>10,0</b>	90	90	+++	10	90	90	+++	14	50	50	+	14	90	90	+++	19	50	70	+	22	50	60	+	24
	<b>15,0</b>	90	90	+++	14	70	90	+++	14	50	50	+	14	80	80	+	23	40	-	-	28	30	-	-	28
	<b>20,0</b>	30	-	-	28	30	-	-	28	10	-	-	28	-	-	-	28	40	-	-	28	30	-	-	28
<b>94.15</b>	<b>5,0</b>	90	90	++	19	60	60	+	22	-	-	-	28	30	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28
	<b>10,0</b>	90	90	++	28	50	50	+	22	-	-	-	28	10	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28
	<b>15,0</b>	90	90	++	28	30	30	+	28	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28
	<b>20,0</b>	50	-	-	28	30	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28
<b>04.100</b>	<b>5,0</b>	90	90	++++	9	90	90	++++	11	60	75	+	14	90	90	+++	19	70	80	+	26	50	70	+	24
	<b>10,0</b>	90	90	++++	9	90	90	++++	11	40	50	+	14	90	90	+++	19	50	80	+	26	50	75	+	24
	<b>15,0</b>	90	90	++++	12	90	90	++++	14	50	50	+	14	90	80	+	28	50	-	-	28	30	-	-	28
	<b>20,0</b>	20	-	-	28	10	-	-	28	10	-	-	28	-	-	-	28	40	-	-	28	30	-	-	28
<b>04.101</b>	<b>5,0</b>	90	90	++	19	50	55	+	22	-	-	-	28	30	-	-	28	10	-	-	28	-	-	-	28
	<b>10,0</b>	90	90	++	19	40	45	+	22	-	-	-	28	30	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28
	<b>15,0</b>	80	90	++	22	30	30	+	28	-	-	-	28	10	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28
	<b>20,0</b>	30	-	-	28	30	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28	-	-	-	28

1. Diâmetro de crescimento (mm); 2. Descoloração (mm); 3. Intensidade de descoloração (+ 25%; ++50%; +++75%; ++++ 100%); 4. Tempo de crescimento (dias). Todos os resultados correspondem à média de duas réplicas.

## 4.2. Descoloração de corantes têxteis em meio de cultura líquido (MCL)

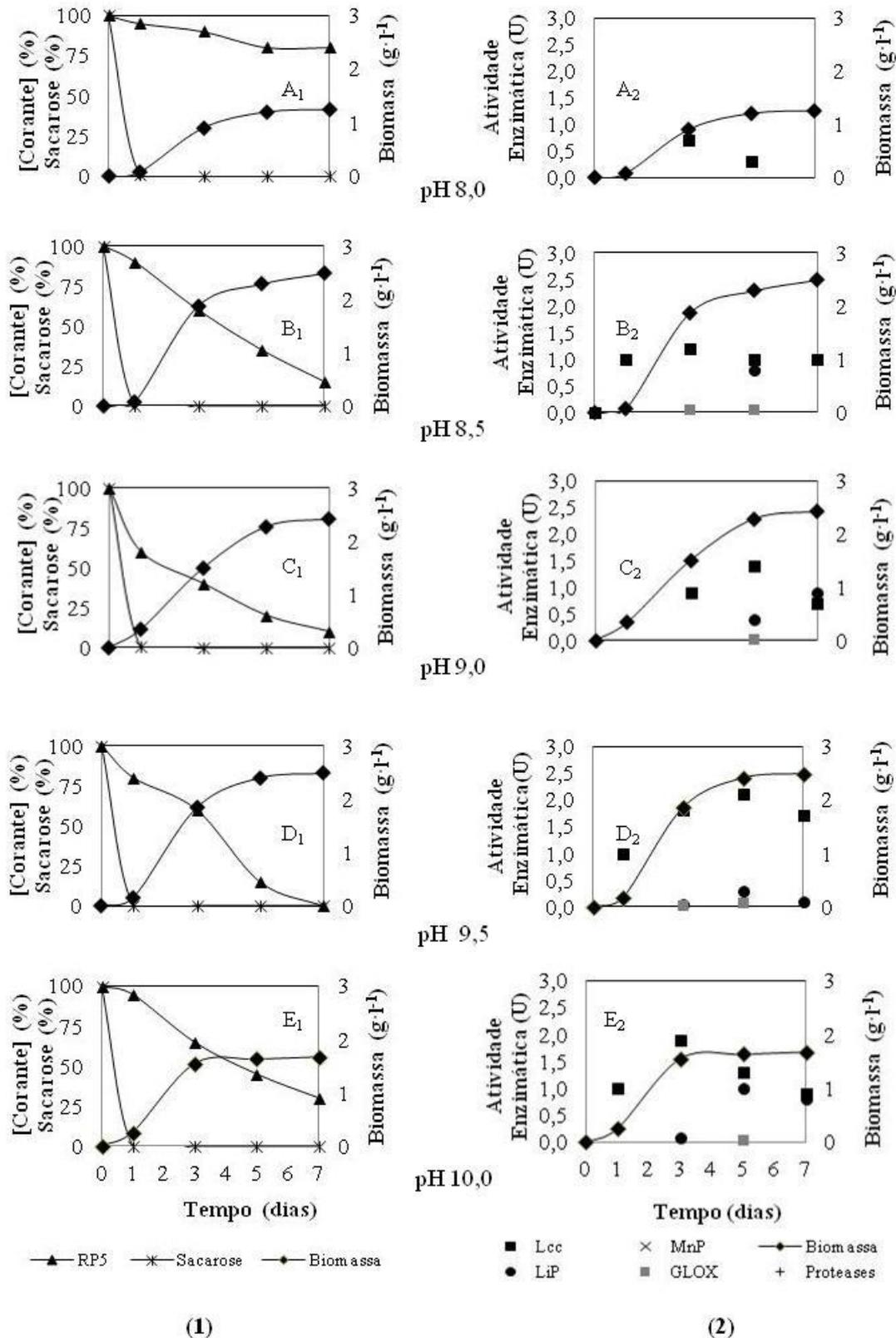
### 4.2.1. Descoloração de RP5 e PR478 em meio de cultura alcalino

A descoloração de ambos corantes em MCL apresentou o mesmo perfil anteriormente descrito para os ensaios em MCS. A descoloração esteve intrinsecamente ligada ao tipo de corante, ao perfil metabólico de cada estirpe de Fpb selecionada e ao pH.

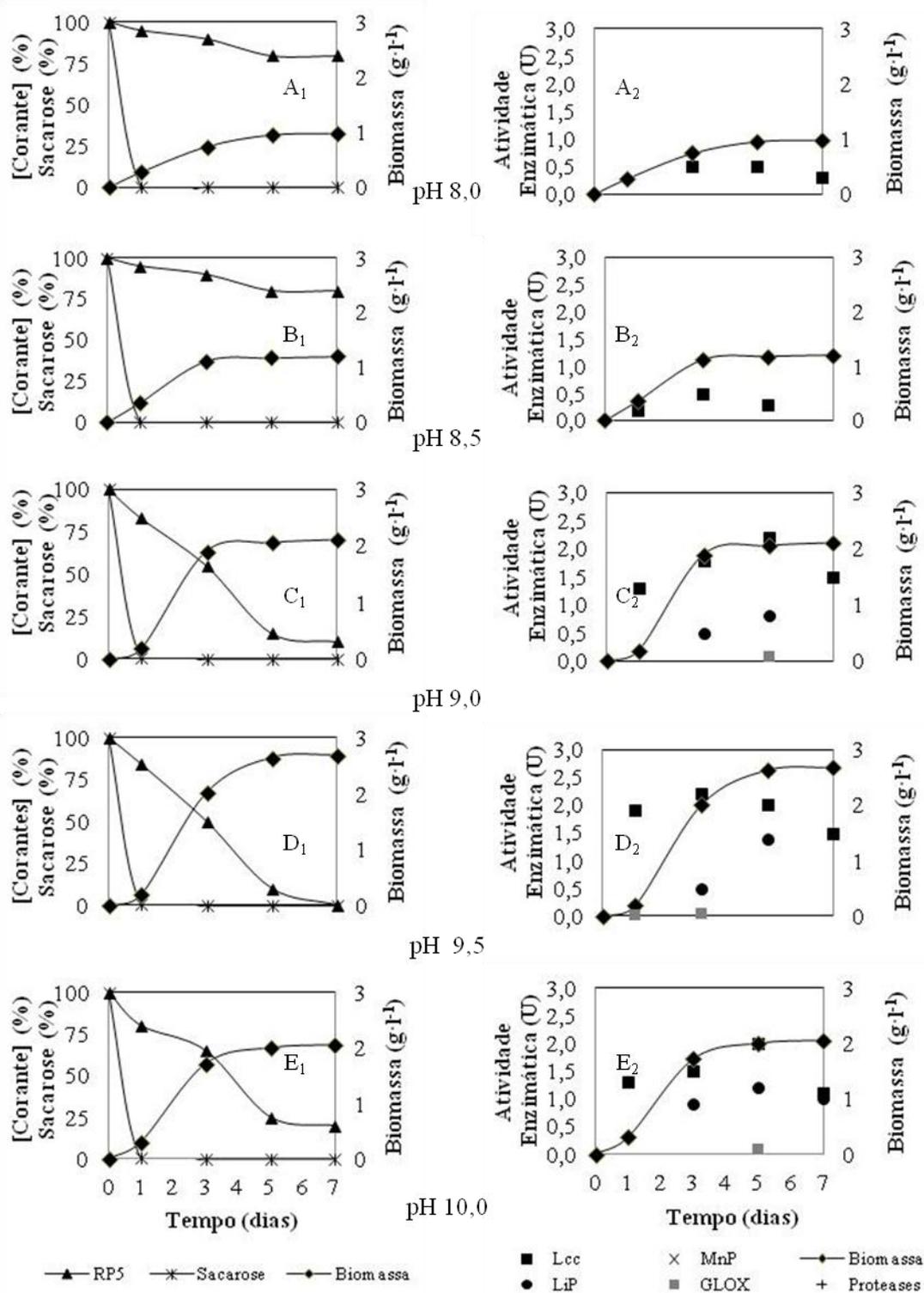
No conjunto de ensaios efetuados conforme anteriormente descrito, os melhores valores de pH para a descoloração do RP5 e PR478 em MCL foram 9,5 e 8,5, respectivamente. Para o corante RP5, as estirpes *Trametes versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram uma taxa de descoloração de 100 % (Figura 4.3 e Figura 4.4). As estirpes *Trametes versicolor* MUM 04.101 e *Phanerochaete chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725) descoloriram o referido corante em 75 % (Figura 4.5 e Figura 4.6).

Para o corante PR478, a estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15 (Figura 4.7) apresentou uma descoloração na ordem de 85 % e nestas mesmas condições as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram taxas de descoloração igual a 75 % (Figura 4.8 e Figura 4.9). Por outro lado, a estirpe *T. versicolor* MUM 04.101 foi menos eficiente na degradação de PR478 quando comparada com as outras estirpes avaliadas, independentemente da faixa de pH estudada (Figura 4.10).

O consumo de sacarose na presença de ambos os corantes foi determinado partindo-se de amostras do sobrenadante do MCL. A sacarose foi totalmente consumida por todas as estirpes de Fpb analisadas entre o primeiro e terceiro dia de incubação (da Figura 4.3 a Figura 4.10), para todos os valores de pH avaliados. Utilizando-se os respectivos controles, observou-se que a diminuição da concentração dos corantes e a formação de biomassa ocorreram sem adsorção significativa dos corantes à biomassa. Adicionalmente, a formação de biomassa foi superior em MCL em comparação ao controle, porém com diferentes percentagens consoante o corante utilizado.



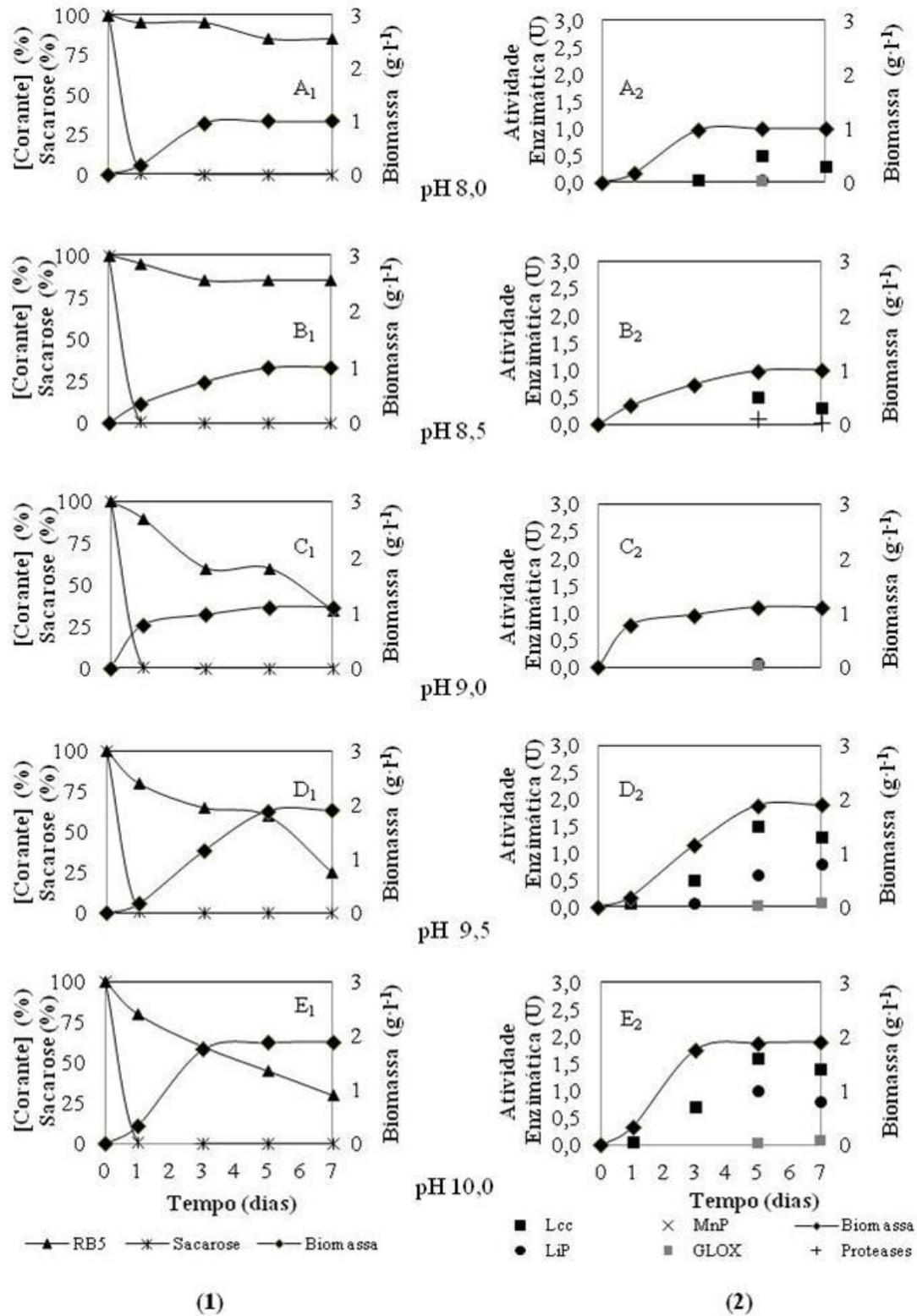
**Figura 4.3.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 94.04. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



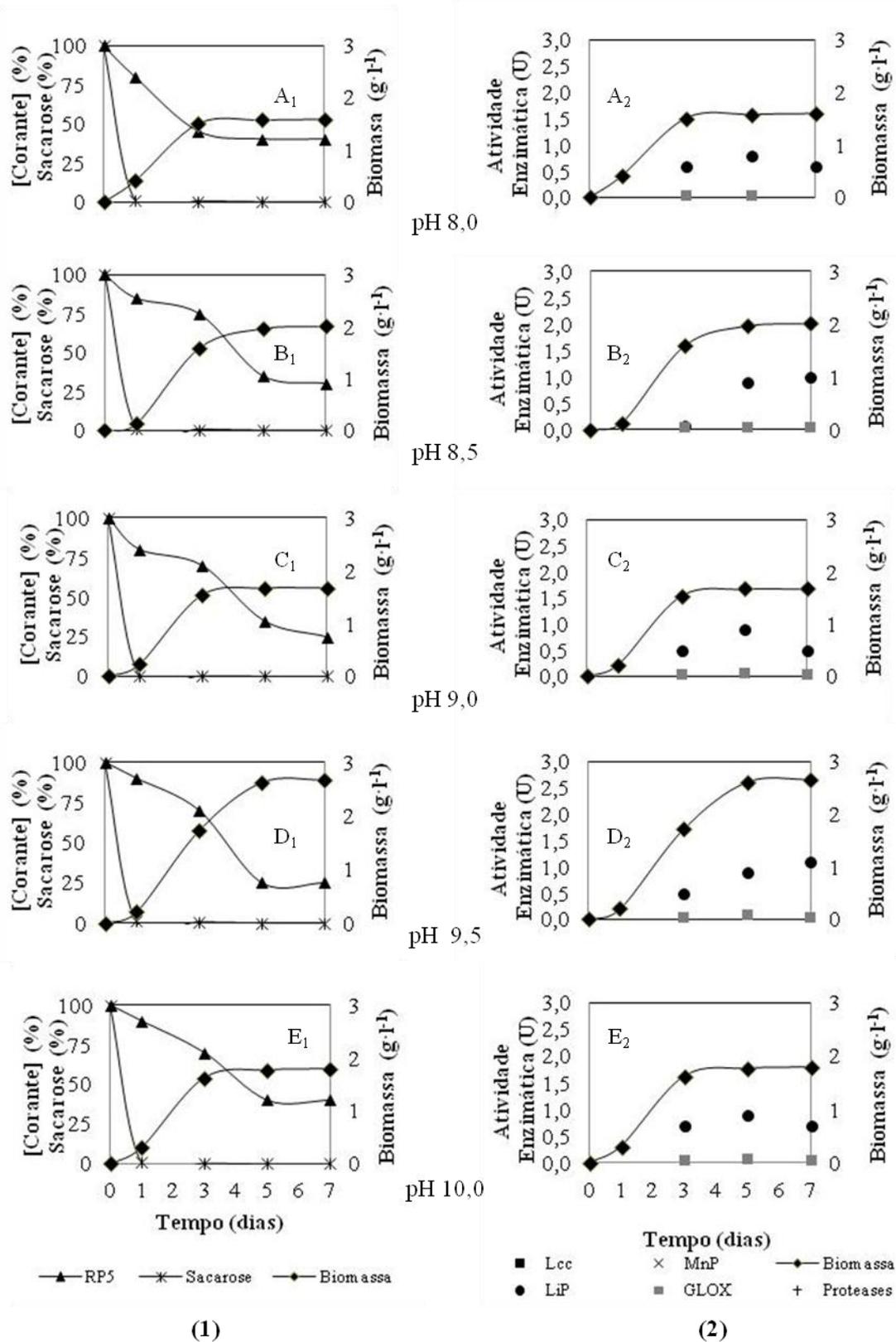
(1)

(2)

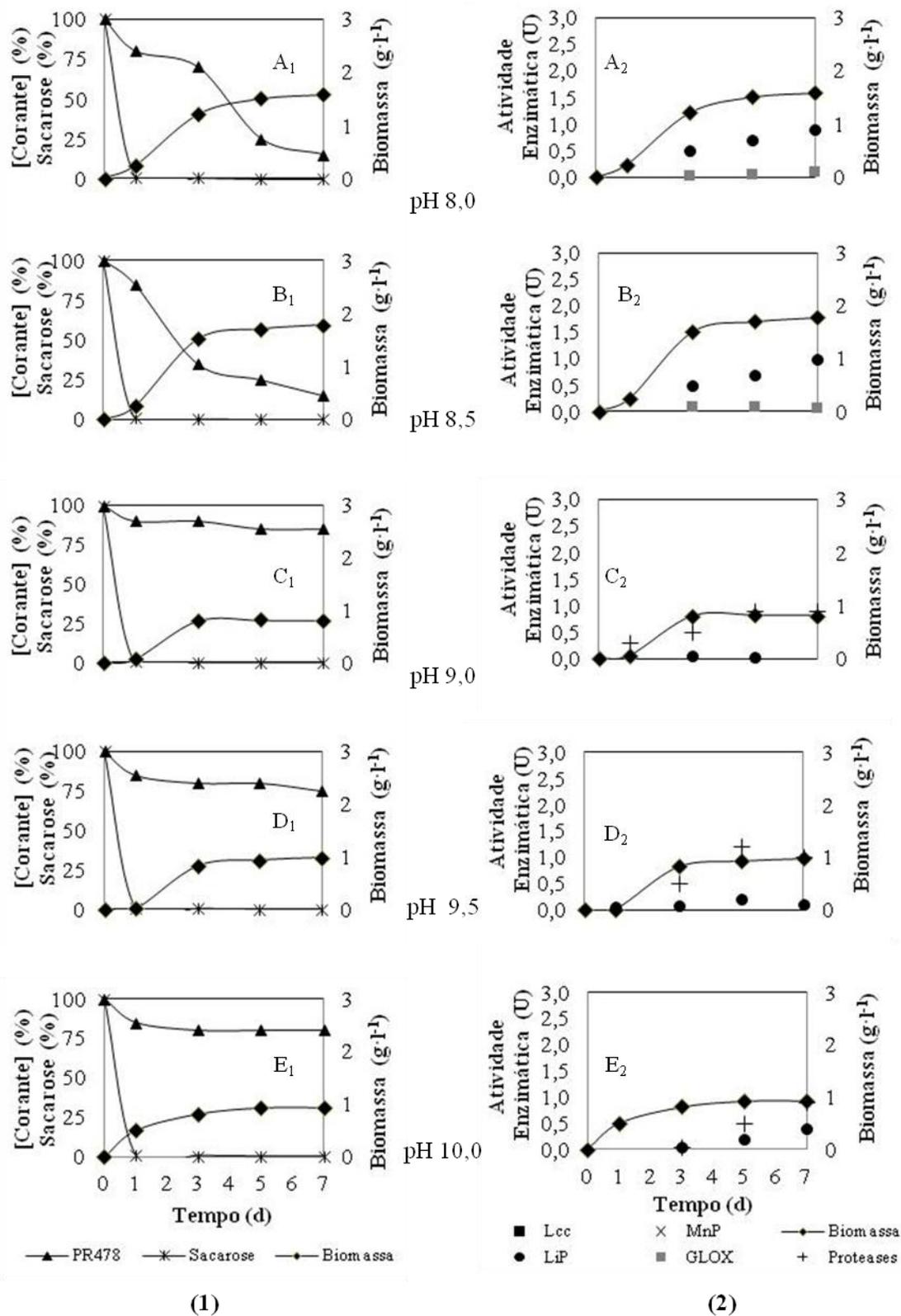
**Figura 4.4.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.100. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



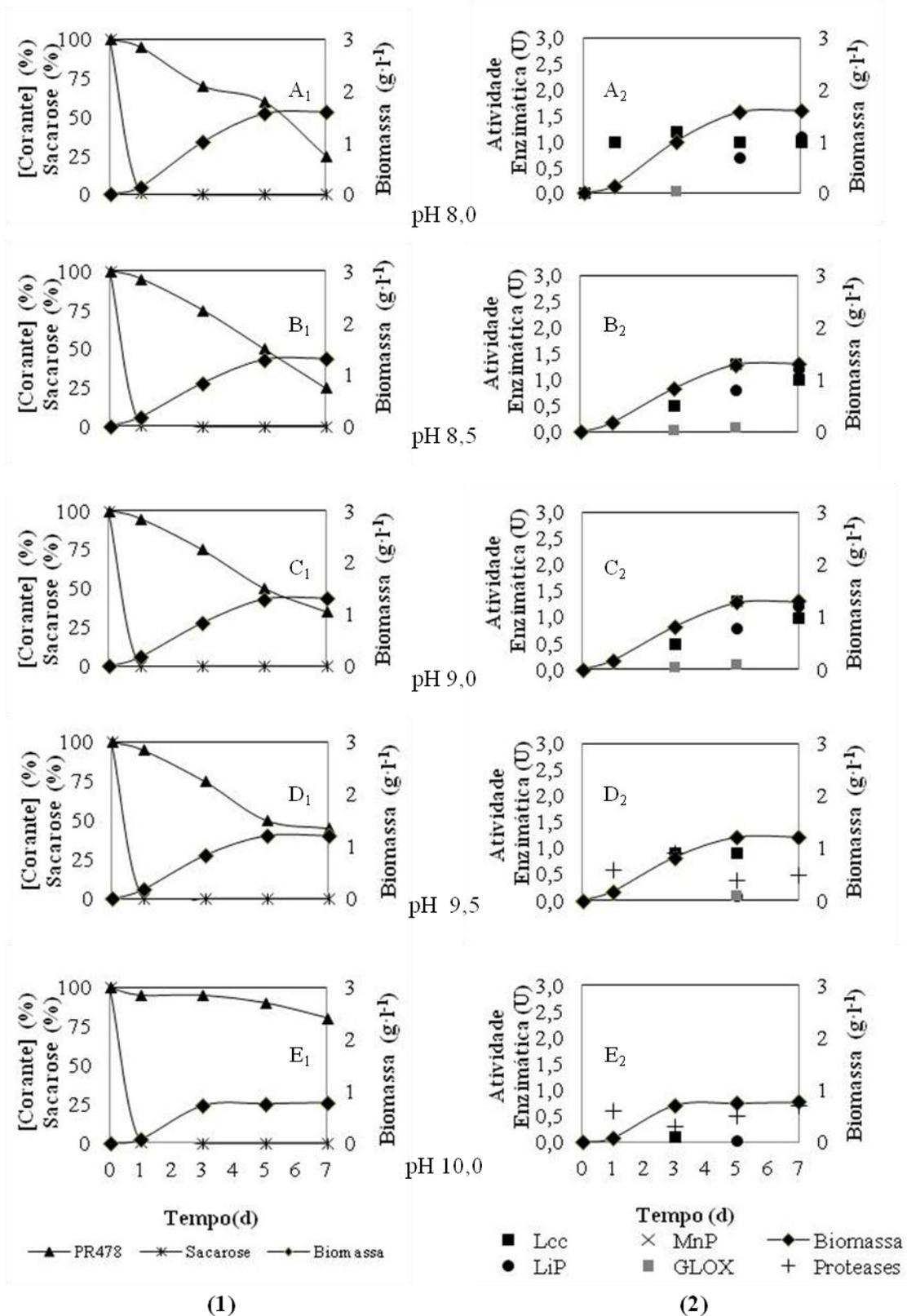
**Figura 4.5.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.101. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



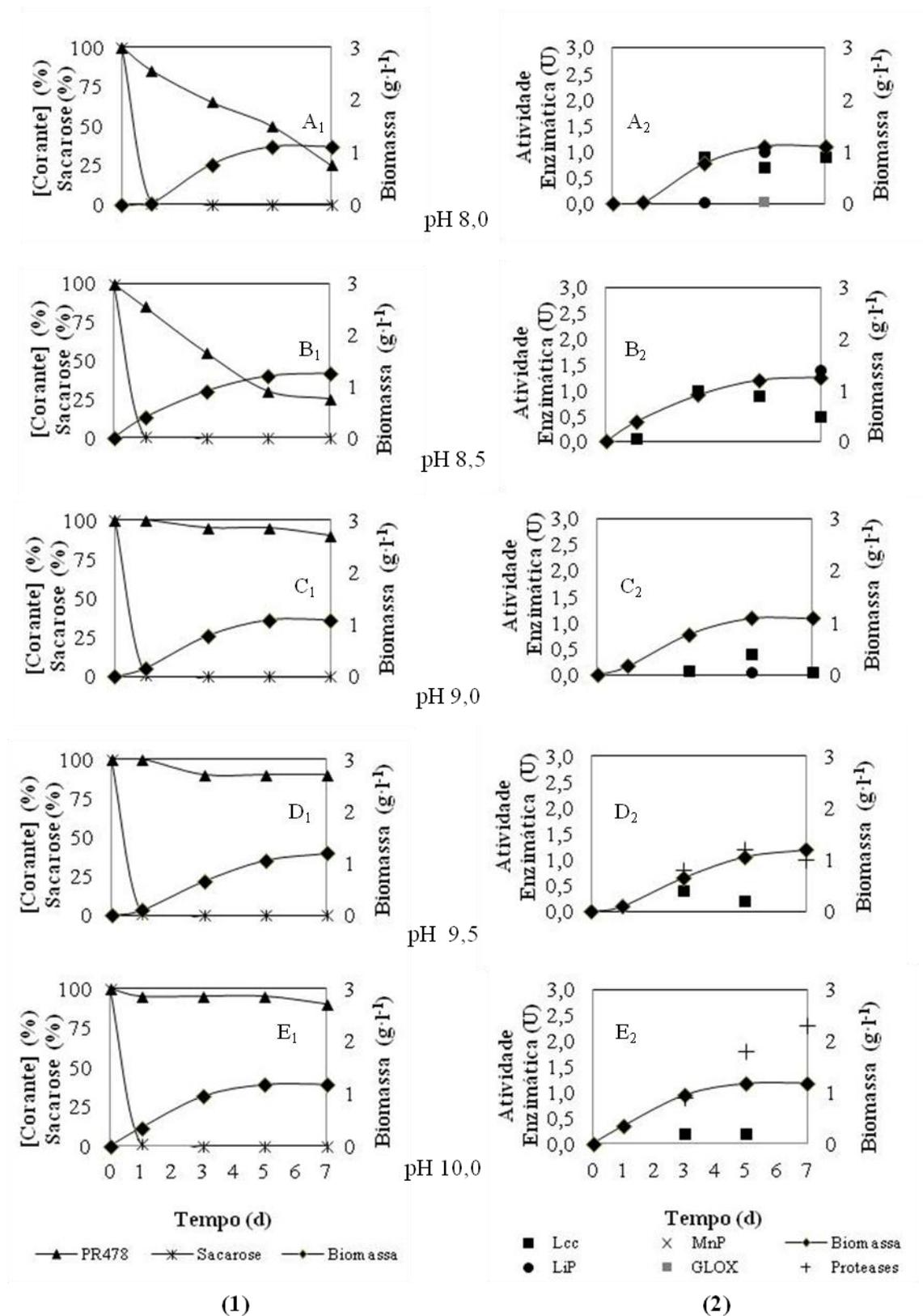
**Figura 4.6.** Efeito do pH na descoloração de RP5 por *P. chrysosporium* MUM 94.15. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



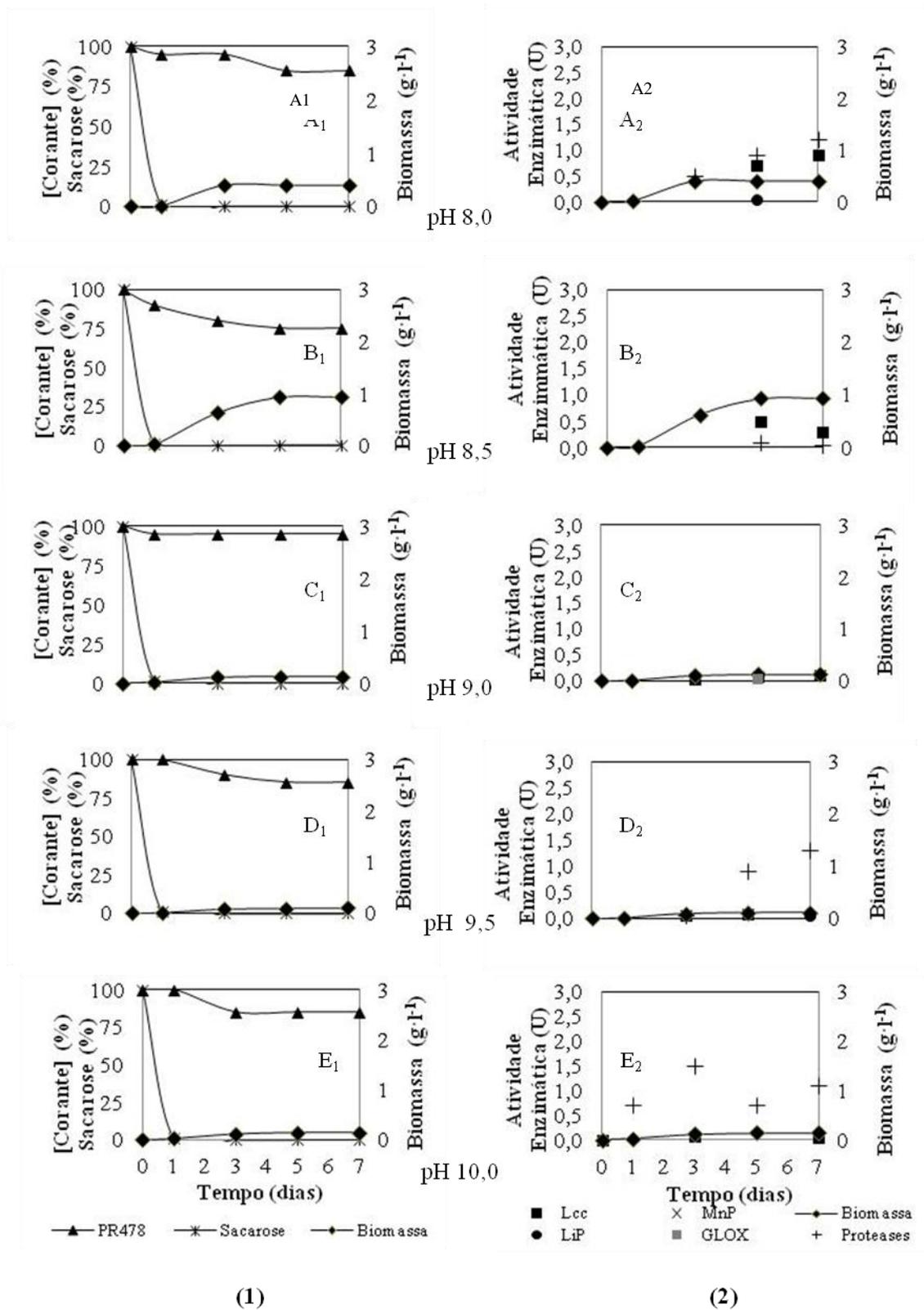
**Figura 4.7.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *P. chrysosporium* MUM 94.15. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



**Figura 4.8.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *T. versicolor* MUM 94.04. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



**Figura 4.9.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *T. versicolor* MUM 04.100. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.



**Figura 4.10.** Efeito do pH na descoloração de PR478 por *T. versicolor* MUM 04.101. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.

A fim de se elucidar quais as enzimas extracelulares que encontraram-se envolvidas na degradação dos corantes RP5 e PR478 por cada estirpe de microrganismo selecionado, ensaios enzimáticos foram efetuados com as amostras dos respectivos MCL. Uma primeira análise qualitativa foi efetuada através do Teste de Schänel, para a verificação da presença de enzimas da classe das oxirredutases. Os resultados obtidos para todas as estirpes de *T. versicolor* (MUM 94.04, MUM 04.100 e MUM 04.101), foram distintos, desde o 1º dia de ensaio, quando comparadas com a estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725). Observou-se uma coloração avermelhada e com crescente elevação de intensidade consoante os dias de incubação para todas as estirpes de *T. versicolor* (MUM 94.04, MUM 04.100 e MUM 04.101). Esta coloração não foi observada nas amostras da estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15. Quantificou-se a atividade de cada uma das enzimas envolvidas no processo de degradação dos corantes RP5 e PR478 e a formação de biomassa da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 a pH 9,5 na presença de RP5 (Figura 4.4). A maior atividade foi obtida para a lacase (Lcc) e para lignina-peroxidase (LiP). No caso da Lcc os valores obtidos foram: 1,9 U no 1º dia; 2,2 U no 3º dia; 2,0 U no 5º dia e 1,5 U no 7º dia. Já no caso da LiP os valores obtidos foram os seguintes: 0,5 U no 3º dia e 1,4 U no 5º dia. Também foi detectada uma atividade elevada da Lcc para a estirpe *T. versicolor* MUM 94.04 (Figura 4.3): 1,0 U no 1º dia; 1,8 U no 3º dia; 2,1 U no 5º dia e 1,7 U no 7º dia. Para a estirpe *T. versicolor* MUM 94.04 a atividade de LiP foi detectada com os seguintes valores: 0,05 U no 3º dia, 0,3 U no 5º dia e 0,09 no 7º dia. Adicionalmente, atividades residuais GLOX foram encontradas em ambas estirpes. Por outro lado, as atividades de manganês-peroxidase (MnP) e proteases não foram detectadas nestes microrganismos.

Apesar da ausência da Lcc no sistema enzimático de *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725) esta estirpe foi capaz de descolorir RP5 em valores comparáveis aqueles encontrados para a estirpe *T. versicolor* MUM 04.101 a pH 9,5 (Figura 4.5): Tal fato poderá então ser atribuído à presença das enzimas LiP e GLOX nas amostras analisadas de MCL. Deste modo, para LiP obtiveram-se os seguintes valores de atividade enzimáticas: 0,5 U no 3º dia, 0,9 U no 5º dia e 1,1 no 7º dia. A Figura 4.5 apresenta os melhores resultados obtidos para descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.101. Os valores máximos da Lcc e LiP foram detectados no 5º dia de incubação, tendo sido 1,5 U e 0,8 U, respectivamente. Como descrito para as estirpes *T. versicolor*

MUM 94.04 e MUM 04.100, foram detectados valores residuais de GLOX para as estirpes *P. chrysosporium* MUM 94.15 e *T. versicolor* MUM 04.101.

Nos ensaios realizados com o corante PR478, as maiores atividades enzimáticas foram encontradas para as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100, a pH 8,5 (Figura 4.8 e Figura 4.9). Nessas condições a estirpe *T. versicolor* MUM 94.04 apresentou os seguintes valores de atividades enzimáticas: 0,5 U no 3º dia; 0,8 U no 5º dia e 1,2 U no 7º dia da Lcc e 0,5 U no 3º dia, 0,8 no 5º dia e 1,2 U no 7º dia de LiP. Para esta estirpe, as atividades residuais de GLOX foram detectadas no 3º e 5º dia de incubação. Os valores das atividades enzimáticas obtidos para a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, foram similares aqueles encontrados para a estirpe *T. versicolor* MUM 94.04, sendo: 0,07 U no 1º dia; 1,0 U no 3º dia, 0,9 U no 5º dia e 0,5 U no 7º dia para Lcc e 1,0 U no 3º dia, 0,9 no 5º dia e 1,4 U no 7º dia, para LiP. Em concordância com os resultados apresentados acima para RP5 a pH 8,5, nos ensaios enzimáticos efetuados para a estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725), não foi detectada atividade da Lcc. Entretanto, os valores obtidos para LiP foram similares aqueles encontrados para as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100, sendo: 0,5 U no 3º dia, 0,7 U no 5º dia e 1,0 U no 7º dia, além de atividade residual de GLOX entre os 3º e 7º dias de amostragem. Para as estirpes *T. versicolor* MUM 04.100 e 04.101 não foi detectada esta enzima. Além disso, para quaisquer umas das estirpes estudadas não foram detectadas atividades de MnP e proteases.

Nas melhores condições de descoloração de ambos os corantes estudados, observou-se a inter-relação entre a formação de biomassa e a atividade enzimática, atendendo a razões de: 2,32 para a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100; 1,9 para a estirpe *T. versicolor* MUM 94.04; 1,93 para a estirpe *T. versicolor* MUM 04.101 e 1,45 para a estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15. Também, é importante salientar que a biomassa formada na presença de RP5 foi superior às quantidades determinadas em presença de PR478 para todas as estirpes, em todas condições estudadas (da Figura 4.3 a Figura 4.10).

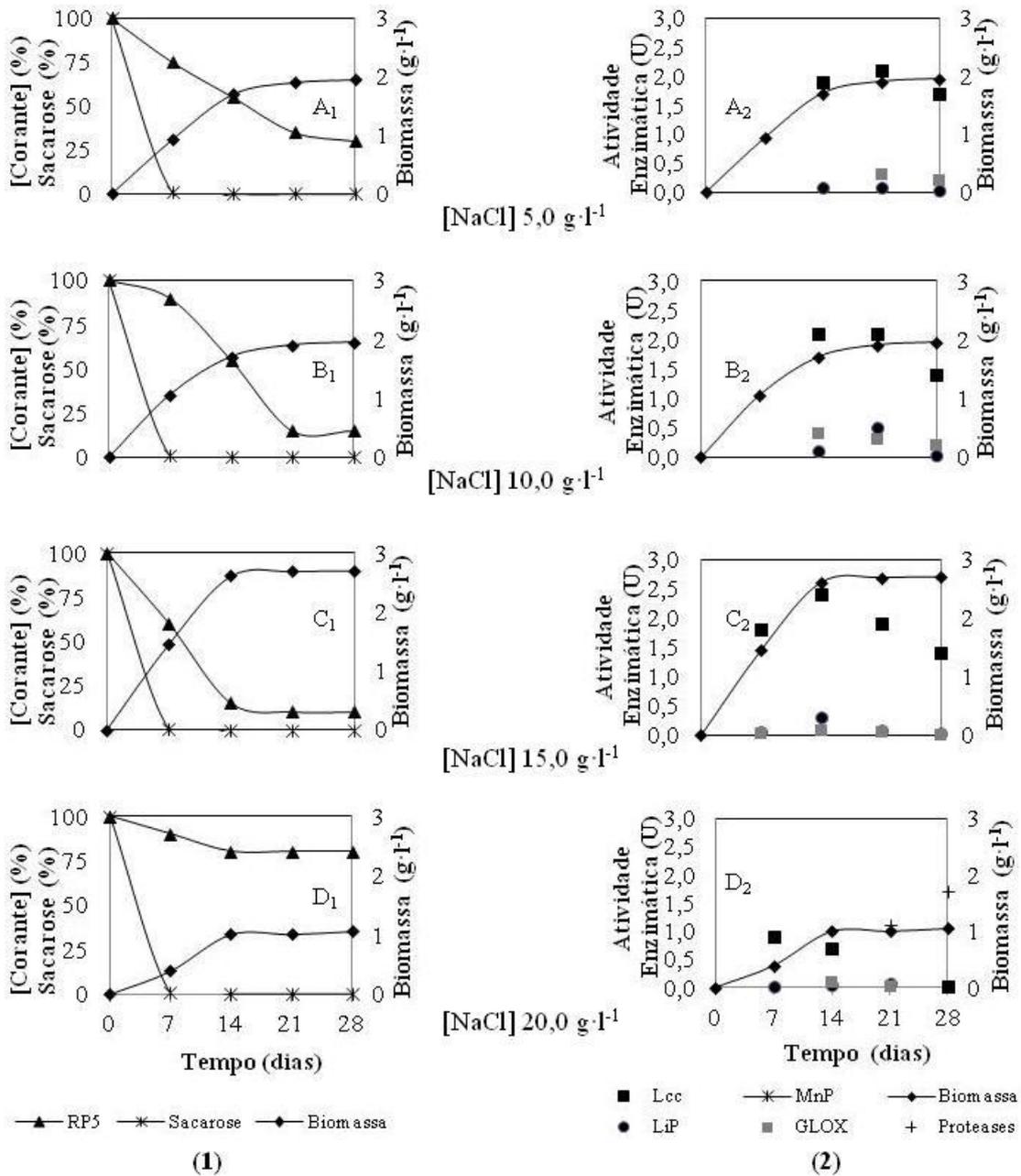
#### 4.2.2. Descoloração de RP5 em meio de cultura salino

Para o corante RP5 as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 04.100 e MUM 04.101 e *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725), apresentaram os melhores resultados a pH 9,5 em uma concentração de  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  do corante. Deste modo, estabelecidos os melhores valores de pH e concentração do corante a ser estudado, um ensaio foi conduzido com adição de diferentes concentrações de NaCl ao MCL (Seção 3.2.2.2)

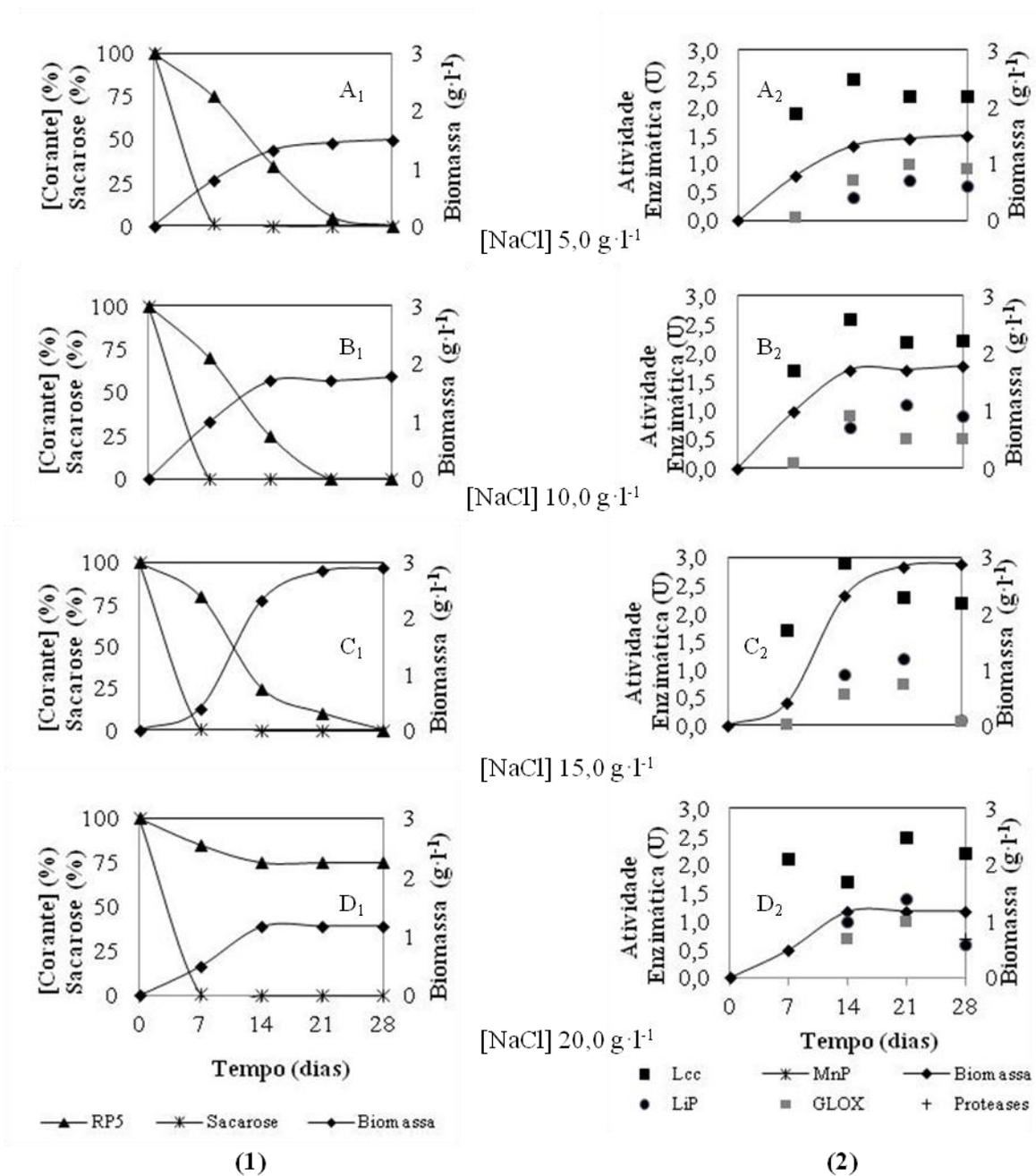
A descoloração de RP5 nestas condições foi dependente das estirpes, do pH e da concentração do sal, fato já antes descrito na Seção 4.2.1. Os melhores resultados de descoloração e atividade enzimática foram obtidos em MCL contendo  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de NaCl na sua composição. As estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram uma taxa de descoloração de 90 % e 100 %, respectivamente (Figura 4.11 e Figura 4.12). Nestas mesmas condições, as estirpes *T. versicolor* MUM 04.101 e *P. chrysosporium* 94.15 atingiram valores inferiores a 75 % (Figura 4.13 e Figura 4.14).

O consumo da sacarose foi determinado pela análise dos sobrenadantes das amostras, ocorrendo entre o 1º e 3º dias de incubação. Não ocorreu inibição de crescimento fúngico perante a presença de corante no MCL. Os valores de biomassa obtidos do controle, em comparação às amostras reais, sempre apresentaram valores inferiores. Em acréscimo, não foi detectada adsorção do corante à biomassa.

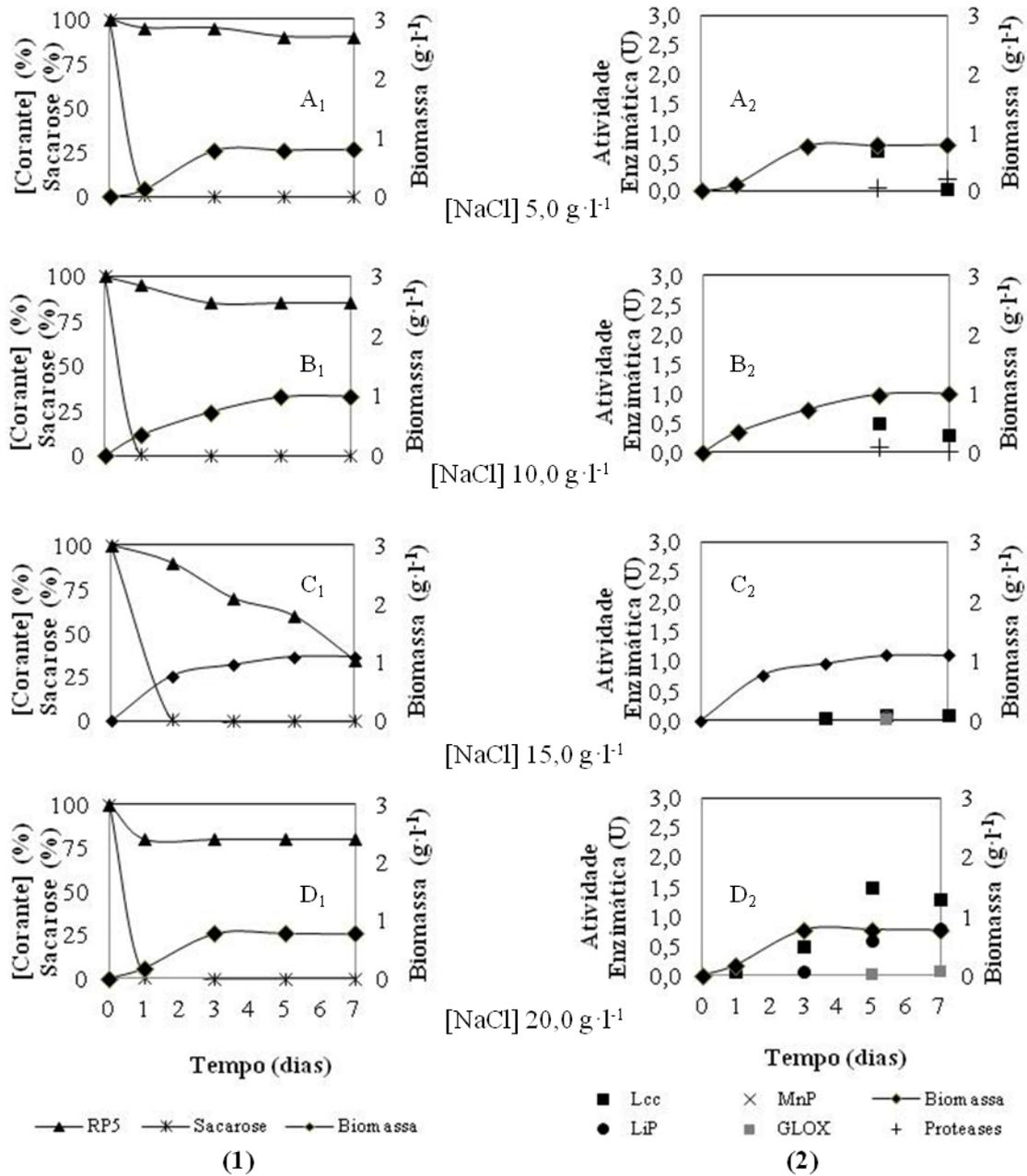
Foram efetuadas determinações das atividades enzimáticas das estirpes dos Fpb estudadas. Para estas determinações utilizaram-se os sobrenadantes das amostras dos MCL em diferentes concentrações de NaCl. Os ensaios enzimáticos com as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 permitiram a detecção de Lcc e LiP em valores superiores aos obtidos nas melhores condições de alcalinidade, isto é, a pH 9,5 com o mesmo corante.



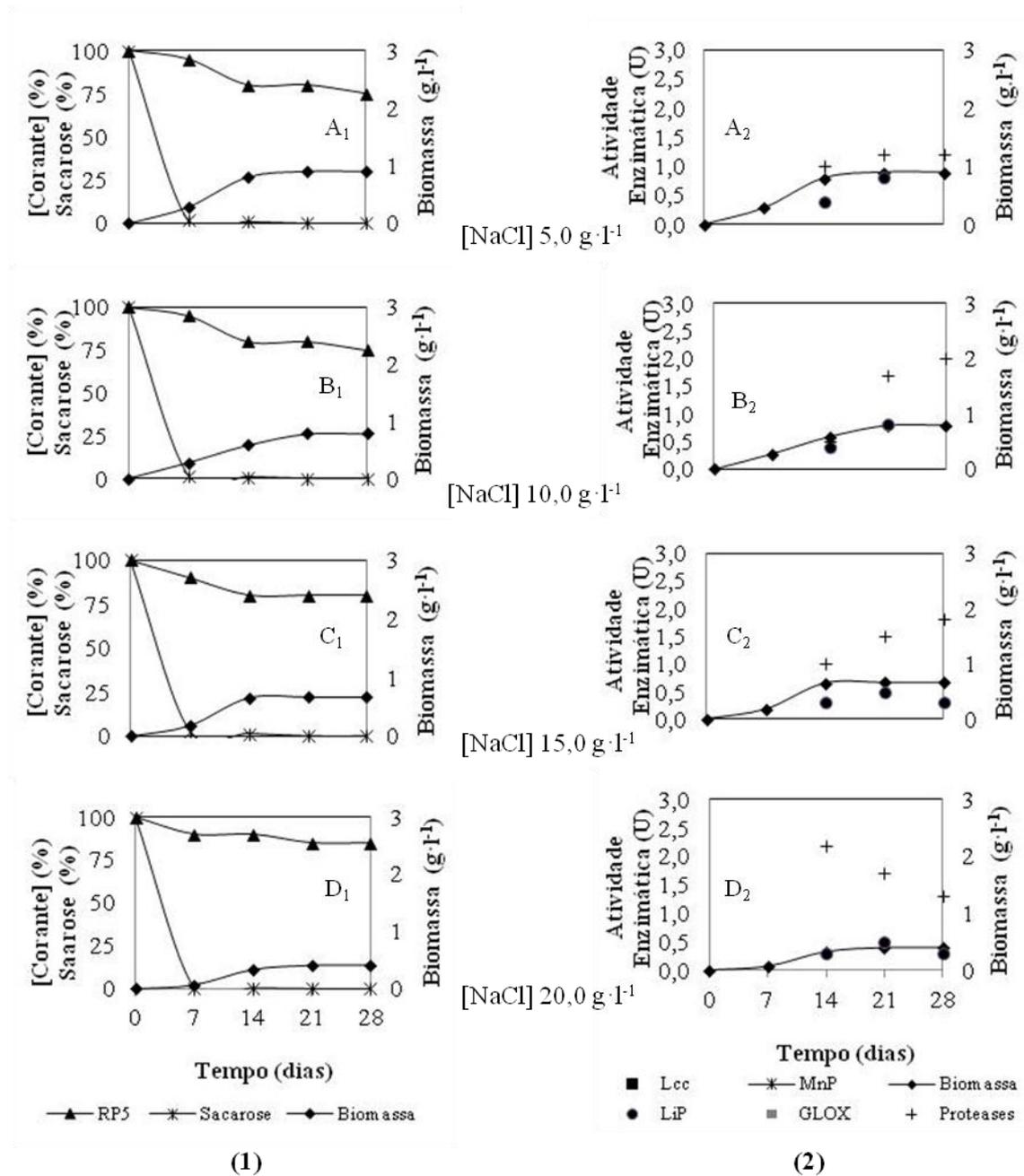
**Figura 4.11.** Efeito da concentração de NaCl na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 94.04. Coluna 1: Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; Coluna 2: Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm durante 28 dias a 30 °C.



**Figura 4.12.** Efeito da adição de NaCl na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.100. Coluna 1: Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; Coluna 2: Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm durante 28 dias a 30 °C.



**Figura 4.13.** Efeito da adição de NaCl na descoloração de RP5 por *T. versicolor* MUM 04.101. Coluna (1) Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; (2) Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm, 30 °C por 28 dias.



**Figura 4.14.** Efeito da concentração de NaCl na descoloração de RP5 por *P. chrysosporium* MUM 94.15. Coluna 1: Descoloração, formação de biomassa e consumo de sacarose; Coluna 2: Formação de biomassa e atividade enzimática. Condições: pH 9,5, 150 rpm durante 28 dias a 30 °C.

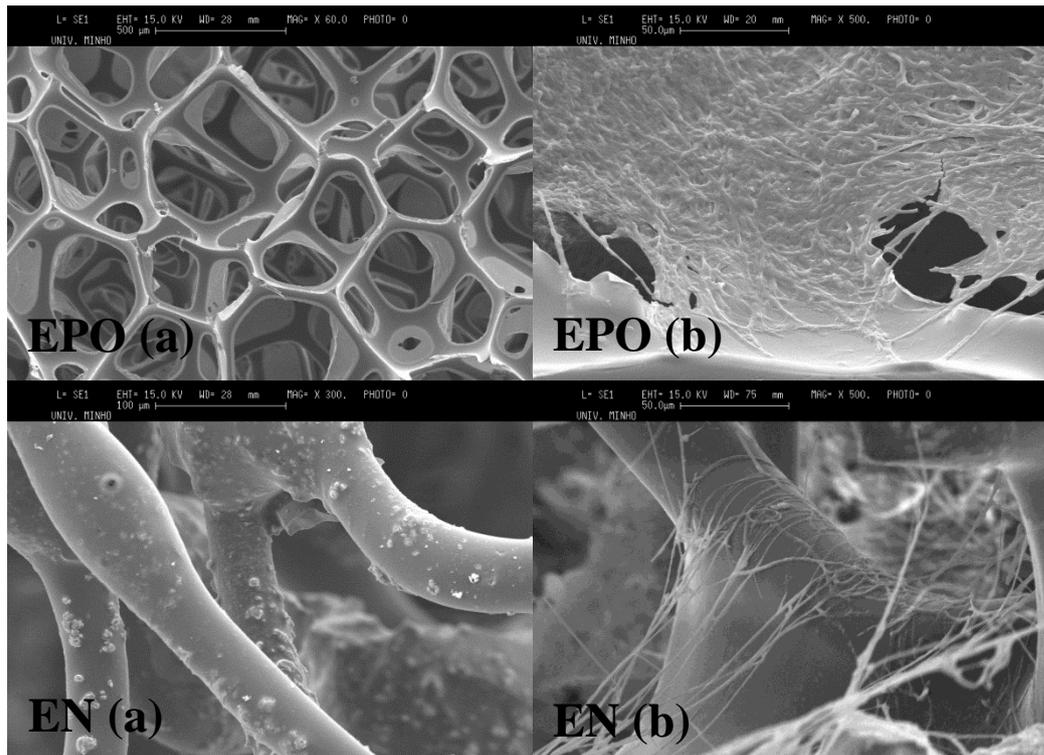
Os valores máximos das atividades enzimáticas obtidos para as estirpes *T. versicolor* MUM 04.100, foram: 1,7 U no 7º dia, 2,9 U no 14º dia, 2,3 U no 21º dia e 2,2 U no 28º dia e de LiP: 0,9 U no 14º dia, 1,2 U no 21º dia e 0,09 U no 28º dia de incubação (Figura 4.12). A estirpe *T. versicolor* MUM 94.04 apresentou as seguintes atividades enzimáticas de Lcc: 1,8 U no 7º dia, 2,4 U no 14º dia, 1,9 U no 21º dia e 1,4 U no 28º dia e de LiP: 0,05 U no 7º dia, 0,3 U no 14º dia, 0,09 U no 21º dia e 0,03 U no 28º dia de incubação (Figura 4.11). As atividades residuais de GLOX foram também detectadas para as estirpes *T. versicolor* MUM 04.100 e MUM 94.04. Nestas mesmas amostras não foram detectadas atividades de MnP e proteases.

Os ensaios enzimáticos realizados com os sobrenadantes dos ensaios com estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15 permitiram a detecção de atividade de LiP, tendo obtidos os seguintes valores: 0,3 U no 14º dia, 0,5 U no 21º dia e 0,3 U no 28º dia. Para esta estirpe não foram detectadas as atividades de MnP e GLOX, porém foram quantificadas proteases, tendo-se obtido os valores: 1,3 U no 14º dia, 1,7 no 21º dia e 2,2 no 28º dia (Figura 4.14). A estirpe *T. versicolor* MUM 04.101 (Figura 4.13) apresentou um desempenho inferior quando comparada a MUM 94.04 e MUM 04.100. Contudo, mesmo apresentando atividades de Lcc, LiP e GLOX residuais, obteve uma taxa de descoloração similar a MUM 94.15.

### **4.2.3. Utilização da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada na descoloração de RP5**

#### **4.2.3.1. Imobilização celular em suportes sintéticos**

De acordo com as imagens obtidas por MEV da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 (Figura 4.15) imobilizada nos suportes sintéticos de EPO e de EN (Seção 3.2.2.2) foi possível visualizar-se a adesão superficial e interna da estirpe aos dois suportes. A quantificação absoluta (peso seco) de biomassa imobilizada nos respectivos suportes, foi efetuada com 5 unidades de cada material após 7 dias de incubação. Uma discreta variação da biomassa imobilizada foi observada, obtendo-se  $0,18 \pm 0,08$  ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  suporte) em EPO e  $0,23 \pm 0,09$  ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  suporte) em EN, sendo que os valores obtidos foram a média de 3 ensaios independentes. Tal procedimento permitiu obter uma estimativa da quantidade de biomassa fúngica introduzida no meio de cultura do ensaio. As outras 5 unidades foram transferidas para o MCL e incubadas por 7 dias.



**Figura 4.15.** Imagens obtidas por MEV para os suportes EPO e EN: (a) corresponde aos suportes sem adesão fúngica e (b) suporte colonizado por *T. versicolor*, após 7 dias de incubação.

A imobilização do microrganismo em ambos suportes promoveu a completa descoloração do corante nas primeiras 48 h de fermentação. Neste mesmo período, detectaram-se os valores máximos das atividades das enzimas Lcc e LiP (Tabela 4.4), que foram de 2,8 e 1,2 U, respectivamente, quando o microrganismo foi imobilizado em EPO e 2,2 e 0,9 U quando o suporte foi EN. Valores residuais de GLOX foram detectados até o 3º dia de fermentação. Em contrapartida, as atividades de MnP e proteases não foram detectadas.

**Tabela 4.4.** Determinação da atividade enzimática de Fpb imobilizados em EPO e EN.

Suporte	Tempo	Biomassa imobilizada	Biomassa livre	Atividade Enzimática (Lcc)	Atividade Enzimática (LiP)	pH
	(dias)	(g/Erlenmeyer)	(g/Erlenmeyer)	(U)	(U)	
<b>EPO</b>	<b>1</b>	0,92 ± 0,10	0,05 ± 0,02	2,40± 0,01	0,90 ± 0,02	5,2
	<b>2</b>	1,10 ± 0,20	0,07 ± 0,01	2,80± 0,02	1,20 ± 0,01	4,9
	<b>3</b>	1,39 ± 0,25	0,08 ± 0,06	1,00± 0,04	0,05 ± 0,06	4,2
	<b>4</b>	1,83 ± 0,30	0,12 ± 0,02	0,50± 0,03	0,04 ± 0,01	4,0
	<b>5</b>	2,24 ± 0,05	0,19 ± 0,08	0,10± 0,01	-	3,7
	<b>6</b>	2,26 ± 0,08	0,22 ± 0,07	0,05± 0,04	-	3,3
	<b>7</b>	2,28 ± 0,10	0,24 ± 0,01	0,03± 0,02	-	3,0
<b>EN</b>	<b>1</b>	1,21 ± 0,20	0,03 ± 0,01	2,0 ± 0,22	0,7 ± 0,01	5,3
	<b>2</b>	1,89 ± 0,16	0,03 ± 0,01	2,2 ± 0,17	0,9 ± 0,02	5,1
	<b>3</b>	2,29 ± 0,05	0,04 ± 0,01	1,0 ± 0,12	0,4 ± 0,02	3,7
	<b>4</b>	2,45 ± 0,10	0,06 ± 0,02	0,5 ± 0,08	0,4 ± 0,02	3,3
	<b>5</b>	2,46 ± 0,08	0,10 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,03 ± 0,02	3,3
	<b>6</b>	2,48 ± 0,07	0,17 ± 0,05	-	-	3,1
	<b>7</b>	2,48 ± 0,02	0,22 ± 0,04	-	-	3,1

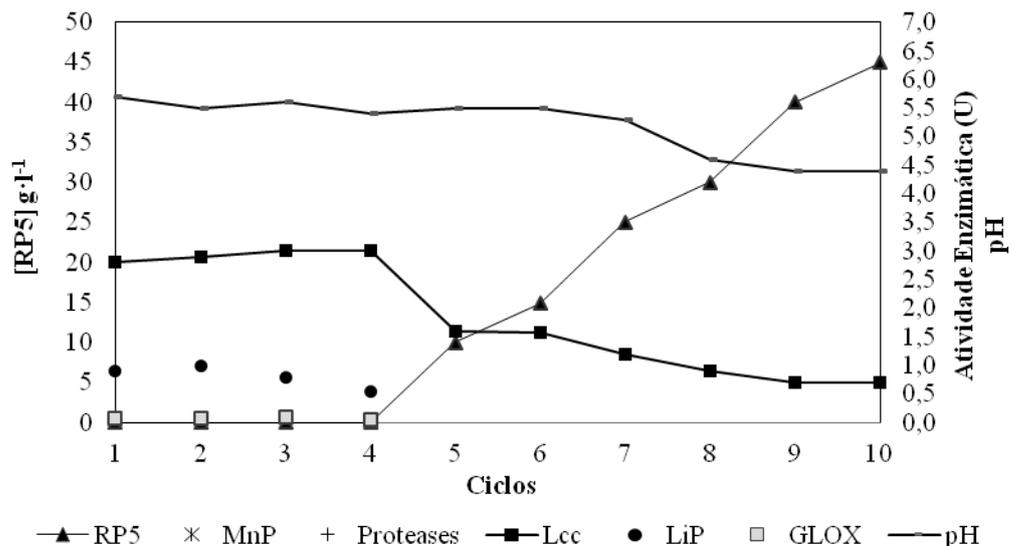
Média de 3 ensaios independentes.

O consumo total da sacarose ocorreu nos dois primeiros dias de ensaio. Ao longo do ensaio, embora o pH inicial do meio de cultura tivesse sido ajustado a 9,5, a diminuição do mesmo ocorreu de forma gradativa, sendo que nos melhores valores de atividade da Lcc encontrava-se no intervalo de 5,3-4,9. As taxas de adesão fúngica de 90,5 % em EPO e 91,85 % em EN foram próximas.

#### 4.2.3.2. Fermentação em “batch” com a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada

Nesta fase do estudo foi realizado um ensaio fermentativo em “batch” com 10 ciclos sucessivos (30 dias) em agitador rotativo, reutilizando-se a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EPO e EN, nas mesmas condições e composição do MCL descritos na Seção 4.2.3.1. Ao final de cada ciclo (3 dias), as células foram devidamente filtradas e lavadas em ambiente asséptico e posteriormente transferidas para um MCL de igual composição.

A estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EPO manteve uma taxa de descoloração de RP5 igual ou superior a 85 % nos 6 primeiros ciclos (Figura 4.16). As atividades máximas da Lcc e LiP ocorreram entre o 1º e 4º e 1º e 2º ciclos, respectivamente. Valores de GLOX residuais foram detectados até o 4º ciclo.

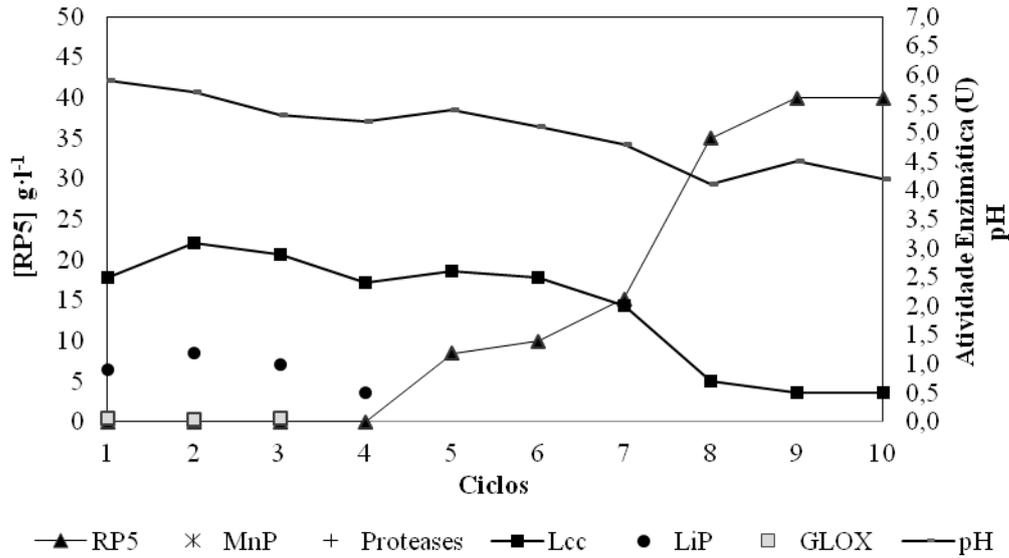


**Figura 4.16.** Descoloração de RP5 ao longo de cada ciclo fermentativo pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EPO.

A imobilização da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em EN (Figura 4.17) proporcionou uma taxa de descoloração igual ou superior a 85 % ao longo dos 7 primeiros ciclos. Para ambas enzimas (Lcc e LiP) as atividades máximas ocorreram entre o 2º e 3º ciclos com valores de até 3,0 e 1,0 U para Lcc e LiP, respectivamente. Valores residuais de GLOX foram detectados até o 3º ciclo.

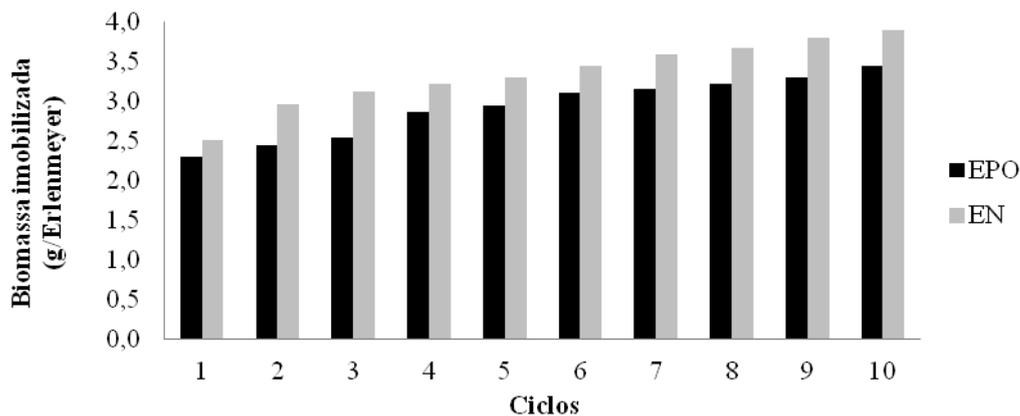
Em acréscimo, deve-se ainda reportar que não foram detectadas atividades de MnP e proteases nas amostras obtidas nos dois ensaios com os diferentes suportes. Nos 10 ciclos em que decorreram ambos os experimentos o consumo de sacarose foi total.

Ao término de cada ciclo, para os dois suportes, ficou evidente a diminuição do pH em curto espaço de tempo (3 dias), limitando-se a valores entre 5,9 e 4,2.



**Figura 4.17.** Descoloração de RP5 ao longo de cada ciclo fermentativo pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EN.

Ao longo dos sucessivos ciclos ocorreu um aumento progressivo da biomassa aderida aos suportes (Figura 4.18). Embora tal fato tenha ocorrido, a redução progressiva da atividade enzimática da Lcc e ausência de detecção da LiP foram observadas a partir do 4º e 5º ciclos para EPO e EN, respectivamente. Deste modo, pôde-se observar que o aumento da biomassa não proporcionou o aumento da atividade das enzimas envolvidas no processo descolorativo.



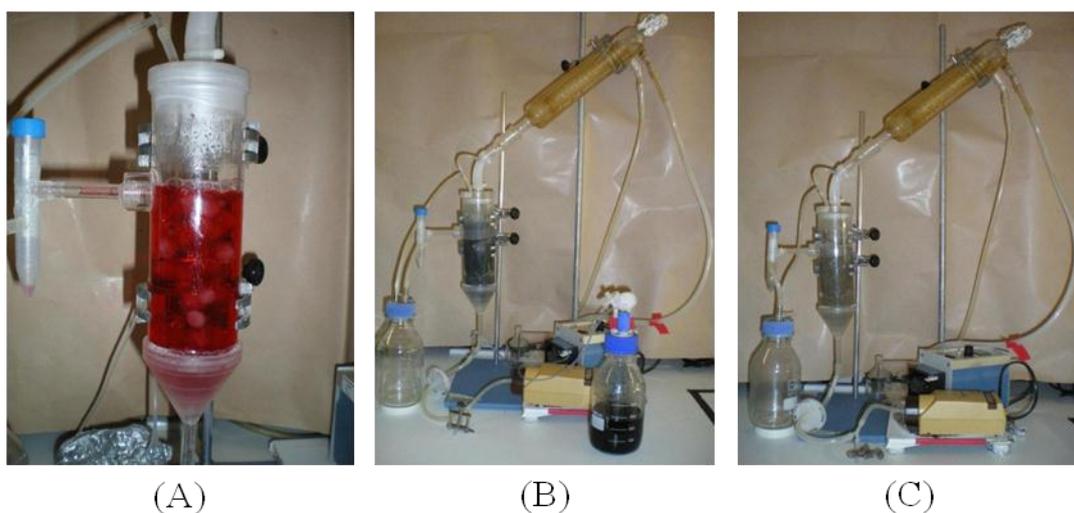
**Figura 4.18.** Formação de biomassa ao longo de cada ciclo fermentativo pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada nos suportes sintéticos EPO e EN.

### 4.3. Descoloração de RP5 em reatores pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100

Diante da potencialidade apresentada pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em descolorir RP5 em condições extremas de alcalinidade e salinidade, um conjunto de ensaios foi realizado em diferentes reatores com células livres e imobilizadas, cujo o objetivo foi a verificação em maior escala do perfil de descoloração do fungo. Foram avaliadas as atividades enzimáticas, variação do pH e o efeito da adição de fontes de carbono suplementares (sacarose e glicerol) ao longo do processo fermentativo.

#### 4.3.1. Reator contínuo de leito fixo

Quatro ensaios independentes foram realizados num reator de leito fixo (Figura 4.19) de capacidade de 300 ml, contendo 260 ml de MCL. As condições de operação inerentes a cada ensaio encontram-se descritas na Seção 3.5.3.1. O reator foi inoculado inicialmente com biomassa proveniente da propagação e meio descrito na Seção 3.2.2.2.

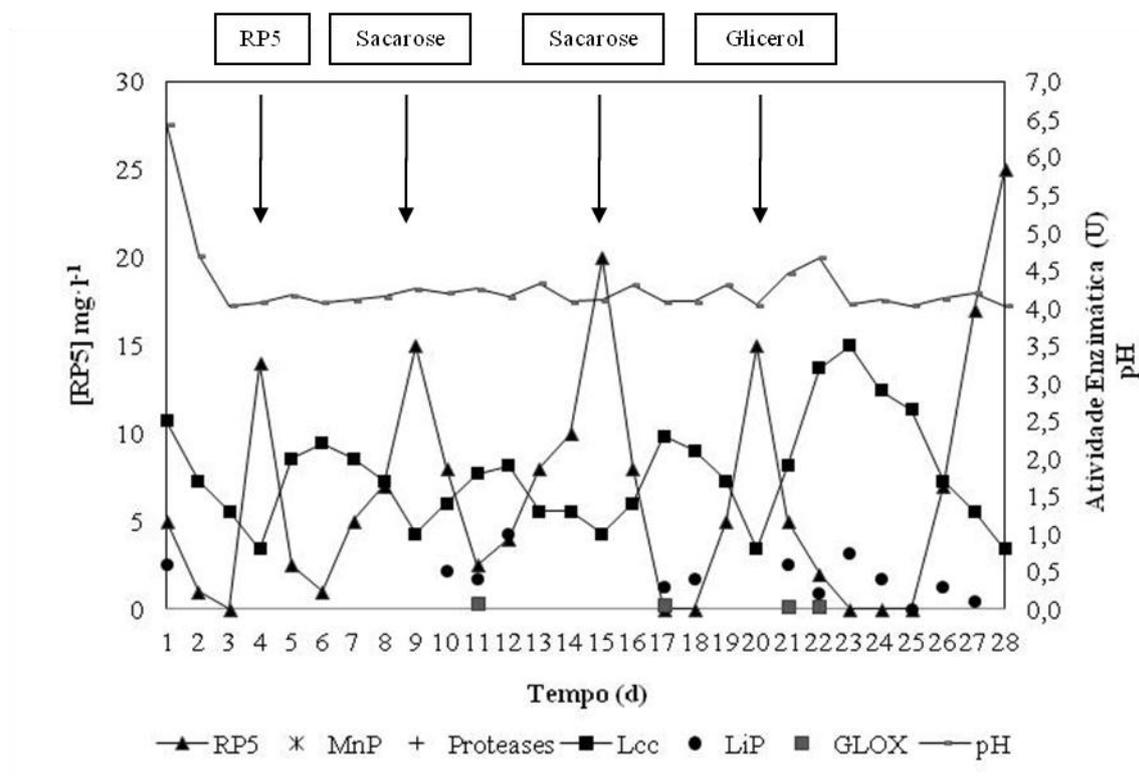


**Figura 4.19.** Descoloração de RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em reator contínuo de leito fixo. A: Meio de cultura renovado após 8 h de fermentação; B: Introdução da fonte de alimentação (3º dia); C: 4º dia de fermentação com fonte de alimentação.

Os resultados relativos ao primeiro ensaio conduzido com células livres da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 estão apresentados na Figura 4.20. A concentração inicial de biomassa do microrganismo no reator foi estimada em peso seco em  $3,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Uma vez ocorrida a total remoção do corante com taxa de descoloração de 100 % no 3º dia, foi iniciado o processo contínuo de alimentação do corante a um caudal fixo de corante (Seção 3.5.3.1). Após a introdução da fonte de alimentação verificou-se uma

intensificação da formação de biomassa, cuja quantificação não foi possível por razões inerentes à dispersão da biomassa no reator. Foram experimentadas, ao longo do ensaio, adições de fontes de carbono por pulsos de sacarose (9º e 15º dia) e glicerol (20º dia). O elevado crescimento celular verificado após as adições tornou necessária a purga de biomassa ao fim dos 11º, 17º e 24º dias. As purgas foram efetuadas para manter o arejamento do meio e a contínua agitação da mistura dentro do reator. Entre os 5º e 7º dias de ensaio as taxas de descoloração mantiveram-se superiores a 90 %. Devido a redução de atividade degradativa do fungo para 85 %, no 9º dia foi efetuado o 1º pulso de sacarose, sendo que o consumo total da mesma ocorreu nas 48 h posteriores. Este pulso de sacarose elevou a taxa de descoloração entre o 10º e 14º dias a valores superiores a 90 % e a sacarose adicionada foi consumida num período de dois dias.

Devido à redução da taxa de descoloração a 80 %, no 15º dia de ensaio um 2º pulso de sacarose foi efetuado. A adição deste 2º pulso elevou a taxa de descoloração a valores também superiores a 90 % entre o 16º e 19º dias e o consumo total desta fonte de carbono ocorreu 24 h após o pulso. Seguindo o mesmo critério, no 20º dia de ensaio, um terceiro e último pulso foi efetuado mas a fonte de carbono utilizada foi glicerol. Após a introdução desta fonte de carbono, obteve-se o pico máximo da atividade da enzima Lcc de 3,5 U, obtendo-se uma taxa de descoloração de 100 % entre os 23º e 25º dias. Em contrapartida, para a enzima LiP, o valor máximo de atividade foi observado no 6º dia de ensaio onde não havia ocorrido qualquer adição de uma fonte de carbono. Valores residuais de GLOX foram determinados apenas no 11º, 17º, 21º e 22º dias. Não foram detectadas atividades de MnP e proteases. Foi observada, tal como esperado, uma acidificação do meio no processo de degradação do RP5, com uma consequente e progressiva diminuição do pH.



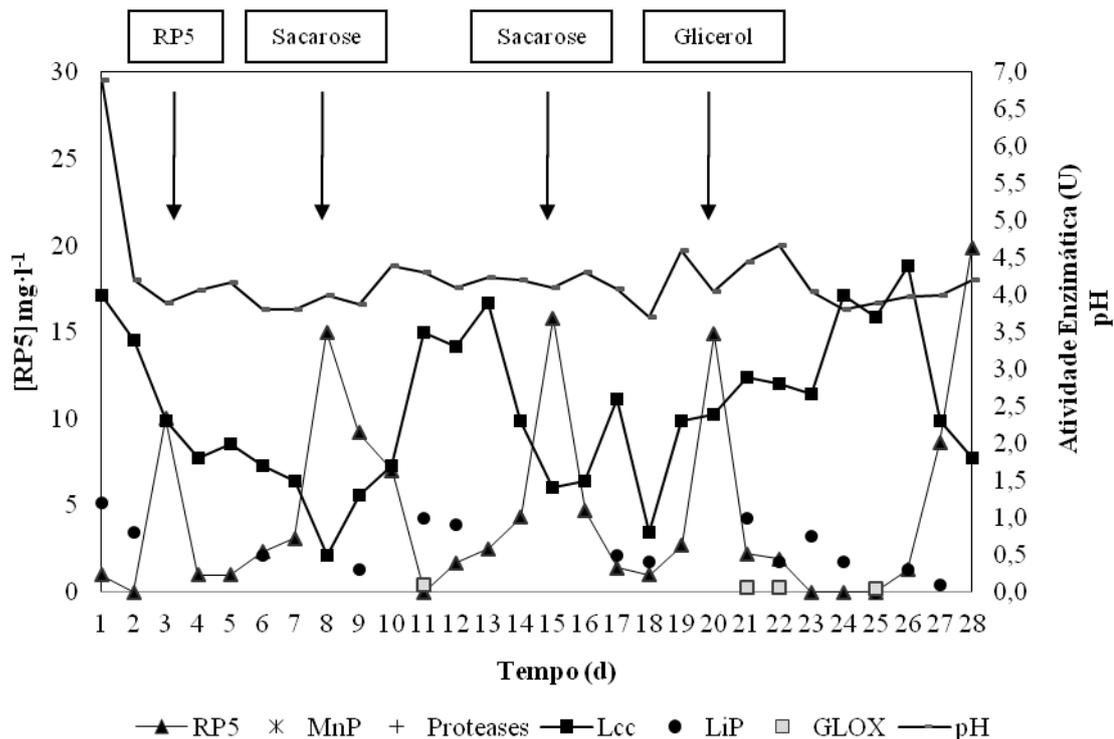
**Figura 4.20.** Descoloração de RP5 por células livres da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100. Meio alcalino ajustado a pH 9,5.

O segundo ensaio também foi conduzido com células livres da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100. Neste caso, avaliou-se a capacidade do microrganismo em descolorir RP5 em ambientes alcalino e com elevada concentração de NaCl. Os resultados relativos ao segundo ensaio estão apresentados na Figura 4.21. O ensaio teve a mesma duração que o anterior, e nas primeiras 48 h, após ter sido adicionada cerca de  $3,22 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de biomassa da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 ao reator, ocorreu a degradação de 100 % do corante existente no meio. No fim desta etapa em “batch”, foi iniciado o processo contínuo de alimentação do corante a um caudal fixo de corante.

A adição do 1º pulso da solução de sacarose ocorreu no 8º dia e promoveu o aumento da taxa de descoloração na faixa de 90 a 100 % de descoloração entre o 9º e 14º dias. A mesma taxa de descoloração foi obtida 24 h após o 2º pulso de sacarose no 15º dia e foi mantida até ao 19º dia deste ensaio. No que diz respeito ao glicerol, após um 1º pulso no 20º dia do ensaio, observou-se a descoloração total do corante entre o 23º e 25º dias. Neste mesmo período foi detectada a atividade máxima de Lcc, correspondendo ao valor de 4 U. Este valor foi 1,14 vezes superior ao obtido na atividade desta enzima no 1º ensaio. A maior atividade de LiP foi detectada no 21º dia de ensaio, após 24 h o pulso

de glicerol. Valores residuais de GLOX foram determinados apenas no 11º, 21º, 22º e 25º dias. Neste ensaio não foram detectadas atividades de MnP e proteases.

Tal como ocorreu no ensaio anterior, a progressiva diminuição do pH do meio de cultura ao longo do processo fermentativo foi detectada, mesmo com a constante introdução da fonte de alimentação ajustada a pH 10,0. Verificou-se também que a cada pulso das fontes de carbono estudadas ocorreu um aumento excessivo da biomassa, provocando uma obstrução da entrada de ar no sistema, obrigando a purga de biomassa.

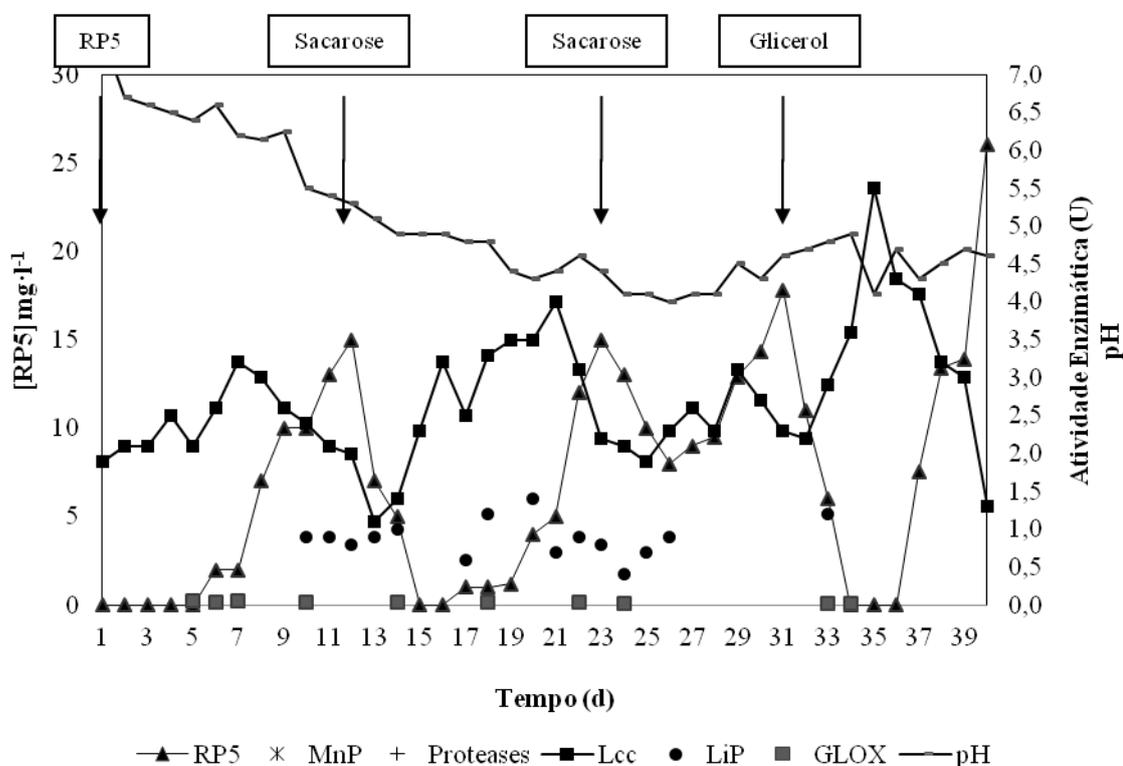


**Figura 4.21.** Descoloração de RP5 por células livres da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100. Meio alcalino ajustado a pH 9,5 e concentração de NaCl de 15 g.l<sup>-1</sup>.

O terceiro ensaio foi realizado com a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EPO. Avaliou-se a capacidade de degradação de RP5 a pH e concentração de NaCl elevadas. A quantidade de biomassa imobilizada introduzida no reator foi cerca de 4,21 g.l<sup>-1</sup>. Os resultados relativos ao terceiro ensaio estão apresentados na Figura 4.22.

O ensaio decorreu num período de 40 dias e nas primeiras 24 h 100 % do corante foi descolorido, sendo então inserida a fonte de alimentação contínua. Ao longo do ensaio observou-se um aumento de biomassa no suporte, sendo que no final do ensaio o valor de biomassa aderida ao suporte foi de 12,3 g.l<sup>-1</sup>. A adição do 1º pulso de sacarose ocorreu no 12º dia e promoveu a elevação da taxa de descoloração na faixa de 90 a 100 % entre

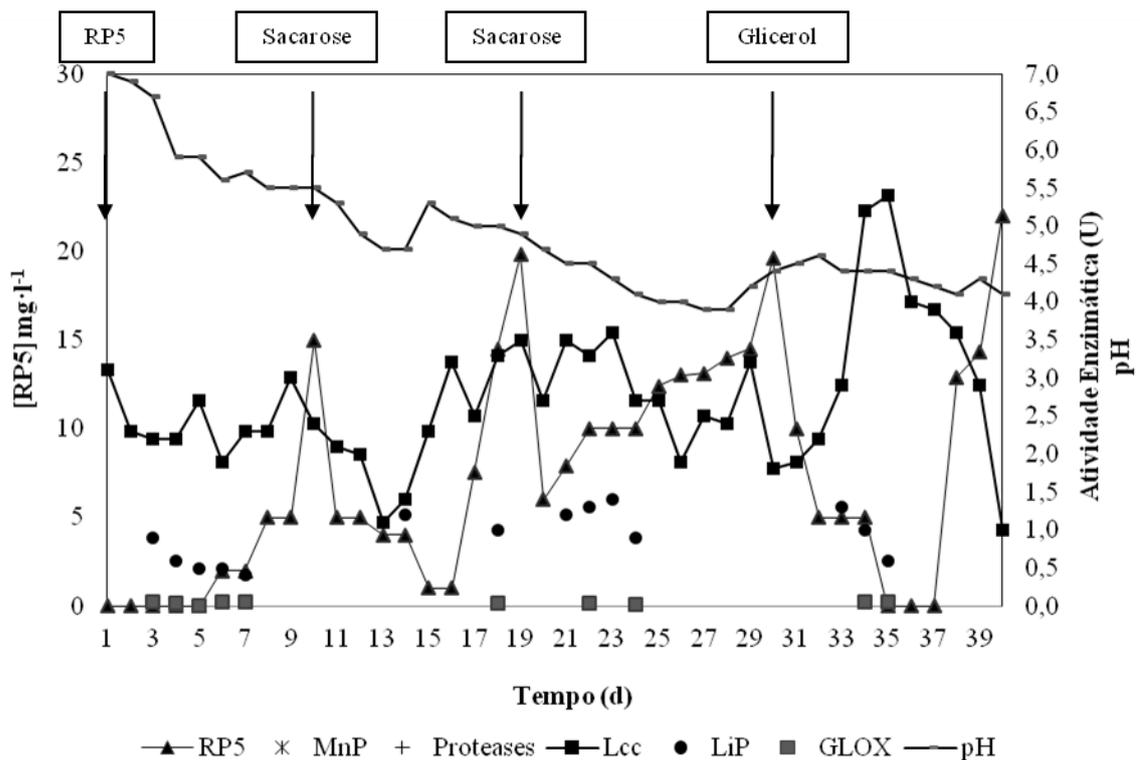
o 13º e 21º dias. Após o 2º pulso de sacarose, no 23º dia, a taxa de descoloração foi mantida a acima de 90 % até o 28º dia de ensaio. Em concordância aos resultados obtidos no 1º e 2º ensaio com células livres, após um pulso de glicerol no 31º dia do ensaio, observou-se a descoloração total do corante entre o 34º e 36º dias. Neste mesmo período, foi detectada a atividade máxima de Lcc, correspondendo ao valor de 5,5 U. A maior atividade de LiP foi detectada no 20º dia de ensaio, após o 1º o pulso de sacarose. Valores residuais de GLOX foram determinados no decorrer do ensaio. Não foram detectadas atividades de MnP e proteases. Como no ensaio anterior, foi detectada a progressiva diminuição dos valores de pH no meio de cultura ao longo do processo fermentativo.



**Figura 4.22.** Descoloração de RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EPO. Meio alcalino ajustado a pH 9,5 e concentração de NaCl de 15 g·l<sup>-1</sup>.

No quarto ensaio de descoloração de RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, EN foi usado como suporte da biomassa, nas mesmas condições e durante o mesmo período de tempo correspondente ao 3º ensaio. A quantidade de biomassa imobilizada introduzida no reator foi cerca de 4,68 g·l<sup>-1</sup>. Os resultados relativos ao quarto ensaio estão apresentados na Figura 4.23.

Nas primeiras 24 h o corante foi totalmente descolorido tendo sido inserida a fonte de alimentação contínua. Observou-se o aumento de biomassa no suporte ao longo do ensaio, sendo que ao final do processo o valor de biomassa aderida ao suporte foi de 14,5 g·l<sup>-1</sup>. A adição do 1º pulso de sacarose ocorreu no 10º dia e promoveu o aumento da taxa de descoloração na faixa de 90 a 100 % entre o 12º e 17º dias. Após o 2º pulso de sacarose, no 19º dia, a taxa de descoloração foi mantida com mesmo percentual 90 % até o 24º dia de ensaio. Após o pulso de glicerol, no 30º dia do ensaio, observou-se a descoloração total do corante entre o 34º e 36º dias e neste mesmo período foi detectada a atividade máxima de Lcc, correspondendo ao valor de 5,4 U. A maior atividade de LiP foi de 1,4 U, detectada no 23º dia de ensaio, após o 2º pulso de sacarose. Valores residuais de GLOX foram determinados no decorrer do ensaio. Não foram detectadas atividades de MnP e proteases. Tal como no ensaio anterior, foi detectada uma progressiva diminuição do pH.



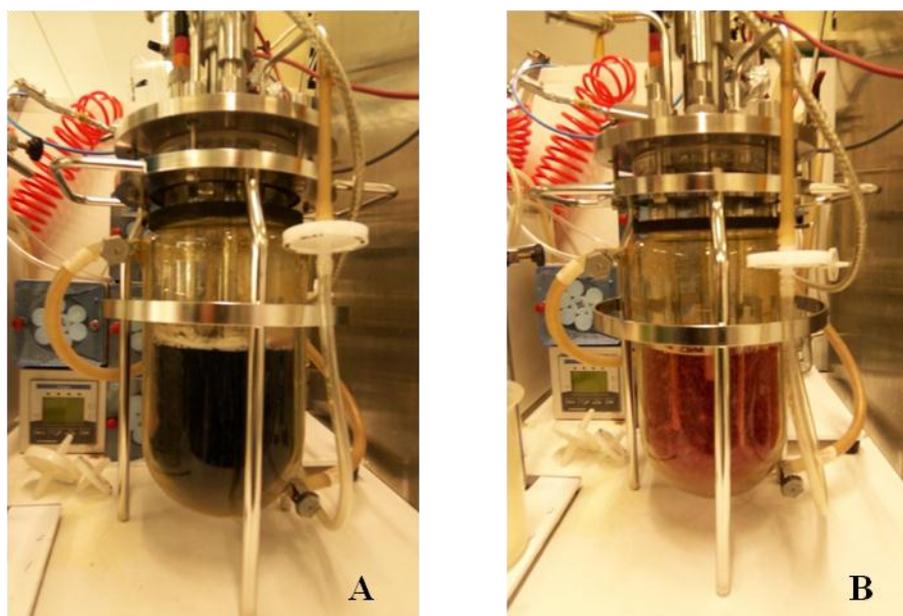
**Figura 4.23.** Descoloração de RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 imobilizada em EN. Meio alcalino ajustado a pH 9,5 e concentração de NaCl de 15 g·l<sup>-1</sup>.

Os valores máximos de atividade da Lcc foram semelhantes (5,5 U) nos dois ensaios com células imobilizadas em suportes sintéticos, o que representa uma atividade 1,25 vezes maior quando comparado com a atividade máxima desta enzima num ensaio

com as mesmas condições utilizando-se células livres. Assim, os resultados indicam que a Lcc foi a enzima lignolítica mais eficiente envolvida na descoloração do corante.

### 4.3.2. Estudos em condições “*fed-batch*”

Dois ensaios independentes foram realizados num reator de bancada de 2 l (Figura 4.24), contendo 1 l de MCL (Seção 3.2.2.2) ajustado inicialmente a pH 8,0. Como inóculo foi adicionada aproximadamente 10,0 g·l<sup>-1</sup> de biomassa da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100.

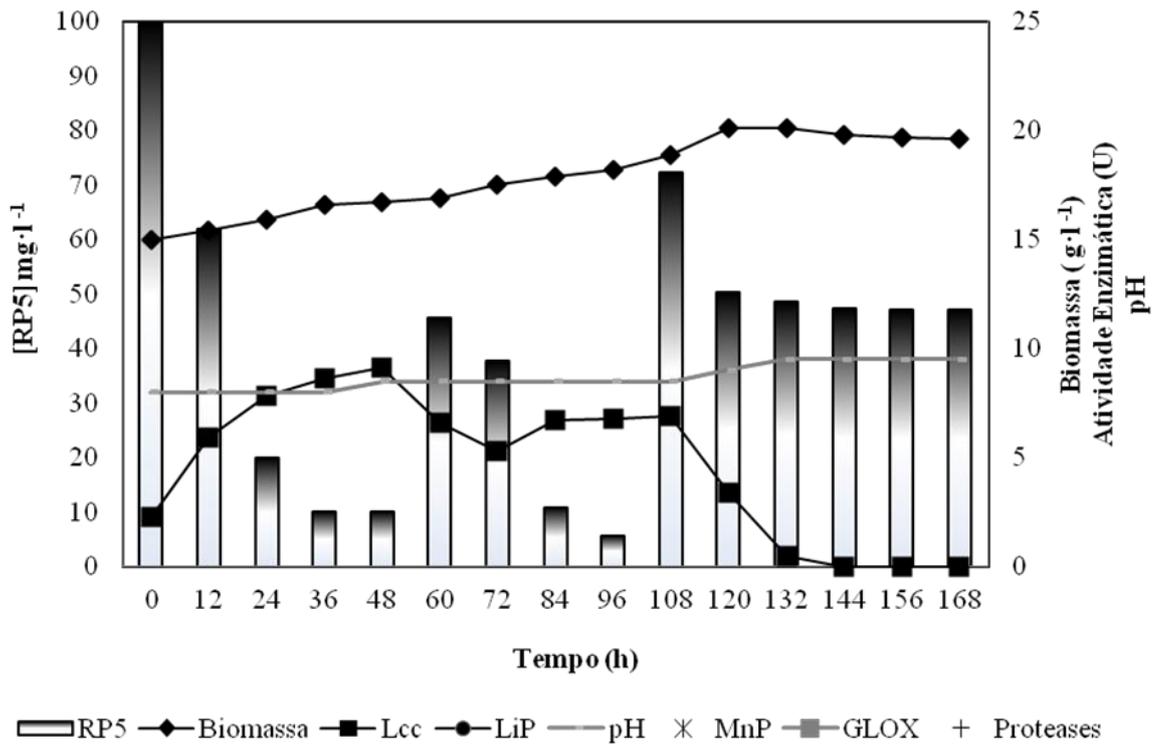


**Figura 4.24.** Descoloração de RP5 em reator de bancada de 2 l pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100. **A:** Reator com MCL inoculado com a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100; **B:** Reator após 4 h de fermentação. Condições: pH (8,0-9,5), 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.

Após 48 h do início da fermentação (Figura 4.25) a estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 apresentou uma taxa de descoloração de 90 %. Neste mesmo período foi também detectado o pico máximo de atividade da Lcc (9,1 U). Deste modo, o microrganismo foi exposto a uma nova condição, onde efetuou-se um 1º pulso de solução do corante e elevou-se o pH do MCL a 8,5. Nas 24 h posteriores ao início da fermentação, a descoloração de RP5 foi de 62,4 %. Diante desta redução na taxa de descoloração, efetuou-se um pulso de solução de sacarose às 72 h de fermentação, com o intuito de aumentar a atividade metabólica do microrganismo. Uma vez obtida uma taxa de descoloração de 94,6 % em 96 h de fermentação, efetuou-se então, um 2º pulso da solução do corante e também elevou-se a alcalinidade do meio a pH 9,0. Nesta nova

condição, ocorreu a gradativa redução da capacidade do microrganismo em descolorir o corante.

Em 120 h de ensaio, apesar do aumento de biomassa no reator, a concentração do corante manteve-se próxima dos 50 %. Evidenciando-se a redução da vitalidade do fungo e a sua atividade no consumo do corante.

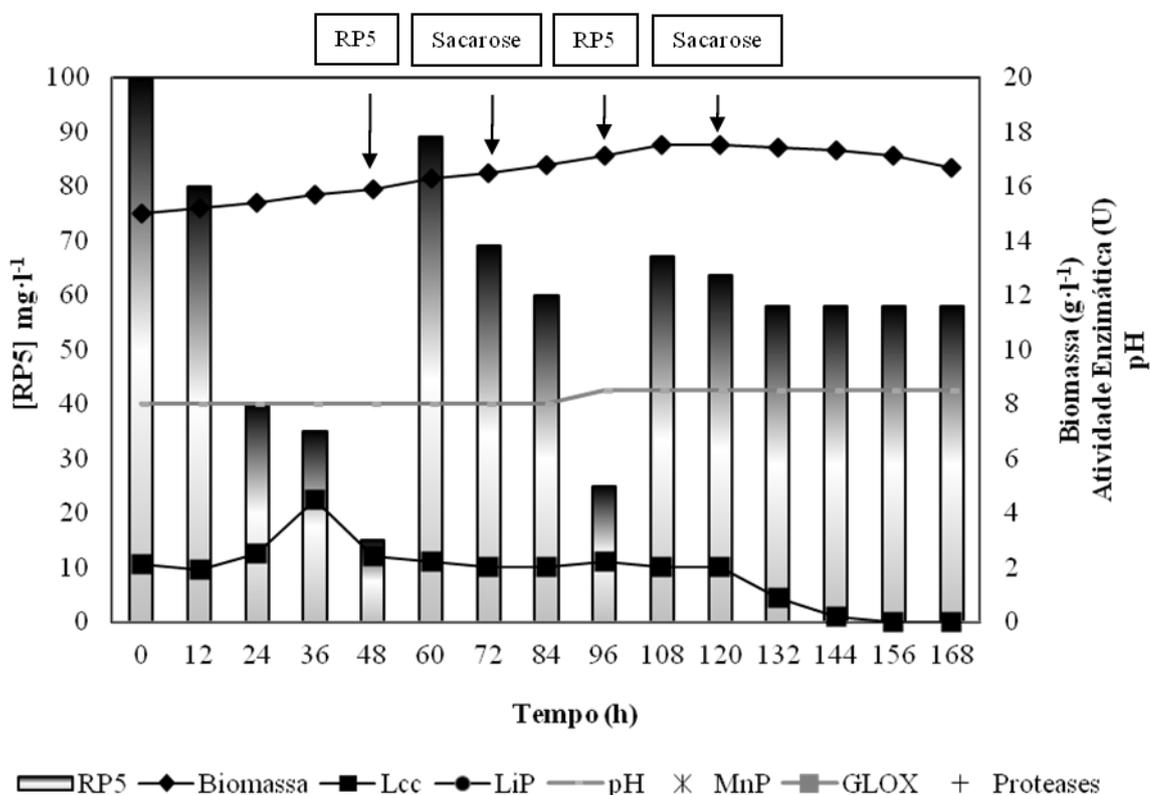


**Figura 4.25.** Descoloração de RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em MCL com o pH ajustado a 8,0-9,5. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.

Com o intuito de avaliar a máxima capacidade da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em suportar condições extremas de alcalinidade na presença de RP5, ajustou-se o pH meio fermentativo a 9,5 e um 2º pulso de solução de sacarose foi efetuado. No intervalo de tempo entre 144 e 168 h, não ocorreu detecção desta enzima, exceto às 132 h de fermentação, onde foram detectados valores residuais de Lcc (0,5 U). Também não foram detectadas outras enzimas envolvidas na descoloração de RP5 durante todo o ensaio.

A total inativação do fungo e ausência de qualquer atividade metabólica foi verificada posteriormente em MCS de igual composição ao MCL, para além de meio de cultura enriquecido MEA.

No segundo ensaio foi adicionado 15 g·l<sup>-1</sup> de NaCl ao MCL e o pH inicial foi também ajustado a 8,0. Todos os demais procedimentos operacionais e analíticos, foram realizados de acordo com o 1º ensaio, descrito acima, e os resultados são apresentados na Figura 4.26.



**Figura 4.26.** Descoloração de RP5 pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 em MCL o pH ajustado a 8,0-9,5 e 15 g·l<sup>-1</sup> de NaCl. Condições: 150 rpm durante 7 dias a 30 °C.

A estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 foi capaz de descolorir RP5 a 85 % após 48 h de fermentação. Neste período, a máxima atividade da Lcc (4,5 U) também foi detectada, sendo então efetuado o 1º pulso de uma solução composta do corante e NaCl. Ao término do 3º dia de ensaio (72 h), 31 % do corante havia sido descolorido. Deste modo, fez-se o 1º pulso de solução de sacarose. Após 96 h de fermentação a descoloração do corante foi de 75 %. Efetuou-se, então, o 2º pulso de uma solução composta do corante e NaCl e ajustou-se o meio de cultura a pH 8,5. Em 120 h de fermentação 66,3 % do corante foi degradado. Um 2º pulso da solução de sacarose foi adicionado ao meio de cultura. Mesmo assim, após 144 h de fermentação a taxa de descoloração obtida foi de 55 % e no mesmo tempo não foi detectada atividade da Lcc. Ao longo deste ensaio não

foram detectadas atividades de outras enzimas. Ao fim de 168 h de fermentação efetuou-se o mesmo procedimento descrito no 1º ensaio anterior, verificando-se a viabilidade do microrganismo em meio de cultura sólido, constatando-se ausência de crescimento.

#### 4.4. Expressão gênica de lacase

Neste estudo, as técnicas northern blot e reação de transcriptase reversa de cadeia de polimerase (RT-PCR) foram utilizadas.  $\beta$ - Tubulina, sendo expressa constitutivamente, foi utilizada como controle. As amostras do RNA total da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 foram extraídas em MCL (Seção 3.2.2.2) com pH ajustado a 5,45 e 9,5 na presença do corante RP5. Três diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) foram avaliadas como indutoras na expressão da enzima referenciada. As amostras foram retiradas às 48, 72, 96, 120 e 144 h, após a inoculação.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 4.27) após a revelação da membrana (16 h de incubação) não foi detectado qualquer sinal, incluindo-se o controle positivo (DNA, estirpe *T. versicolor* MUM 04.100).

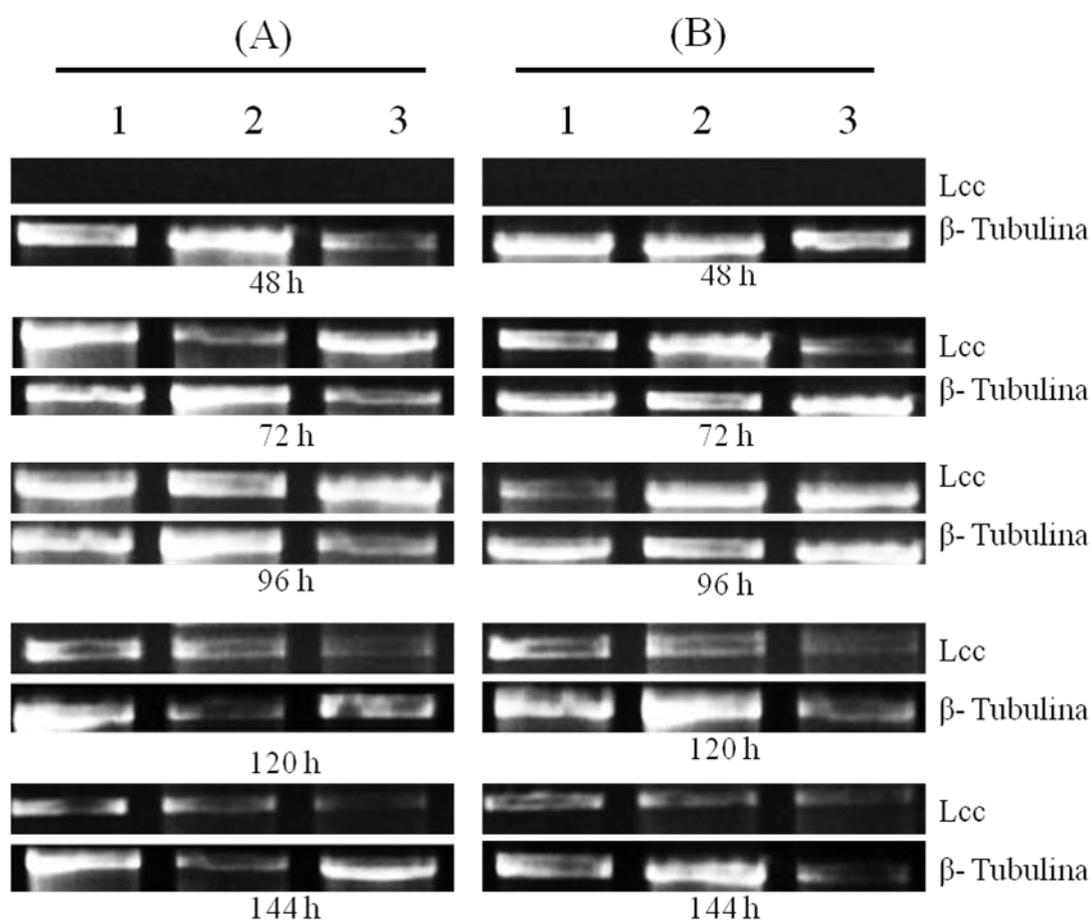


**Figura 4.27.** Membrana de “nylon” sem carga utilizada para a detecção da expressão gênica da Lcc da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, com diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos por Northern blot. Sendo (↓) o controle positivo.

Um novo ensaio foi realizado, alterando-se alguns procedimentos durante a execução da técnica de modo a otimizar as condições necessárias para detecção. As amostras de RNA foram novamente quantificadas e, após a corrida em mini-gel de MOPS/Formaldeído, fez-se a visualização no sistema Gel-Doc (BioRad). Constatou-se então a integridade das amostras e eliminou-se a hipótese de degradação do RNA. Posteriormente, após a transferência para a membrana, o gel foi novamente visualizado no sistema Gel-Doc (BioRad), constatando-se uma total transferência para a membrana. Repetiu-se o protocolo com o dobro da concentração da sonda e diminuição da temperatura de hibridização, de modo a diminuir a especificidade de ligação da sonda.

Aumentou-se o tempo de exposição à solução reveladora do kit (NBT/BCIP Stock Solution). Embora tais procedimentos tenham sido efetuados, nenhum sinal foi obtido.

Considerando-se um possível problema na hibridização, conduziu-se um ensaio onde para além dos procedimentos descritos, diminuiu-se a temperatura de pré-hibridização de 62 °C para 50 °C e de hibridização de 50 °C para 42 °C. Com isto, tentou-se aumentar a especificidade da sonda. Mesmo com a adaptação de tais procedimentos não foi possível detectar qualquer sinal da expressão gênica da *Lcc* com esta técnica. Deste modo, a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) foi o método alternativo de análise testado para determinar os níveis de expressão do gene da *Lcc*. Diante dos resultados obtidos (Figura 4.28) tornou-se evidente a vantagem na utilização desta técnica, uma vez que existia uma quantidade limitada de amostra.

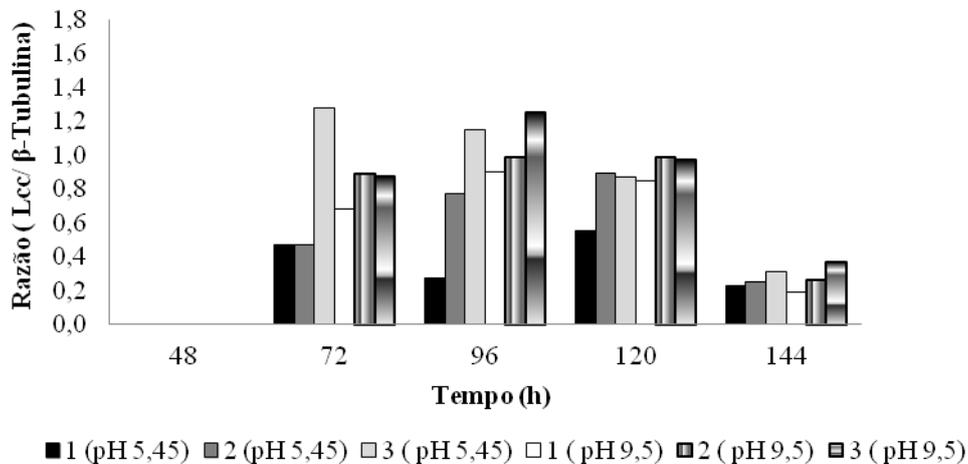


**Figura 4.28.** Detecção da expressão gênica da *Lcc* sintetizada pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, em diferentes condições por RT-PCR. Colunas (A) MCL sem ajuste de pH; (B) MCL a pH 9,5. Fontes de carbono analisadas - Colunas (1) glicose, (2) sacarose, (3) glicerol.

As imagens foram submetidas à análise densitométrica. Este programa permitiu a seleção e quantificação dos *pixels* da área correspondente à cada banda existente no gel, podendo-se verificar a expressão da enzima pela medição da intensidade relativa. Os resultados apresentados na Figura 4.29 determinaram a expressão da Lcc pela razão da densidade desta enzima, em relação ao gene constitutivo  $\beta$ -Tubulina.

A fonte de carbono que induziu a maior expressão da Lcc foi o glicerol, seguidamente de sacarose e glicose. Ao longo do tempo de estudo ocorreram diferenças na expressão da enzima. A maior expressão de Lcc foi detectada a pH 5,45, após 72 h. Diante conjunto de resultados obtidos nas amostras avaliadas nos demais tempos de estudo a condição alcalina favoreceu a expressão desta enzima.

Verificou-se nas últimas amostras analisadas no tempo de 144 h, a brusca redução da expressão da enzima em quaisquer condições estudadas. Comparando-se os resultados obtidos no primeiro tempo em que foi detectada Lcc (72 h), ocorreu uma redução na expressão da mesma em MCL alcalino de 2,35, 3,42 e 3,57 vezes para as fontes de carbono glicerol, sacarose e glicose, respectivamente.



**Figura 4.29.** Expressão da enzima Lcc da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 por RT-PCR, determinada por análise densitométrica. Fontes de carbono analisadas: (1) glicose, (2) sacarose, (3) glicerol, a valores de pH iniciais de 5,45 e 9,5.



---

## **Capítulo 5** *Discussão*

---



## 5.1. Seleção de estirpes de Fpb na descoloração de corantes têxteis

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a capacidade de doze estirpes de fungos da Fpb em descolorir o azo corante Reativo Preto 5 (RP5) em condições restritivas de alcalinidade e salinidade.

Inicialmente as estirpes foram pré-adaptadas a diferentes concentrações dos corantes RP5 e PR478, sendo extensivamente avaliadas em MCS contendo os corantes RP5 e PR78. O corante PR478 foi selecionado como composto modelo, por ser resistente à degradação e possuir uma estrutura complexa semelhante a lignina (Moreira *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2004).

Definida a concentração limite dos corantes RP5 e PR478 que não causasse efeito inibitório no crescimento das estirpes, os microrganismos foram expostos à condições restritivas de alcalinidade e salinidade.

Os melhores resultados foram obtidos com diferentes estirpes de *Trametes versicolor* mesmo em condições restritivas. Tais resultados estão de acordo com diversos estudos (Romero *et al.*, 2006; Blánquez *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2009; Pazarlioglu *et al.*, 2010; Youshuang *et al.*, 2011) que descreveram a capacidade de estirpes desta espécie de Fpb em descolorir diferentes classes de corantes.

A estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15 (ATCC 24725) foi mantida no passo seguinte dos experimentos, uma vez que é considerada um microrganismo de referência em estudos de descoloração e degradação de corantes como anteriormente referido na Seção 1.3.2.

Os resultados obtidos em MCS reforçam relatos de trabalhos anteriores que definem este método como simples e eficiente para a bioprospecção de fungos com novas enzimas ligninolíticas de potencial aplicação industrial (Patrick *et al.*, 2010)

## 5.2. Descoloração de corantes têxteis em Erlenmeyers

A capacidade de *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 04.100, MUM 04.101 e *P. chrysosporium* MUM 94.15 em descolorir os corantes RP5 e PR478 foi avaliada em condições similares às descritas aos efluentes da indústria têxtil. A exposição destes microrganismos aos dois corantes, nos ensaios iniciais, evidenciaram uma maior capacidade dos fungos em descolorir o corante RP5 em comparação ao PR478. Dentre alguns estudos descritos em literatura, Barrasa *et al.* (2009); Enayatizamir *et al.* (2009); Enayatizamir *et al.* (2011) relatam a capacidade das estirpes de Fpb (*Polyporus*

*alveolares*, *Trametes pubescens*, *Phanerochaete chrysosporium*) respectivamente, descolorirem o corante RP5.

No presente estudo as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram altas taxas de descoloração do corante RP5 em condições extremas de alcalinidade, embora muitos estudos descritos na literatura destaquem melhores resultados de descoloração em condições ácidas (Lu *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Sukumar *et al.*, 2009; Mazmanci e Unyayar, 2010; Vaithanomsat *et al.*, 2010a; Hadibarata *et al.*, 2012), devido a uma maior estabilidade das enzimas ligninolíticas envolvidas no processo de descoloração dos corantes.

Adicionalmente, novos ensaios foram realizados com as 4 estirpes de Fpb, utilizando-se o corante RP5 em MCL alcalino e na presença de diferentes concentrações de NaCl. Nesta condições restritivas, as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 apresentaram as maiores taxas de descoloração. Em ambas etapas de estudo as maiores atividades enzimáticas detectadas foram de Lcc. Estes resultados estão de acordo com estudos desenvolvidos por (Zille *et al.*, 2003; Maalej-Kammoun *et al.*, 2009; Birhanli e Yesilada, 2010; Niebisch *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2011; Zhuo *et al.*, 2011) que descreveram a enzima Lcc sintetizada por diferentes Fpb, como a principal responsável pela descoloração de diferente classes de corantes.

Segundo Niebisch *et al.* (2010) a enzima Lcc putativa de baixo peso molecular obtida do extrato solúvel da estirpe *Lentinus crinitus* IOC 4579, foi a responsável pela descoloração do corante Reativo Azul 220, apresentando uma boa tolerância a diferentes valores de pH e concentrações de NaCl. Também, Neto *et al.* (2011) avaliaram a capacidade de vinte e cinco estirpes de Fpb em descolorir o corante Reativo Azul 19 em condições alcali-salinas. De acordo com os resultados obtidos, as estirpes *Pleurotus ostreatus* (CCIBT2347), *Peniophora cinerea* (CCIBT2541) e *Trametes villosa* (CCIBT2628) foram consideradas promissoras para a biodegradação deste corante.

Outros resultados importantes e que corroboram com os dados acima apresentados foram obtidos por Zhuo *et al.* (2011). Estes autores avaliaram a capacidade da estirpe *Ganoderma* sp. em descolorir 4 diferentes corantes sintéticos e efluentes têxteis simulados e reais. De acordo com os resultados obtidos, a principal enzima envolvida no processo de descoloração foi a Lcc. A taxa de descoloração obtida no tratamento de efluente têxtil real (caracterizado por altos valores de pH e concentração de sais em suas composição) com a estirpe anteriormente referida, foi de 91,38 % em um prazo de 14 dias. Por outro lado, resultados contrários foram apresentados por Maalej-Kammoun

*et al.*, (2009) que descreveram que  $0,1 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  da enzima Lcc de *Trametes sp.* utilizada em mistura de reação foi suficiente para descolorir 97 % do corante Verde Malaquita na concentração inicial de  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , entretanto, a enzima foi completamente inibida quando exposta à concentração de 100 mM de NaCl.

Em outro estudo, conduzido por Zilly *et al.* (2011) foi constatada a inibição da enzima Lcc sintetizada pela estirpe *Ganoderma lucidum* na presença de NaCl, mesmo em baixas concentrações, embora o mesmo efeito não tenha ocorrido na presença de  $\text{NaSO}_4$ . Neste estudo, os autores descrevem a capacidade da enzima em descolorir o corante RBBR na presença de 1,0 M de  $\text{NaSO}_4$  e a 0,1 M de NaCl, onde obtiveram uma taxa de 100 % e 50 %, respectivamente.

Observando-se os resultados apresentados na literatura, os dados obtidos no presente estudo, indicam que as 4 estirpes selecionadas, apresentaram um comportamento específico em relação aos corantes selecionados e às condições do meio de cultura. As estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100 foram consideradas como alternativas promissoras para a descoloração do efluente simulado alcali-salino. Ressalta-se, contudo, a importância da estratégia de pré-adaptar os microrganismos às condições à que serão expostos. Acrescenta-se ainda, que a descoloração dos corantes avaliados foi dependente da atividade das enzimas envolvidas no processo de descoloração, uma vez que não ocorreu adsorção significativa dos corantes a biomassa fúngica.

A correlação positiva significativa entre as enzimas Lcc, LiP e GLOX e a descoloração dos corantes selecionados para o estudo, demonstraram que estas enzimas podem ter desempenhado um papel chave na descoloração destes corantes sintéticos. Tal resultado não surpreende dada a semelhança estrutural dos corantes com as sub-unidades da lignina, que são passíveis de transformação pela ação das LMEs, destacando-se as Lcc.

### **5.3. Utilização de células imobilizadas para descoloração de corantes**

A imobilização de *T. versicolor* MUM 04.100 nos suportes sintéticos espuma de poliuretano (EPO) e esponja de “nylon” (EN), viabilizou a utilização do microrganismo por um maior período na descoloração de RP5 em condições restritivas.

O desempenho do microrganismo aderido aos dois suportes permitiu a remoção do corante por 6 e 7 ciclos para EPO e EN, respectivamente, em valores iguais ou

superiores a 85 %, sinalizando a possível utilização deste microrganismo imobilizado por um maior tempo e em maior escala.

Durante os vários ciclos em que o microrganismo foi exposto ao corante observou-se a sucessiva redução da atividade das enzimas ligninolíticas envolvidas no processo de descoloração. Nos últimos ciclos fermentativos foi detectada apenas a atividade da Lcc. Tais resultados sinalizam a enzima Lcc como a principal responsável pela descoloração de RP5, uma vez que nos controles não foram detectadas adsorções do corante. Deste modo tornou-se necessária uma maior investigação desta enzima na descoloração do corante RP5.

Resultados semelhantes quanto a utilização de Fpb imobilizados em diferentes suportes são descritos por Park *et al.* (2006) e Enayatzamir *et al.* (2010) que relatam a eficiência das estirpes *Funalia trogii* e *P. chrysosporium* imobilizadas em alginado de sódio e cálcio respectivamente, em descolorir diferentes corantes tais como Preto Ácido 52, Violeta Direto 51, Reativo Preto 5 e Bismark Marrom R. Segundo Park *et al.* (2006), a taxa de descoloração obtida com células imobilizadas de *Funalia trogii* foi superior quando comparada a células livres. A descoloração manteve-se estável nos experimentos realizados em “batch” por um período de tempo de pelo menos 300 h. Do mesmo modo, Enayatzamir *et al.* (2010) descrevem melhores taxas de descoloração do corantes estudados quando utilizou-se célula imobilizada podendo-se fazer a reutilização das mesmas por três ciclos operados em “batch”.

#### 5.4. Descoloração de RP5 em reatores

O efeito das condições simuladas às características dos efluentes têxteis para a descoloração do RP5 foi estudado utilizando-se o Fpb *T. versicolor* MUM 04.100 em diferentes reatores. Existem alguns estudos conduzidos em reatores com efluentes têxteis simulados ou reais utilizando diferentes estirpes de Fpb (Nilsson *et al.*, 2006; Casieri *et al.*, 2008; Anastasi *et al.*, 2010; Novotný *et al.*, 2011). Porém, a maioria desses estudos não considera parâmetros peculiares às características dos efluentes têxteis tais como pH alcalino e presença de sais na composição no meio de cultura de estudo (Rodríguez Couto *et al.*, 2006b; Zahmatkesh *et al.*, 2010).

A estirpe *T. versicolor* assim como outrass Fpb, são alvo de muitos trabalhos onde se avalia a capacidade destes microrganismos em descolorir uma diversidade de corantes existentes na composição dos efluentes da indústria têxtil. Neste ensaio foi possível

observar que o microrganismo foi capaz de suportar condições extremas de alcalinidade e salinidade. Entretanto, ao contrário do que ocorreu nos ensaios em Erlenmeyers e sistema contínuo com retenção de biomassa, no “*fed-batch*” o microrganismo foi forçado a suportar o valor de pH definido, sendo que nos ensaios anteriormente referidos ocorreu a rápida acidificação do MCL. Nestas condições, ocorreu a redução do tempo de atividade da enzima Lcc.

As maiores atividades enzimáticas detectadas em ambos reatores estudados foram de Lcc. A fonte de carbono glicerol induziu o microrganismo a uma maior atividade desta enzima. Tais resultados estão de acordo com estudos conduzidos por Rodríguez Couto *et al.* (2006a) e Kumar *et al.* (2012).

### 5.5. Expressão gênica de enzimas ligninolítica

De acordo com Font *et al.* (2003) o fungo *T. versicolor* pode produzir Lcc, MnP e LiP. Mediante os resultados obtidos previamente em MCL e em reatores, onde se detectou a presença das enzimas ligninolíticas Lcc e LiP nas amostras analisadas, realizou-se um estudo para verificar o nível de expressão gênica destas enzimas em MCL composto com diferentes fontes de carbono (co-substrato). Considerando-se alguma interferência na detecção da atividade a MnP foram desenhados “*primers*” específicos para a verificação de uma possível expressão gênica desta enzima, o mesmo procedimento ocorreu para as enzimas LiP e Lcc. Contudo, apesar de tentativas exaustivas para se detectar a expressão gênica das enzimas LiP e MnP, apenas Lcc foi sequenciada.

Uma vez que a quantificação do RNA mensageiro é a principal forma de investigar a expressão de um gene específico e baseando-se em relatos da literatura (Padmavathy *et al.*, 2003; Mendez-Paz *et al.*, 2003; Mendez-Paz *et al.*, 2005; Cing e Yesilada, 2004; Rodríguez Couto *et al.*, 2006a; Niebisch *et al.*, 2010), que destacam o efeito indutor de diferentes fontes de carbono na descoloração de corantes, um conjunto de ensaios moleculares foi realizado. Duas técnicas foram aplicadas para a determinação da expressão gênica de Lcc, sendo a primeira feita pelo método tradicional *Northern blot*. Inúmeras tentativas para a obtenção da expressão gênica de Lcc foram efetuadas, porém não foi possível detectar qualquer sinal da expressão da enzima relatada. González *et al.* (2003) descrevem que a utilização desta tradicional técnica é limitada e difícil para os fungos que têm a família destes genes, porque a homologia entre os genes de uma

família complica a seleção de sondas específicas. Para além disto, existem outras limitações associadas à técnica, como a degradação ou redução da qualidade das amostras de RNA durante a eletroforese, assim como possíveis problemas nas etapas posteriores relacionadas à hibridização, ocasionando uma menor sensibilidade de detecção quando comparada a outras técnicas mais recentes.

Diante deste contexto, a técnica reação de transcriptase reversa de cadeia de polimerase (RT-PCR) foi utilizada. Exceto nas primeiras 48 h de incubação, o gene da Lcc foi expresso em diferentes níveis no período compreendido entre 72 e 144 h, sendo que os maiores valores obtidos ocorreram no período de 72 e 96 h, com posterior redução ao longo do tempo de estudo. A estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 apresentou uma maior expressão desta enzima quando utilizado o glicerol como fonte de carbono, seguida de sacarose e glicose. A fonte de carbono glicerol, também foi descrita como um excelente indutor na síntese de Lcc para as estirpes *Trametes hirsuta* e *Pleurotus ostreatus* em estudos conduzidos por Rodríguez Couto *et al.* (2006a) e Kumar *et al.* (2012), respectivamente.

Segundo Baldrian (2006) as Lcc fúngicas exibem tipicamente um pH ótimo em condições ácidas, contudo os resultados obtidos neste estudo indicaram que uma maior expressão da enzima foi obtida em condições alcalinas. Resultados similares foram obtidos por Zouari-Mechichi *et al.* (2006) e Michniewicz *et al.* (2006) com as estirpes *Trametes trogii*, e *Cerrena unicolor*, onde a enzima Lcc apresentou estabilidade elevada em valores de pH que variaram entre o neutro e alcalino.

---

## **Capítulo 6** *Conclusão*

---



## 6.1. Conclusões gerais

A metodologia aplicada e apresentada neste estudo, forneceu novas informações no que diz respeito à seleção e utilização de Fpb no tratamento de efluentes têxteis. Foi avaliada a capacidade, de doze estirpes de Fpb (*Bjerkandera adusta* MUM 99.04; *Fomes fomentarius* MUM 04.102; *Ganoderma applanatum* MUM 04.103; *Irpex lacteus* MUM 98.04, *Phanerochaete chrysosporium* MUM 94.15 e 95.01; *Pleurotus ostreatus* MUM 94.08 e *Trametes versicolor* MUM 94.04; 04.100; 04.101; 04.104 e 04.105), para descolorir os corantes RP5 e PR478. A pré-adaptação às condições que simulam os efluentes têxteis determinou um melhor desempenho das estirpes. As estirpes *T. versicolor* MUM 94.04; 04.100; MUM 04.101 e *P. chrysosporium* MUM 94.15 apresentaram-se capazes de descolorir os corantes RP5 e PR478 em MCS alcalino. Diante dos critérios adotados e comparando-se o desempenho destas estirpes, o melhor conjunto de resultados ocorreu quando o corante RP5 foi utilizado. Em MCS alcali-salino, na presença do corante RP5, os melhores resultados de descoloração foram restritos às estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e MUM 04.100.

Os ensaios conduzidos em Erlenmeyers com as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04, MUM 04.100, MUM 04.101 e *P. chrysosporium* MUM 94.15 foram realizados nos mesmos padrões descritos para o MCS. Nas condições otimizadas em meio alcali-salino, as estirpes *T. versicolor* MUM 94.04 e 04.100 suportaram as condições restritivas a que foram expostas. A presença dos corantes na composição do MCL desencadeou um aumento no crescimento celular das estirpes avaliadas. Nestes ensaios observou-se a relação intrínseca entre formação de biomassa e descoloração do corante, muito embora não tenha ocorrido adsorção significativa, sendo possível afirmar que o principal mecanismo de descoloração utilizado pelos microrganismos foi enzimático.

A Lcc foi a principal enzima ligninolítica sintetizada pelas estirpes de *T. versicolor* MUM 94.04; 04.100 e 04.101. Enquanto que, para a estirpe *P. chrysosporium* MUM 94.15 a principal enzima foi a LiP. A enzima Lcc, sintetizada pela estirpe *T. versicolor* MUM 04.100, apresentou-se estável perante variações de pH e concentração de NaCl. Com a metodologia adotada neste conjunto de experimentos não foi detectada a atividade da enzima MnP nas estirpes selecionadas. Contudo, não se pode afirmar que a mesma não tenha sido sintetizada, necessitando-se de uma maior investigação.

A utilização dos suportes sintéticos EPO e EN para a imobilização da estirpe *T. versicolor* MUM 04.100 proporcionou a formação de biofilme aderido à superfície do suporte, garantindo a estabilidade das colônias e permitindo a manutenção de uma alta taxa de descoloração, por um período superior ao obtido com células livres. Do ponto de vista econômico, a EPO apresenta vantagens devido, principalmente, ao baixo custo quando comparada a EN.

As condições de operação utilizadas nos ensaios em reator contínuo de leito fixo, proporcionaram a manutenção da viabilidade do microrganismo por um maior período. De acordo com os resultados obtidos, a atividade da enzima Lcc neste tipo de reator apresentou-se superior aos dados experimentais obtidos nos ensaios realizados em Erlenmeyers. A inserção da fonte de carbono glicerol, proporcionou um maior incremento da atividade da enzima Lcc em comparação à sacarose, desencadeando o aumento na taxa de descoloração do corante RP5.

No estudo para avaliar o efeito indutor de diferentes fontes de carbono na expressão gênica da enzima Lcc, os melhores resultados foram obtidos com glicerol, seguido de sacarose e glicose. A otimização dos parâmetros operacionais em reator de bancada tornou-se necessária, uma vez que a viabilidade do microrganismo reduziu drasticamente devido ao rígido controle de pH. Nesta fase do estudo, pode-se considerar que a principal enzima envolvida no processo de descoloração do corante RP5 foi Lcc, visto que não foram detectadas atividades de outras enzimas.

A detecção da atividade de Lcc nas estirpes selecionadas pode auxiliar no desenvolvimento de novos estudos para o tratamento de efluentes têxteis e também outros setores industriais.

## 6.2. Perspectivas futuras

Com base nos resultados obtidos neste estudo, os esforços devem agora ser feitos para avaliar a capacidade de *T. versicolor* MUM 04.100 para os seguintes pontos:

- capacidade de descoloração de *T. versicolor* em efluentes têxteis reais utilizando-se células livres e imobilizadas em suportes sintéticos e naturais;
- utilização de fontes de carbono facilmente disponíveis e de baixo custo, como substituinte da sacarose;
- utilização do extrato enzimático e também imobilizar a enzima comparando as taxas de descoloração e também se avaliando a relação o custo/benefício;

- caracterização dos produtos intermediários produzidos durante a descoloração/degradação do corantes;
- utilização da técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF), para confirmação do peso molecular da Lcc e demais enzimas ligninolíticas, para efeito comparativo com os resultados obtidos com técnicas moleculares.
- inclusão de testes de toxicidade.

Perante todas as possibilidades apresentadas, existem nesta área de trabalho muitas opções para o desenvolvimento futuro destes ensaios.



---

## **Capítulo 7 *Bibliografía***

---



- Aguiar A, Ferraz A. 2011. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Química Nova*: 34; 1729-1738.
- Akdogan HA, Pazarlioglu NK. 2011. Fluorene biodegradation by *P. osteratus* - Part II: Biodegradation by immobilized cells in a recycled packed bed reactor. *Process Biochemistry*: 46; 840-846.
- Ali H. 2010. Biodegradation of synthetic dyes - A review. *Water, Air, & Soil Pollution*: 213; 251-273.
- Amorim CC, Leão MMD, Moreira RFPM. 2009. Comparação entre diferentes processos oxidativos avançados para degradação de corante azo. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*: 14; 543-550.
- Amoozegar MA, Hajjhasemi M, Hamed J, Asad S, Ventosa A. 2011. Azo dye decolorization by halophilic and halotolerant microorganisms. *Annals of Microbiology*: 61: 217-230.
- Anastasi A, Spina F, Prigione V, Tigini V, Giansanti P, Varese GC. 2010. Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. *Bioresource Technology*: 101; 3067-3075.
- Anastasi A, Parato B, Spina F, Tigini V, Prigione V, Varese GC. 2011. Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. *New Biotechnology*: 29; 38-45.
- Andleeb S, Atiq N, Ali MI, Razi-Ul-Hussnain R, Shafique M, Ahmad B, Ghumro PB, Hussain M, Hameed A, Ahmad S. 2010. Biological treatment of textile effluent in stirred tank bioreactor. *International Journal of Agriculture and Biology*: 12; 256-260.
- Ang TN, Ngoh GC, Chua ASM. 2011. A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme screening studies. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*: 6; 589-595.
- Arantes V, Milagres AMF. 2009. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. *Química Nova*: 32; 1586-1595.
- Aravind UK, George B, Baburaj MS, Thomas S, Thomas AP, Aravindakumar CT. 2010. Treatment of industrial effluents using polyelectrolyte membranes. *Desalination*: 252; 27-32.
- Arica MY, Bayramoglu G. 2007. Biosorption of reactive red-120 dye from aqueous solution by native and modified fungus biomass preparations of *Lentinus sajor-caju*. *Journal of Hazardous Materials*: 149; 499-507.
- Arora DS, Sharma RK. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 160; 1760-1788.

- Asgher M, Azim N, Bhatti HN. 2009. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* IBL-04. *Biochemical Engineering Journal*: 47; 61-65.
- Ayed L, Chaieb K, Cheref A, Bakhrouf A. 2009. Biodegradation of triphenylmethane dye malachite green by *Sphingomonas paucimobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 25; 705-711.
- Baccar R, Blázquez P, Bouzida J, Feki M, Attiya H, M. Sarrà M. 2011. Decolorization of a tannery dye: From fungal screening to bioreactor application. *Biochemical Engineering Journal*: 56; 184-189.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*: 30; 215-242.
- Bandara J, Wansapura PT, Jayathilaka SPB. 2007. Indium tin oxide coated conducting glass electrode for electrochemical destruction of textile colorants. *Electrochimica Acta*: 52; 4161-4166.
- Barragán B, Costa C, Carmen Márquez M. 2007. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments*: 75; 73-81.
- Barrasa JM, Martínez AT, Martínez MJ. 2009. Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes. *Folia Microbiologica*: 54; 59-66.
- Barreto WJ, Bernardino N D'E, Afonso R, Doi SMO. 2011. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: Um estudo cinético. *Química Nova*: 34; 568-572.
- Bergmaier D, Champagne CP, Lacroix C. 2005. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology*: 98; 272-284.
- Bhattacharya S, Das A, Mangai G, Vignesh K, Sangeetha J. 2011. Mycoremediation of congo red dye by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*: 42; 1526-1536.
- Bhatti HN, Akram N, Asgher M. 2008. Optimization of culture conditions for enhanced decolorization of cibacron red FN-2BL by *Schizophyllum commune* IBL-6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 149; 255-264.
- Bibi I, Bhatti HN, Asgher M. 2009. Decolourisation of direct dyes with manganese peroxidase from white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*-IBL-5. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*: 87; 435-440.
- Birhanli E, Yesilada O. 2010. Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*: 52; 33-37.

- Blánquez P, Caminal G, Sarrà M, Vicent T. 2007. The effect of HRT on the decolourisation of the grey lanaset G textile dye by *Trametes versicolor*. *Chemical Engineering Journal*: 126; 163-169.
- Bohlin C, Lundquist K, Jönsson LJ. 2008. Diastereomer selectivity in the degradation of a lignin model compound of the arylglycerol  $\beta$ -aryl ether type by white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*: 43; 199-204.
- Böhmer U, Frömmel S, Bley T, Müller M, Frankenfeld K, Miethe P. 2011. Solid-state fermentation of lignocellulotic materials for the production of enzymes by the white-rot fungus *Trametes hirsuta* in a modular bioreactor. *Engineering in Life Sciences*: 11; 395-401.
- Borchert M, Libra JA. 2001. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnology and Bioengineering*: 75; 313-321.
- Brijwani K, Rigdon A, Vadlani PV. 2010. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*: doi:10.4061/2010/149748.
- Brunow G. 2001. Methods to reveal the structure of lignin. In: Hofrichter M., Steinbüchel A., (eds). *Biopolymers. 1: Lignin, Humic Substances and Coal*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 89-116.
- Cabana H, Alexandre C, Agathos SN, Jones JP. 2009. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Corioloropsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresource Technology*: 100; 3447-3458.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez AT, Romero J, Gutiérrez A, del Río JC. 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*: 40; 1264-1271.
- Cañas AI, Camarero S. 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*: 28; 694-705.
- Carvalho W, Canilha L, Ferraz A, Milagres AMF. 2009. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*: 32; 2191-2195.
- Casas N, Blánquez P, Gabarrell X, Vicent T, Caminal G, Sarrà M. 2007. Degradation of orange G by laccase: Fungal versus enzymatic process. *Environmental Technology*: 28; 1103-1110.
- Casas N, Parella T, Vicent T, Caminal G, Sarrà M. 2009. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere*: 75;1344-1349.
- Casieri L, Varese GC, Anastasi A, Prigione V, Svobodová K, Filippello Marchisio V, Novotný C. 2008. Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes by

- immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*. *Folia Microbiologica*: 53; 44-52.
- Castillo MP, Stenström J, Ander P. 1994. Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. *Analytical Biochemistry*: 218; 399-404.
- Castillo A, Rascón-Chu A, Vargas G, Carvajal-Millán E, Valenzuela-Soto E, Sotelo-Mundo RR, Martínez. 2009. *Trametes* sp. as a source of biopolymer cross-linking agents: Laccase induced gelation of ferulated arabinoxylans. *Molecules*: 14; 4159-4165.
- de Castro AM, Pereira Jr N. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*: 33; 181-188.
- Cattoor T. 2007. European legislation relating to textile dyeing. In: Christie RM, (ed). *Environmental aspects of textile dyeing*. London, Woodhead Publishing, 1-28.
- Chander M, Arora DS, Bath HK. 2004. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*; 31: 94-97.
- Cing S, Yesilada O. 2004. Astrazon red dye decolorization by growing cells and pellets of *Funalia trogii*. *Journal of Basic Microbiology*: 44; 263-269.
- Ciullini I, Tilli S, Scozzafava A, Briganti F. 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. *Bioresource Technology*: 99; 7003-7010.
- Ciullini I, Gulotto A, Tilli S, Sannia G, Basosi R, Scozzafava A, Briganti F. 2012. Enzymatic decolorization of spent textile dyeing baths composed by mixtures of synthetic dyes and additives. *Applied and Environmental Microbiology*: doi 10.1007/s00253-011-3809-y.
- Colao MC, Caporale C, Silvestri F, Ruzzi M, Buonocore V. 2009. Modeling the 3-D structure of a recombinant laccase from *Trametes trogii* active at a pH close to neutrality. *The Protein Journal*: 28; 375-383.
- Covizzi LG, Giese EC, Gomes E, Dekker RFH, da Silva R. 2007. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*: 28; 143-160.
- Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*: 1; 36-50.
- Dawkar VV, Jadhav UU, Ghodake GS, Govindwar SP. 2009. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye navy blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. *Biodegradation*: 20; 777-787.
- Dayaram P, Dasgupta D. 2008. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus rubidus*. *Journal of Environmental Biology*: 29; 831-836.

- Di Fusco M, Tortolini C, Deriu D, Mazzei F. 2010. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*: 81; 235-240.
- Diwaniyan S, Kharb D, Raghukumar C, Kuhad RC. 2010. Decolorization of synthetic dyes and textile effluents by basidiomycetous fungi. *Water, Air, & Soil Pollution*: 210; 409-419.
- Dhouib A, Hamza M, Zouari H, Mechichi T, Hmidi R, Labat M, Martinez MJ, Sayadi S. 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 21; 1415-1423.
- Domínguez A, Couto SR, Sanromán MA. 2005. Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 21; 405-409.
- Domínguez A, Gómez J, Lorenzo M, Sanromán Á. 2007. Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 23, 367–373.
- Duarte ALS, Boaventura RAR. 2008. Pollutant dispersion modelling for portuguese river water uses protection linked to tracer dye experimental data. *WSEAS Transactions on Environment and Development*: 4; 1047-1056.
- Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Beauregard M, Daneault C. 2008. Decolorization of recalcitrant dyes with a laccase from *Streptomyces coelicolor* under alkaline conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*: 35; 1123-1129.
- Eichlerová I, Homolka L, Nerud F. 2006a. Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology*: 97; 2153-2159.
- Eichlerová I, Homolka L, Nerud F. 2006b. Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinosum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*: 33; 759-766.
- Eichlerová I, Homolka L, Nerud F. 2007. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments*: 75; 38-44.
- El-Desoky HS, Ghoneim MM, Zidan NM. 2010. Decolorization and degradation of ponceau S azo-dye in aqueous solutions by the electrochemical advanced Fenton oxidation. *Desalination*: 264; 143-150.
- Elisashvili V, Kachlishvili E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*: 144; 37-42.
- Enayatzamir K, Alikhani HA, Couto SR. 2009. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye reactive black 5 in fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*: 164; 296-300.

- Enayatzamir K, Alikhani HA, Yakhchali B, Tabandeh F, Rodríguez-Couto S. 2010. Decolouration of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* immobilised into alginate beads. *Environmental Science and Pollution Research*: 17; 145-153.
- Enayatzamir N, Tabandeh F, Rodríguez-Couto S, Yakhchali B, Alikhani HA, Mohammadi L. 2011. Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye reactive black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*: 102; 10359-10362.
- Erden E, Ucar MC, Gezer T, Pazarlioglu NK. 2009. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. *Brazilian Journal of Microbiology*: 40; 346-353.
- Faraco V, Pezzella C, Miele A, Giardina P, Sannia G. 2009a. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation*: 20; 209-220.
- Faraco V, Pezzella C, Giardina P, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. 2009b. Decolourization of textile dyes by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*: 84; 414-419.
- Fazli MM, Mesdaghinia AR, Naddafi K, Nasserli S, Yunesian M, Assadi MM, Rezaie S, Hamzehei H. 2010. Optimization of reactive blue 19 decolourization by *Ganoderma* sp. using response surface methodology. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*: 7; 35-42.
- Fialho LL; da Silva WTL, Milori DMBP, Simões ML, Martin-Neto L, Saab SC. 2010. Interferência da lignina na quantificação de radicais livres no processo de compostagem. *Química Nova*: 33; 364-369.
- Fillat A, Colom JF, Vidal T. 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technology*: 101; 4104-4110.
- Flander L, Rouau X, Morel MH, Autio K, Seppänen-Laakso T, Kruus K, Buchert J. 2008. Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*: 56; 5732-5742.
- Font X, Caminal G, Gabarrell X, Romero S, Vicent MT. 2003. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*: 78; 548-554.
- Gao B-Y, Wang Y, Yue Q-Y, Wei J-C, Li Q. 2007. Color removal from simulated dye water and actual textile wastewater using a composite coagulant prepared by polyferric chloride and polydimethyldiallylammonium chloride. *Separation and Purification Technology*: 54; 157-163.
- Gao D, Liang H, Du L, Chen J. 2010. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosa* isolated from

- the boreal forest in Northeast China. *African Journal of Biotechnology*: 9; 6888-6893.
- Gianfreda L; Xu F; Bollag J-M. 2010. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*: 3; 1-26.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 67; 369-385.
- Gil ES, Muller L, Santiago MF, Garcia TA. 2009. Biosensor based on brut extract from laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for environmental analysis of phenolic compounds. *Portugaliae Electrochimica Acta*: 27; 215-225.
- Givaudan A, Effose A, Faure D, Portier P, Bouillant M-L, Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*: 108; 205-210.
- Gomaa OM, Linz JE, Reddy CA. 2008. Decolorization of victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 24; 2349-2356.
- Gomes AC, Gonçalves IC, Pinho MN. 2005. The role of adsorption on nanofiltration of azo dyes. *Journal of Membrane Science*: 255; 157-165.
- Gómez-Toribio V, García-Martín AB, Martínez MJ, Martínez AT, Guillé F. 2009. Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. *Applied and Environmental Microbiology*: 75; 3944-3953.
- Gomi N, Yoshida S, Matsumoto K, Okudomi M, Konno H, Hisabori T, Sugano Y. 2011. Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. *Biodegradation*: 22; 1239-1245.
- Gonçalves MJ, Saar JH, de Souza AAU, de Souza SMAGU. 2008. Descoloração biológica de efluentes têxteis: Um processo ecologicamente correto para a remoção de corantes azóicos. *Revista Química Têxtil*: 90; 70-75.
- González T, Terrón MC, Zapico EJ, Téllez A, Yagüe S, Carbajo JM, González AE. 2003. Use of multiplex reverse transcription-pcr to study the expression of a laccase gene family in a basidiomycetous fungus. *Applied and Environmental Microbiology*: 69; 7083-7090.
- Goudopoulou A, Krimitzas A, Typas MA. 2010. Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 88; 541-551.
- Gozálvez-Zafrilla JM, Sanz-Escribano D, Lora-García J, León Hidalgo MC. 2008. Nanofiltration of secondary effluent for wastewater reuse in the textile industry. *Desalination*: 222; 272-279.

- Guendy HR. 2009. Enhancing of textil wastewater treatment using different catalysts for advanced oxidation process. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*: 3; 4046-4052.
- Gupta U, Kar R. 2008. Optimization and scale up of cellulase free endo xylanase production by solid state fermentation on corn cob and by immobilized cells of a thermotolerant bacterial isolate. *Jordan Journal of Biological Sciences*: 1; 129-134.
- Gupta VK, Suhas. 2009. Application of low-cost adsorbents for dye removal - A review. *Journal of Environmental Management*: 90; 2313-2342.
- Hadibarata T, Yusoff ARM, Kristanti RA. 2012. Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133. *Water, Air, & Soil Pollution*: 223; 933-941.
- Hai FI, Yamamoto K, Fukushi K. 2007. Hybrid treatment systems for dye wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*: 37; 315-377.
- Haibo Z, Yinglong Z, Feng H, Peiji G, Jiachuan C. 2009. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsute*. *Biotechnology Letters*: 31; 837-843.
- Hardin IR. 2007. Chemical treatment of textile dye effluent. In: Christie RM, (ed). *Environmental aspects of textile dyeing*. London, Woodhead Publishing, 191-211.
- Hernández-Ortega A, Ferreira P, Martínez AT. 2012. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Applied Biochemistry and Microbiology*: 93; 1395-1410.
- Hessel C, Allegre C, Maisseu M, Charbit F, Moulin P. 2007. Guidelines and legislation for dye house effluents. *Journal of Environmental Management*: 83; 171-180.
- Ho C-H, Chen L, Ho Y-P, Yang C-L. 2010. Oxidative decomposition of reactive blue C.I. 19 with sodium hypochlorite. *Environmental Engineering Science*: 27; 103-109.
- Huang RM, He JY, Zhao J, Luo Q, Huang CM. 2011. Fenton–biological treatment of reverse osmosis membrane concentrate from a metal plating wastewater recycle system. *Environmental Technology*: 32; 515-522.
- Husain Q. 2010. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*: 9; 117-140.
- Jilani K, Asgher M, Bhatti HN, Mushtaq Z. 2011. Shake flask decolourization of direct dye solar golden yellow R by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*: 33; 209-214.
- Kalpna D, Shim JH, Oh B-T, Senthil K, Lee YS. 2011. Bioremediation of the heavy metal complex dye isolan dark blue 2SGL-01 by white rot fungus *Irpex lacteus*. *Journal of Hazardous Materials*: 198; 198-205.

- Kalyani DC, Telke AA, Dhanve RS, Jadhav JP. 2009. Ecofriendly biodegradation and detoxification of reactive red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *Journal of Hazardous Materials*: 163; 735-742.
- Kaushik P, Malik A. 2009. Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International*: 35; 127-141.
- Kersten PJ, Kirk TK. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*: 169; 2195-2201.
- Kersten P, Cullen D. 2007. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology*: 44; 77-87.
- Khelifi E, Ayed L, Bouallagui H, Touhami Y, Hamdi M. 2009. Effect of nitrogen and carbon sources on indigo and congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*: 163; 1056-1062.
- Khelifi R, Belbahri L, Woodward S, Ellouz M, Dhoub A, Sayadi S, Mechichi T. 2010. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*: 175; 802-808.
- Khouni I, Marrot B, Moulin P, Amar RB. 2011. Decolourization of the reconstituted textile effluent by different process treatments: Enzymatic catalysis, coagulation/flocculation and nanofiltration processes. *Desalination*: 268; 27-37.
- Kim T-H, Lee YYJ, Lee B, Kim S. 2004. Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. *Desalination*: 168; 287-293.
- Kim S, Moldes D, Cavaco-Paulo A. 2007. Laccases for enzymatic colouration of unbleached cotton. *Enzyme and Microbial Technology*: 40; 1788-1793.
- Kocuyigit A, Pazarbasi MB, Yasa Y, Ozdemir G, Karaboz I. 2012. Production of laccase from *Trametes trogii* TEM H2: A newly isolated white-rot fungus by air sampling. *Journal of Basic Microbiology*: 52; 1-9.
- Kolekar YM, Pawar SP, Gawai KR, Lokhande PD, Shouche YS, Kodam KM. 2008. Decolorization and degradation of disperse blue 79 and acid orange 10, by *Bacillus fusiformis* kmk5 isolated from the textile dye contaminated soil. *Bioresource Technology*: 99; 8999-9003.
- Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM, Burton S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*: 48; 195-208.
- Kulikova NA, Klein OI, Stepanova EV, Koroleva OV. 2011. Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: Fundamental and Applied Aspects (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*: 47; 565-579.

- Kumar VV, Rapheal VS. 2011. Induction and purification by three-phase partitioning of aryl alcohol oxidase (AAO) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*: 163:423-432.
- Kumar VV, Kirupha SD, Periyaraman P, Sivanesan S. 2011. Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. *African Journal of Microbiology Research*: 5; 1261-1267.
- Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar MP, Vidyadevi T, Sivanesan S. 2012. Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: 74; 63-72.
- Kumari K, Abraham TE. 2007. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. *Bioresource Technology*: 98; 1704-1710.
- Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. 2007. Fungal laccase – A versatile for biotechnological applications. In: Méndez-Vilas A (ed). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Microbiology Book Series, Badajoz, Formatex, 233-245.
- Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*: 7; 1-17.
- Kunz A, Peralta-Zamora P, de Moraes SG, Durán N. 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*: 25; 78-82.
- Kusvuran E, Gulnaz O, Samil A, Erbil M. 2010. Detection of double bond-ozone stoichiometry by an iodimetric method during ozonation processes. *Journal of Hazardous Materials*: 175; 410-416.
- Lacina C, Germain G, Spiros NA. 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology* : 2; 620-630.
- Lau W-J, Ismail AF. 2009. Polymeric nanofiltration membranes for textile dye wastewater treatment: Preparation, performance evaluation, transport modelling, and fouling control - A review. *Desalination*: 245; 321-348.
- León-Santestebán H, Meraz M, Wrobel K, Tomasini A. 2011. Pentachlorophenol sorption in nylon fiber and removal by immobilized *Rhizopus oryzae* ENHE. *Journal of Hazardous Materials*: 190; 707-712.
- Leuthner B, Aichinger C, Oehmen E, Koopmann E, Müller O, Müller P, Kahmann R, Bölker M, Schreier PH. 2005. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*: 272; 639-650.
- Levin L, Malignani E, Ramos AM. 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*: 101; 4554-4563.

- Liu C-H, Wu J-S, Chiu H-C, Suen S-Y, Chu KH. 2007. Removal of anionic reactive dyes from water using anion exchange membranes as adsorbers. *Water Research*: 41; 1491-1500.
- Lu L, Zhao M, Zhang B-B, Yu SY, Bian XJ, Wang W, Wang Y. 2007. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*: 74; 1232-1239.
- Lu Y, Phillips DR, Lu L, Hardin IR. 2008. Determination of the degradation products of selected sulfonated phenylazonaphthol dyes treated by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*: 1208; 223-231.
- Lucas MS, Peres JA. 2008. Decolorization of the azo dye reactive black 5 by Fenton and photo-Fenton oxidation. *Dyes and Pigments*: 71; 236-244.
- Lucas M, Mertens V, Corbisier A-M, Vanhulle S. 2008. Synthetic dyes decolourisation by *white-rot fungi*: Development of original microtitre plate method and screening. *Enzyme and Microbial Technology*: 42; 97-106.
- Lucas MPGS. 2009. Application of advanced oxidation processes to wastewater treatment: Tese (Doutoramento): University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Portugal; 184 p.
- Maalej-Kammoun M, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, Woodward S, Mechichi T. 2009. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *International Biodeterioration e Biodegradation*: 63; 600-606.
- Machado KMG, Compart LCA, Morais RO, Rosa LH, Santos MH. 2006. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*: 37; 481-487.
- Maciel MJM, Castro e Silva A, Ribeiro HCT. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*: 13; 1-12.
- Maier J, Kandelbauer A, Erlacher A, Cavaco-Paulo A. 2004. A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF. *Applied and Environmental Microbiology*: 70; 837-844.
- Majeau J-A, Brar SK, Tyagi RD. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*: 101; 2331-2350.
- Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MDS, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya R, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henriessat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D. 2004. Genome sequence of the lignocelluloses degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*: 22; 695-700.

- Martins MAM, Ferreira IC, Santos IM, Queiroz MJ, Lima N. 2001. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*: 89; 91-98.
- Martins MAM, Queiroz MJ, Silvestre AJD, Lima N. 2002. Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Research in Microbiology*: 153; 361-368.
- Martorell MM, Pajot HF, de Figueroa Lic. 2012. Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International Biodeterioration e Biodegradation*: 66; 25-32.
- Mazmanci MA, Ünyayar A. 2005. Decolourisation of reactive black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. *Process Biochemistry*: 40; 337-342.
- Mazmanci MA, Unyayar A. 2010. Decolorization efficiency of *Funalia trogii* under static condition: Effect of C: N ratios *African Journal of Biotechnology*: 9; 6539-6544.
- Mechichi T, Mhiri N, Sayadi S. 2006. Remazol brilliant blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere*: 64; 998-1005.
- Méndez-Paz D, Omil F, Lema JM. 2003. Modeling of the acid orange 7 anaerobic biodegradation. *Water Science and Technology*: 48; 133-139.
- Méndez-Paz D, Omil F, Lema JM. 2005. Anaerobic treatment of azo dye acid orange 7 under batch conditions. *Enzyme and Microbial Technology*: 36; 264-272.
- Merzouk B, Madani K, Sekki A. 2010. Using electrocoagulation-electroflotation technology to treat synthetic solution and textile wastewater, two case studies. *Desalination*: 250; 573-577.
- Merzouk B, Gourich B, Madani K, Vial Ch, Sekki A. 2011. Removal of a disperse red dye from synthetic wastewater by chemical coagulation and continuous electrocoagulation. A comparative study. *Desalination*: 272; 246-253.
- Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S, Hofrichter M. 2006. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physicochemical and catalytic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 69; 682-688.
- Mikolasch A, Schauer F. 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 82; 605-624.
- Mikiashvili N, Elisashvili V, Wasser S, Nevo E. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*: 27; 955-959.

- Minussi RC, Moraes SG, Pastore GM, Durán N. 2001. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. *Letters in Applied Microbiology*: 33; 21-25.
- Minussi RC, Miranda MA, Silva JA, Ferreira CV, Aoyama H, Marangoni S, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. 2007a. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1hydroxybenzo-triazole. *African Journal of Biotechnology*: 6; 1248-1254.
- Minussi RC, Rossic M, Bologna L, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. 2007b. Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: 45; 102-107.
- Mishra A, Kumar S, Pandey AK. 2011. Laccase production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates of white rot fungus. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 65; 487-493.
- Mohammadi A, Nasernejad B. 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials*: 161; 534-537.
- Moilanen U, Osma JF, Winqvist E, Leisola M, Couto SR. 2010. Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from *Trametes hirsute* and *Cerrena unicolor*. *Engineering in Life Sciences*: 10; 1-6.
- Moldes D, Lorenzo M, Sanromán MA. 2004. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology Letters* 26, 327-330.
- Moldes D, Díaz M, Tzanov T, Vidal T. 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology*: 99; 7959-7965.
- Monteali MR, Della Seta L, Vastarella W, Pilloton R. 2010. A disposable laccase-tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: 64; 189-194.
- Moreira MT, Palma C, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 2001. In vitro degradation of a polymeric dye (poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*: 75, 362-368.
- Moreira MT, Viacava C, Vidal G. 2004. Fed-batch decolorization of poly R-478 by *Trametes versicolor*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*: 47, 179-183.
- Moya R, Hernández M, García-Martín AB, Ball AS, Arias ME. 2010. Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresource Technology*: 101; 2224-2229.

- Murugesan K, Nam I-H, Kim Y-M, Chang Y-S. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*: 40; 1662-1672.
- Murugesan K, Kim Y-M, Jeon J-R, Chang Y-S. 2009. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Hazardous Materials*: 168; 523-529.
- Mussatto SI, Aguilar CN, Rodrigues LR, Teixeira JA. 2009. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. *Carbohydrate Research*: 344; 795-800.
- Neto SLM, Esteves PJ, Santos VTO, Paranhos AP, Cescato F, Vitali VM, Machado KMG. 2011. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 27; 2665-2673.
- Niebisch CH, Malinowski AK, Schadeck R, Mitchell DA, Kava-Cordeiro V, Paba J. 2010. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. *Journal of Hazardous Materials*: 180; 316-322.
- Nilsson I, Möller A, Mattiasson B, Rubindamayugi MST, Welander U. 2006. Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*: 38; 94-100.
- Nyanhongo GS, Gubitiz G, Sukyai P, Leitner C, Haltrich D, Ludwig R. 2007. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: A wealth of catalytic activity. *Food Technology and Biotechnology*: 45; 250-268.
- Nordström F, Terrazas E, Welander U. 2008. Decolorization of a mixture of textile dyes using *Bjerkandera* sp. BOL-13. *Environmental Technology*: 29; 921-929.
- Noreen R, Asgher M, Bhatti HN, Batool S, Asad MJ. 2011. *Phanerochaete chrysosporium* IBL-03 secretes high titers of manganese peroxidase during decolorization of drimarine blue K2RL textile dye. *Environmental Technology*: 32; 1239-1246.
- Novotný C, Rawal B, Bhatt M, Patel M, Šašek V, Molitoris HP. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*: 89; 113-122.
- Novotný Č, Dias N, Kapanen A, Malachová K, Vándrovcová M, Itävaara M, Lima N. 2006. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere*: 63; 1436-1442.
- Novotný Č, Svobodová K, Benada O, Kofroňová O, Heissenberger A, Fuchs W. 2011. Potential of combined fungal and bacterial treatment for color removal in textile wastewater. *Bioresource Technology*: 102; 879-888.

- Nozaki K, Beh CH, Mizuno M, Isobe T, Shiroishi M, Kanda T, Amano Y. 2008. Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 105; 69-72.
- de Oliveira IRWZ, Fatibello-Filho O, Fernandes SC, Vieira IC. 2009. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. *Química Nova*: 32; 1195-1201.
- Oliveira PL, Duarte MCT, Ponezi AN, Durrant LR. 2009. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pulillus* and *Paenibacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*: 40; 818-826.
- Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S. 2010a. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*: doi:10.4061/2010/918761.
- Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S. 2010b. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. *Bioresource Technology*: 101; 8509-8514.
- Padmavathy S, Sandhya S, Swaminathan K, Subrahmanyam YV, Chakrabarti T, Kaul SN. 2003. Aerobic decolorization of reactive azo dyes in presence of various cosubstrates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*: 17; 147-151.
- Pajot HF, de Figueroa LIC, Fariña JI. 2007. Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*: 40; 1503-1511.
- Pajot HF, Fariña JI, de Figueroa LIC. 2011. Evidence on manganese peroxidase and tyrosinase expression during decolorization of textile industry dyes by *Trichosporon akiyoshidainum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 65; 1199-1207.
- Pakshirajan K, Jaiswal S, Das RK. 2011. Biodecolourization of azo dyes using *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of culture conditions and enzyme activities. *Journal of Industrial Scientific Research*: 70; 987-991.
- Pakshirajan K, Kheria S. 2012. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. *Journal of Environmental Management*: 101; 118-123.
- Palit S. 2010. Studies on ozone-oxidation of dye in a bubble column reactor at different pH and different oxidation-reduction potential. *International Journal of Environmental Science and Development*: 1; 341-346.
- Park C, Lee B, Han E-J, Lee J, Kim S. 2006. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*: 39; 371-374.
- Patrick F, Mtui G, Mshandete AM, Kivaisi A. 2010. Optimized production of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in submerged cultures of *Trametes trogii* using various growth media compositions. *Tanzania Journal of Science*: 36; 1-18.

- Pavko A, Novotný Č. 2008. Induction of ligninolytic enzyme production by *Dichomitus squalens* on various types of immobilization support. *Acta Chimica Slovenica*: 55; 648-652.
- Pavko A. 2011. Fungal decolourization and degradation of synthetic dyes some chemical engineering aspects. In: Einschlag FSG, (ed). *Waste Water - Treatment and Reutilization*. Rijeka, InTech, 65-88.
- Pazarlioglu NK, Akkaya A, Akdogan HA, Gungor B. 2010. Biodegradation of direct blue 15 by free and immobilized *Trametes versicolor*. *Water Environment Research*: 82; 579-585.
- Paździor K, Klepacz-Smółka A, Ledakowicz S, Sójka-Ledakowicz J, Mrozińska Z, Żyła R. 2009. Integration of nanofiltration and biological degradation of textile wastewater containing azo dye. *Chemosphere*: 75; 250-255.
- Phugare SS, Kalyani DC, Surwase SN, Jadhav JP. 2011. Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed bacterial consortium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 74; 1288-1296.
- Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Giovanni S. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs*: 1; 252-262.
- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*: 12; 104-112.
- Pocedič J, Hasal P, Novotný Č. 2009. Decolorization of organic dyes by *Irpex lacteus* in a laboratory trickle-bed biofilter using various mycelium supports. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*: 84; 1031-1042.
- Pocedič J, Knotec O, Šíma J, Hasal P. 2010. Rotating biological contactor and its application for decolorization of textile dyes by *Irpex lacteus*. *Chemical Engineering Transaction*: 20; 67-72.
- Prigione V, Tigini V, Pezzella C, Anastasi A., Sannia G, Varese GC. 2008. Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Research*: 42; 2911-2920.
- Puvaneswari N, Muthukrishnan J, Gunasekaran P. 2006. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian Journal of Experimental Biology*: 44; 618-626.
- Raeder U, Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*: 1; 17-20.
- Ramsay J, Shin M, Wong S, Goode C. 2006. Amaranth decoloration by *Trametes versicolor* in a rotating biological contacting reactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*: 33; 791-795.
- Ramya M, Anusha B, Kalavathy S, Devilaksmi S. 2007. Biodecolorization and biodegradation of reactive blue by *Aspergillus* sp. *African Journal of Biotechnology*: 6; 1441-1445.

- Rani C, Jana AK, Bansal A. 2012. Potential of different white rot fungi to decolourize textile azo dyes in the absence of external carbon source. *Environmental Technology*: 33; 887-896.
- Rao MA, Scelza R, Scotti R, Gianfreda L. 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*: 10; 333-353.
- Ren S, Guo J, Zeng G, Sun G. 2006. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 72; 1316-1321.
- Revankar MS, Lele SS. 2007. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology* 98; 775-780.
- Rigas F, Dritsa V. 2006. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. *Enzyme and Microbial Technology*: 39; 120-124.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA, Hofer D, Gübitz GM. 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology*: 95; 67-72.
- Rodríguez Couto S, Toca-Herrera JL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*: 24; 500-513.
- Rodríguez Couto S, Rodrigues A, Paterson RRM, Lima N, Teixeira JA. 2006a. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. *Letters in Applied Microbiology*: 42; 612-616.
- Rodríguez Couto S, Rosales E, Sanroman MA. 2006b. Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsute* in expanded-bed reactors. *Chemosphere*: 62; 1558-1563.
- Rodríguez Couto S, Toca-Herrera JL. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*: 25; 558-569.
- Rodríguez Couto S. 2009. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*: 27; 227-235.
- Romero S, Blánquez P, Caminal G, Font X, Sarrà M, Gabarrell X, Vicent T. 2006. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*: 31; 42-47.
- Roriz MS, Osma JF, Teixeira JA, Couto SR. 2009. Application of response surface methodological approach to optimise reactive black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. *Journal of Hazardous Materials*: 169; 691-696.
- Roncal T, Muñoz C, Lorenzo L, Maestro B, de Guereñu MMD. 2012. Two-step oxidation of glycerol to glyceric acid catalyzed by the *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*: 50; 143-150.
- Rubilar O, Tortella G, Cea M, Acevedo F, Bustamante M, Gianfreda L, Diez MC. 2011. Bioremediation of a Chilean Andisol contaminated with pentachlorophenol (PCP) by solid substrate cultures of white-rot fungi. *Biodegradation*: 22; 31-41.

- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, García E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT. 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany*: 60; 441-452.
- Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K. 2009. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 25; 1733-1741.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Martín J, Beltrán-Heredia J, Solera-Hernández C. 2010. Surface water and wastewater treatment using a new tannin-based coagulant, pilot plant trials. *Journal of Environmental Management*: 91; 2051-2058.
- Sandhya S. 2010. Biodegradation of azo dyes under anaerobic condition: role of azoreductase. In: Erkurt HA, (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry 9: Biodegradation of azo dyes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 39-57.
- Sanghi R, Dixit A, Verma P, Puri S. 2009. Design of reaction conditions for the enhancement of microbial degradation of dyes in sequential cycles. *Journal of Environmental Sciences*: 21; 1646-1651.
- Sanghi R, Dixit A, Verma P. 2011. Evaluation of *Coriolus versicolor* for its tolerance towards toxic sulphonic azo dyes in sequential batch mode. *Process Safety and Environmental Protection*: 89; 15-21.
- Saratale GD, Saratale RG, Chang JS, Govindwar SP. 2011. Fixed-bed decolorization of reactive blue 172 by *Proteus vulgaris* NCIM-2027 immobilized on *Luffa cylindrica* sponge. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 65; 494-503.
- Sarath G, Motte RS, Wagner FW. 1989. Protease assay methods. In: Beynon RJ and Bond JS. (Eds). *Proteolytic enzymes- a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, England, 25-30.
- Saritha V, Maruthi YA, Mukkanti K. 2011. Biological decolourization of higher concentrations of synthetic lignin by native fungi. *Journal of Environmental Research and Management*: 2; 14-17.
- Scháněl L. 1967. A new polyphenoloxidase test for distinguishing between wood-rotting fungi. *Biologia Plantarum*: 9; 41-48.
- Selvam K, Swaminathan K, Chae K-S. 2003. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*: 88; 115-119.
- Sen S, Singh PP, Rathore VS, Pereira BMJ. 2004. Sugarcane bagasse improves the activity of ligninolytic enzymes and decolourization of dyes by the white-rot

- fungus *Pleurotus ostreatus*. Journal of Scientific Industrial Research: 63; 739-746.
- Sezgintürk MK, Odaci D, Pazarlıoğlu N, Pilloton R, Dinçkaya E, Telefoncu A, Timur S. 2010. Construction and comparison of *Trametes versicolor* laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology: 38; 192-199.
- Sharma P, Singh L, Dilbaghi N. 2009. Biodegradation of orange II dye by *Phanerochaete chrysosporium* in simulated wastewater. Journal of Scientific and Industrial Research: 68; 157-161.
- Silveira E, Marques PP, Macedo AC, Mazzola PG, Porto ALF, Tambourgi EB. 2011. Decolorization of industrial azo dye in an anoxic reactor by PUF immobilized *Pseudomonas oleovorans*. Journal of Water Reuse and Desalination: 1; 18-26.
- Singh AD, Sabaratnam V, Abdullah N, Annuar MSM, Ramachandran KB. 2010a. Decolourisation of chemically different dyes by enzymes from spent compost of *Pleurotus sajor-caju* and their kinetics. African Journal of Biotechnology: 9; 41-54.
- Singh S, Pakshirajan K, Daverey A. 2010b. Enhanced decolourization of direct red-80 dye by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* employing sequential design of experiments. Biodegradation: 21; 501-511.
- Singh K, Arora S. 2011. Removal of synthetic textile dyes from wastewaters: A critical review on present treatment technologies. Critical Reviews in Environmental Science and Technology: 41; 807-878.
- Singh AD, Vikineswary S, Abdullah N, Sekaran M. 2011. Enzymes from spent mushroom substrate of *Pleurotus sajor-caju* for the decolourisation and detoxification of textile dyes. World Journal of Microbiology and Biotechnology: 27; 535-545.
- Srinivasan SV, Murthy DVS. 2009. Statistical optimization for decolorization of textile dyes using *Trametes versicolor*. Journal of Hazardous Materials: 165; 909-914.
- Stajic M, Persky L, Cohen E, Hadar Y, Brceski I, Wasser SP, Nevo E. 2004. Screening of the laccase, manganese peroxidase, and versatile peroxidase activities of the genus *Pleurotus* in media with some raw plant materials as carbon sources. Applied Biochemistry and Biotechnology: 117; 155-164.
- Standish LJ, Wenner CA, Sweet ES, Bridge C, Nelson A, Martzen M, Novack J, Torkelson C. 2008. *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. Journal of the Society for Integrative Oncology: 6; 122-128.
- Stoilova I, Krastanov A, Stanchev V. 2010. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. Advances in Bioscience and Biotechnology: 1; 208-215.

- Sukumar M, Sivasamy A, Swaminathan G. 2009. In situ biodecolorization kinetics of acid red 66 in aqueous solutions by *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*: 167; 660-663.
- Sun S, Li C, Sun J, Shi S, Fan M, Zhou Q. 2009. Decolorization of an azo dye orange G in aqueous solution by Fenton oxidation process: Effect of system parameters and kinetic study. *Journal of Hazardous Materials*: 161; 1052-1057.
- Svobodová K, Majcherczyk A, Novotný Č, Kües U. 2008. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology*: 99; 463-471.
- Taboada-Puig R, Lú -Chau T, Moreira MT, Feijoo G, Martínez MJ, Lema JM. 2011. A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 27; 115-122.
- Takano M, Nakamura M, Yamaguchi M. 2010. Glyoxal oxidase supplies hydrogen peroxide at hyphal tips and on hyphal wall to manganese peroxidase of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *Journal of Wood Science*: 56; 307-313.
- Tanaka H, Koike K, Itakura S, Enoki A. 2009. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme and Microbial Technology*: 45; 384-390.
- Tang W, Jia R, Zhang D. 2011. Decolorization and degradation of synthetic dyes by *Schizophyllum* sp. F17 in a novel system. *Desalination*: 265; 22-27.
- Tavares AM, Coelho MAZ, Agapito MSM, Coutinho JAP, Xavier AMRB. 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 134; 233-248.
- Tavčar M, Svobodová K, Kuplenk J, Novotný C, Pavko A. 2006. Biodegradation of azo dye RO16 in different reactors by immobilized *Irpex lacteus*. *Acta Chimica Slovenica*: 53; 338-343.
- Telke AA, Joshi SM, Jadhav SU, Tamboli DP, Govindwar SP. 2009. Decolorization and detoxification of congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. *Biodegradation*: 21; 283-296.
- Tien M, Kirk TK. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 81; 2280-2284.
- Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Vasić-Rački Đ, Zelić B. 2012. Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 166; 36-46.

- Turhan K, Turgut Z. 2009. Decolorization of direct dye in textile wastewater by ozonization in a semi-bath bubble column reactor. *Desalination*: 242; 256-263.
- Urta J, Sepúlveda L, Contreras E, Palma C. 2006. Screening of static culture and comparison of batch and continuous culture for the textile dye biological decolorization by *Phanerochaete chrysosporium*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*: 23; 281-290.
- Vaithanomsat P, Apiwatanapiwat W, Petchoy O, Chedchant J. 2010a. Decolorization of reactive dye by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039. *Kasetsart Journal: Natural Science*: 44; 879-890.
- Vaithanomsat P, Apiwatanapiwat W, Petchoy O, Chedchant J. 2010b. Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039 and their application for reactive dye removal. *International Journal of Chemical Engineering*: doi: 10.1155/2010/162504.
- Vanhulle S, Trovaslet M, Enaud E, Lucas M, Taghavi S, Lelie DVD, Aken BV, Foret M, Onderwater RCA, Wesenberg D, Agathos SN, Schneider Y-J, Corbisier A-M. 2008. Decolorization, cytotoxicity, and genotoxicity reduction during a combined ozonation/fungal treatment of dye-contaminated wastewater. *Environmental Science and Technology*: 42; 584-589.
- vanderZee FP, Villaverde S. 2005. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes-A short review of bioreactor studies. *Water Research*: 39; 1425-1440.
- Verma AK, Raghukumar C, Verma P, Shouche YS, Naik CG. 2010. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. *Biodegradation*: 21; 217-233.
- Verma AK, Dash RR, Bhunia P. 2012. A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *Journal of Environmental Management*: 93; 154-168.
- Vianello F, Ragusa S, Cambria MT, Rigo A. 2006. A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element. *Biosensors and Bioelectronics*: 21; 2155-2160.
- Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RH. 2006. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: 53; 55-59.
- Viswanath B, Chandra MS, Kumar KP, Pallavi H, Reddy BR. 2008a. Fungal laccases and their biotechnological applications with special reference to bioremediation. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*: 2; 1-13.
- Viswanath B, Chandra MS, Kumar KP, Reddy BR. 2008b. Production and purification of laccase from *Stereum ostrea* and its ability to decolorize textile dyes. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*: 2; 19-25.

- Wong DWS. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*: 157; 174-209.
- Yadav M; Singh SK, Yadav KDS. 2009a. Purification and characterization of lignin peroxidase from *Pleurotus sajor caju* MTCC-141. *Journal of Wood Chemistry and Technology*: 29; 59-73.
- Yadav M, Yadav P, Yadav KDS. 2009b. Purification and characterization of lignin peroxidase from *Loweporus lividus* MTCC-1178. *Engineering in Life Sciences*: 9; 124-29.
- Yang Q, Yediler A, Yang M, Kettrup A. 2005. Decolorization of an azo dye, Reactive Black 5 and MnP production by yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus*. *Biochemical Engineering Journal*: 24; 249-253.
- Yang Q, Li C, Li H, Li Y, Yu N. 2009a. Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. *Biochemical Engineering Journal*: 43; 225-230.
- Yang XQ, Zhao XX, Liu CY, Zheng Y, Qian SJ. 2009b. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochemistry*: 44; 1185-1189.
- Yemendzhiev H, Alexieva Z, Krastanov A. 2009. Decolorization of synthetic dye reactive blue 4 by mycelial culture of white-rot fungi *Trametes versicolor* 1. *Biotechnology e Biotechnological Equipment*: 23; 1337-1339.
- Yesilada O, Yildirim SC, Birhanli E, Apohan E, Asma D, Kuru F. 2010. The evaluation of pre-grow mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 26:33-39.
- Youshuang Z, Haibo Z, Mingle C, Zhenzhen W, Feng H, Peiji G. 2011. Production of a thermostable metal-tolerant laccase from *Trametes versicolor* and its application in dye decolorization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*: 16; 1027-1035.
- Zahmatkesh M, Tabandeh F, Ebrahimi S. 2010. Biodegradation of reactive orange 16 by *Phanerochaete chrysosporium* fungus: Application in a fluidized bed bioreactor. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*: 7; 385-390.
- Zhang G-Q, Tian T, Liu Y-P, Wang H-X, Chen Q-J. 2011. A laccase with anti-proliferative activity against tumor cells from a white root fungus *Abortiporus biennis*. *Process Biochemistry*: 46; 2336-2340.
- Zhao X, Hardin IR, Hwang H-M. 2006. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 57; 1-6.
- Zhuo R, Ma L, Fan F, Gong Y, Wan X, Jiang M, Zhang X, Yang Y. 2011. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain

- Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *Journal of Hazardous Materials*: 192; 855-873.
- Zille A, Tzanov T, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. 2003. Immobilized laccase for decolourization of reactive black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters*: 25; 1473-1477.
- Zilly A, Coelho-Moreira JS, Bracht A, de Souza CGM, Carvajal AE, Koehnlein EA, Peralta RM. 2011. Influence of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 65; 340-344.
- Zonoozi MH, Moghaddam MRA, Arami M. 2008. Removal of acid red 398 dye from aqueous solutions by coagulation/flocculation process. *Environmental Engineering and Management Journal*: 7; 695-699.
- Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*: 39; 141-148.