

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOSIANE FERREIRA PIRES

Avaliação do potencial enzimático de fungos endofíticos de *Coffea arabica* (café), sob cultivo orgânico e convencional, na remediação de efluentes têxteis.

ALFENAS – MG

2013

JOSIANE FERREIRA PIRES

Avaliação do potencial enzimático de fungos endofíticos de *Coffea arabica* (café), sob cultivo orgânico e convencional, na remediação de efluentes têxteis.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Tecnologia Ambiental
Orientadora: Profa. Dra Amanda Latercia Tranches Dias

ALFENAS-MG

2013

Pires, Josiane Ferreira.

Avaliação do potencial enzimático de fungos endofíticos de *Coffea arabica* (café), sob cultivo orgânico e convencional, na remediação de efluentes têxteis. / Josiane Ferreira Pires. - 2013.
119 f. -

Orientador: Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

JOSIANE FERREIRA PIRES

Avaliação do potencial enzimático de fungos endofíticos de *Coffea arabica* (café), sob cultivo orgânico e convencional, na remediação de efluentes têxteis.

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Aprovada em: 28/02/2013

Professor:

Instituição:

Assinatura:

Professor:

Instituição:

Assinatura:

Professor:

Instituição:

Assinatura:

Aos meus pais Mariana e João e ao meu avô João Inácio

Meus heróis

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

À Prof. Dra. Amanda Latercia T. Dias pela orientação, carinho, confiança, apoio e incentivo indispensáveis em todas as etapas deste trabalho;

À amiga e companheira de pesquisas Bárbara por toda a ajuda e apoio fundamentais no desenvolvimento do trabalho;

Aos professores do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Kleber Chavasco, Luiz Felipe, Luiz Cosme e Marília por todos os ensinamentos nos momentos de dúvidas;

Aos funcionários Antônio, Marcelo, Marta e Franciele por toda a ajuda e paciência;

Aos amigos do laboratório Mariana, Roberta, Naiara, Jéssica, Clara, Marina, Maísa, Jeferson e Claudio pelos ensinamentos e amizade;

Ao Prof Fabiano e a Luana pela ajuda nas análises de DQO;

A Kris pela ajuda nas análises de UV;

Ao Prof Luiz Alberto pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos amigos Denise, Gabriela, Laura, Nara e Vinicius pela amizade, conselhos, conversas e momentos compartilhados;

Aos amigos e aos professores do PPGETA pelos ensinamentos, amizade e contribuições para minha formação e desenvolvimento do trabalho;

Aos meus pais Mariana e João por serem meus alicerces e ensinarem-me a sonhar, pelo apoio incondicional as minhas escolhas e todo esforço para que eu alcance meus objetivos;

À minha irmã Marinês pela amizade incondicional, por todo o apoio e por ser um exemplo de determinação;

Ao Marco Túlio pelo companheirismo, apoio e paciência;

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado;

À UNIFAL por minha formação.

Muito obrigada!

Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.

(Rubem Alves)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos coletar, isolar, identificar e comparar fungos endofíticos associados às plantas de cafeeiro cultivadas sob diferentes manejos; avaliar o potencial biotecnológico e enzimático dos fungos selecionados e correlacionar este potencial enzimático com a capacidade de remediação destes fungos sobre o corante têxtil Brillante Azul de Remazol (RBBR) e efluentes gerados por indústrias têxteis. Foram coletadas folhas de plantas de cafeeiros mantidos sob manejos orgânico e convencional. Foram identificadas 39 morfoespécies de fungos endofíticos dentre os isolados provenientes do sistema orgânico e 27 morfoespécies oriundas do sistema convencional. Sete isolados degradaram o corante RBBR disposto em meio de cultura sólido e os quatro que apresentaram melhor descoloração detectada visualmente [CO. 5, CO. 10 (*Colletotrichum* sp.), CO.11a e CC. 22 (*Aspergillus niger*)] e o fungo padrão *Lentinula edodes* (INCQS 40220) foram analisados quanto à capacidade de produção de enzimas ligninolíticas e capacidade de descoloração em efluente sintético com e sem acréscimo de madeira. Todos os fungos analisados foram capazes de secretar Lacase e/ou Manganês peroxidase e de promover a descoloração do corante RBBR. Os fungos CO.5 e CO.10 apresentaram resultados promissores em efluente sintético, promoveram descoloração e secretaram enzimas do sistema ligninolítico. No entanto, *A. niger* (CC.22) foi mais eficiente, removendo 94,67% da cor em apenas 48 horas e foi selecionado para a análise de biodegradação do efluente têxtil. Nas análises em efluente têxtil *A. niger* (CC.22) foi capaz de produzir enzimas e remover até 72,22% de cor também em 48 horas de incubação, reforçando a hipótese de que este fungo basiomiceto apresenta potencial para ser avaliado em sistemas de remediação de poluentes, como os efluentes têxteis.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Biorremediação. Fungo endofítico. Descoloração. Sistema ligninolítico. Lacase. Manganês Peroxidase. RBBR. Efluente têxtil.

ABSTRACT

This study aimed to collect, isolate, identify and compare endophytic fungi associated with coffee plants grown under different managements; evaluate the enzymatic and biotechnological potential of selected fungi and correlate with the potential remediation ability of these fungi for textile dye Remazol Brilliant Blue (RBBR) and effluents generated by textile industries. We collected leaves of coffee plants kept under organic and conventional management systems. We identified 39 endophytic fungi morphospecies of isolates from organic system and 27 morphospecies from the conventional system. Seven isolates degraded dye RBBR arranged in solid medium and the four that showed better decolorization visually detected [CO. 5, CO. 10 (*Colletotrichum* sp.), CO.11a and CC.22 (*Aspergillus niger*)] and standard fungus *Lentinula edodes* (INCQS 40 220) were analyzed for their capacity to produce ligninolytic enzymes and decolorization capacity in synthetic wastewater with and without addition of wood. All fungi studied secreted laccase and/or manganese peroxidase. It also promoted decolorization of the dye RBBR. Fungi CO.5 and CO.10 promoted discoloration and secreted enzymes ligninolytic, showing promising results in synthetic effluent. However, *A. niger* (CC.22) was more efficient, removing 94.67% of the color in only 48 hours and was selected for biodegradation analysis of textile effluent. In the analyzes in textile effluent *A. niger* (CC.22) was capable to produce enzymes and remove up to 72.22% color also at 48 hours of incubation, reinforcing the hypothesis that this basidiomycete fungus has potential to be measured in systems for pollutants remediation, such as textile effluents.

Keywords: *Coffea arabica*. Bioremediation. Endophytic fungus. Discoloration. Ligninolytic system. Laccase. Manganese Peroxidase. RBBR. Textile effluent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do corante têxtil tipo antraquinona Brilhante Azul de Remazol.....	22
Figura 2 -	Similaridades estruturais entre um segmento da molécula de lignina e alguns substratos poluentes.....	30
Figura 3 -	Ciclo catalítico da enzima lacase.....	31
Figura 4 -	Ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.....	33
Figura 5 -	Fluxograma da técnica de bioensaio para a avaliação da fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> (alface).....	51
Figura 6 -	Placas com meio Agar Malte contendo fragmentos de folhas de <i>Coffea arabica</i> cultivados em manejo orgânico e fungos endofíticos já crescidos, após 4 dias de incubação.....	54
Figura 7-	Modelo de regressão polinomial quadrática que relaciona o crescimento radial dos fungos CO.1, CO.2 e CO.3, isolados de <i>Coffea arabica</i> de manejo orgânico e dos fungos CC.1, CC.2 e CC.3, isolados de <i>Coffea arabica</i> de manejo convencional, com o tempo de incubação, em dias.....	57
Figura 8 -	Descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol em meio Agar Malte após 14 dias de incubação à temperatura de 28°C. 1= CO.5, 2= CO.9, 3= CO.10 e 4= CO.11a isolados de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico; 5= CC.18, 6= <i>Aspergillus niger</i> CC.22 e 7= CC.24 isolados de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional e 8= controle sem inóculo.....	59
Figura 9 -	Descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol pelo fungo ligninolítico padrão <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.....	60
Figura 10-	Descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol pelo fungo endofítico identificado com CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	61
Figura 11-	Descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol pelo fungo endofítico identificado com CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	61
Figura 12-	Descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol por <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, sem adição de raspas de madeira ao meio, após 48 h de incubação, à temperatura de 28°C e agitação de 150 rpm.....	62

Figura 13-	Descoloração do corante RBBR por <i>Aspergillus niger</i> , sem adição de raspas de madeira ao meio, com 48 horas de incubação.....	63
Figura 14-	Varredura da absorvância do efluente têxtil após 40 dias de tratamento com o fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> em comparação ao controle não tratado.....	64
Figura 15-	Modelo de regressão polinomial quadrática que relaciona a atividade de Lacase produzida pelo fungo ligninolítico padrão <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	65
Figura 16-	Modelo de regressão polinomial quadrática que relaciona a atividade de Manganês Peroxidase do fungo ligninolítico padrão <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	65
Figura 17-	Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 11a, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	66
Figura 18-	Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	67
Figura 19-	Médias da atividade de Manganês Peroxidase em <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação...	70
Figura 20-	Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.....	71
Figura 21-	Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona a descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol por ação de enzimas presentes no sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	72
Figura 22-	Grafico do modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona a descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol por ação de enzimas presentes no sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	74

Figura 23-	Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona a descoloração do corante Brillhante Azul de Remazol por ação de enzimas presentes no sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, e cultivado em efluente têxtil, em função do tempo de incubação.....	74
Figura 24-	Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta as Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	77
Figura 25-	Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta as Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	78
Figura 26-	Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta o pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	81
Figura 27	Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona o pH do meio de incubação de <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, cultivado com e sem a adição de raspas de madeira, em função do tempo de incubação.....	82
Figura 28	Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona o pH do meio de incubação de <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, cultivado em efluente têxtil, em função do tempo de incubação.....	82
Figura 29	Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona o incremento da biomassa micelial do fungo endofítico CO. 11a, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, em função do tempo de incubação.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Principais poluentes do efluente têxtil.....	23
Quadro 2-	Classificação das morfoespécies fúngicas de acordo com a cor das colônias e a porcentagem de ocorrência em cada manejo.....	55
Quadro 3-	Atividade máxima de descoloração, descoloração enzimática e das enzimas Manganês Peroxidase e Lacase produzidas pelo fungo padrão <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220) e pelos fungos CO.5, CO.10 e CO.11a isolados de cafeeiro orgânico e <i>Aspergillus niger</i> CC.22 isolado de cafeeiro convencional.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Taxa de colonização e número de fragmentos de folhas e hastes de plantas de cefeiro <i>Coffea arabica</i> L. colonizados por fungos endofíticos nos sistemas de cultivo orgânico e convencional.....	55
Tabela 2 -	Médias do número de isolados por lavoura em cada manejo estudado.....	55
Tabela 3 -	Média do diâmetro de morfoespécies fúngicas isoladas de plantas de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional e orgânico, após 5 dias de cultivo em Agar Malte.....	56
Tabela 4-	Número médio de esporos produzidos por morfoespécies fúngicas isoladas de plantas de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional e orgânico.....	57
Tabela 5-	Viabilidade média de morfoespécies fúngicas isoladas de plantas de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional e orgânico, em valores de absorvância, após 10 dias de cultivo em Agar Malte.....	58
Tabela 6-	Médias da atividade de Lacase do fungo endofítico CO. 11a, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	66
Tabela 7-	Médias da atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	67
Tabela 8 -	Médias da atividade de Manganês Peroxidase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação e do tratamento utilizado.....	68
Tabela 9 -	Médias da atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação e do tratamento utilizado.....	68
Tabela 10-	Médias da atividade de Manganês Peroxidase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extratode Malte.....	69
Tabela 11-	Médias da atividade de Manganês Peroxidase produzida pelo fungo endofítico CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	69

Tabela 12-	Médias da atividade de Manganês Peroxidase em <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.....	70
Tabela 13-	Médias da atividade de Lacase em <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.....	71
Tabela 14-	Médias da atividade da enzima Manganês Peroxidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, cultivado em efluente têxtil.....	71
Tabela 15-	Descoloração média do corante Brilhante Azul de Remazol por ação das enzimas presentes no sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	72
Tabela 16-	Média da descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol pelo sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	73
Tabela 17-	Descoloração média do corante Brilhante Azul de Remazol por ação das enzimas presentes no pelo sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	74
Tabela 18-	Média das Proteínas Totais produzidas pelo fungo ligninolítico padrão <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220) com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	75
Tabela 19-	Média de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 11a, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	76
Tabela 20-	Média de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	77
Tabela 21-	Média de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	77

Tabela 22-	Médias de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	78
Tabela 23-	Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	79
Tabela 24-	Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 11a, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	79
Tabela 25-	Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	80
Tabela 26-	Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	81
Tabela 27-	Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.....	82
Tabela 28-	Incremento médio de biomassa micelial do fungo <i>Lentinula edodes</i> (INCQS 40220), em função do tempo de incubação.....	83
Tabela 29-	Incremento médio da biomassa micelial do fungo endofítico CO.5, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, em função do tempo de incubação.....	84
Tabela 30-	Incremento médio da biomassa micelial do fungo endofítico CO.10, isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo orgânico, em função do tempo de incubação.....	85
Tabela 31-	Incremento médio da biomassa micelial do fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional, em função do tempo de incubação.....	85
Tabela 32-	Resultados de Demanda Química de Oxigênio obtidos para efluente têxtil, antes e após o tratamento com o fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional.....	87

Tabela 33-	Médias da germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional.....	87
Tabela 34-	Comprimento de raízes e radículas de sementes de <i>Lactuca sativa</i> após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional.....	88
Tabela 35-	Porcentagem de inibição do crescimento das raízes e das radículas de sementes de <i>Lactuca sativa</i> após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional.....	89
Tabela 36-	Porcentagem de inibição da germinação relativa e absoluta de sementes de <i>Lactuca sativa</i> após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> , isolado de <i>Coffea arabica</i> L. de manejo convencional.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina

Abs - Absorbância

AM - Agar Malte

ANOVA - Análise de Variância

ATCC - American Type Culture Collection

BDA - Batata Dextrose Agar

BHI - Brain Heart Infusion

cm - Centímetro

Cu - Cobre

g - Gramas

µL - Microlitros

µm - Micrômetros

µmol - Micromols

KDa - Quilo daltons

Lac - Lacase

LiP - Lignina Peroxidase

LMES - Enzimas Modificadoras de Lignina ou Enzimas Ligninolíticas

M - Molar

mL - Mililitros

mM - Milimol

Mn - Manganês

MnP - Manganês Peroxidase

NaOH - Hidróxido de Sódio

nm - Nanômetros

nM - nanomol

pH - Potencial hidrogeniônico

RBBR - Remazol Brilliant Blue R

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UNIFAL-MG - Universidade Federal de Alfenas

UI - Unidade Internacional

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	Corantes	21
2.2	Efluentes têxteis	22
2.2.1	Efluentes têxteis: Tratamento.....	24
2.3.2	Toxicidade	25
2.4	Biorremediação	27
2.4.1	Biorremedição por degradação enzimática	29
2.5	Enzimas ligninolíticas	29
2.5.1	Lacase.....	30
2.5.2	Manganês Peroxidase.....	32
2.6	Fungos endofíticos.....	34
2.7	A espécie <i>Coffea arabica</i> L.....	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	Local de coleta	40
4.2	Coleta dos vegetais e isolamento dos fungos endofíticos	40
4.3	Caracterização e identificação preliminar das espécies isoladas.....	41
4.4	Teste de viabilidade dos isolados	42
4.4.1	Crescimento radial da colônia.....	42
4.4.2	Esporulação	42
4.4.3	Mecanismo de redução do derivado tetrazólio XTT.....	43

4.5	Seleção de fungos com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas - Teste de descoloração em placa.....	43
4.6	Teste de descoloração do efluente sintético	44
4.7	Teste de descoloração de efluente têxtil	45
4.7.1	Coleta e processamento de efluente têxtil bruto.....	45
4.7.2	UV– Análise espectral na região ultravioleta	46
4.8	Avaliação da Atividade Enzimática	46
4.8.1	Manganês peroxidase	46
4.8.2	Lacase.....	47
4.8.3	Cálculo das atividades ligninolíticas.....	47
4.8.4	Descoloração enzimática do corante RBBR	47
4.9	Quantificação de proteínas totais.....	48
4.10	Determinação da Biomassa Micelial.....	49
4.11	Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	49
4.12	Avaliação da fitotoxicidade.....	50
4.12.1	Testes de germinação de sementes de alface – <i>Lactuca sativa</i>	50
4.13	Análise dos dados	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Colonização e biodiversidade	54
5.2	Teste de viabilidade dos isolados	56
5.2.1	Crescimento radial da colônia.....	56
5.2.2	Esporulação	57
5.2.3	Mecanismo de redução do derivado tetrazólio XTT.....	58
5.3	Seleção de fungos com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas - Teste de descoloração em placa.....	58
5.4	Testes de descoloração em meio líquido	59
5.5	UV– Análise espectral na região ultravioleta	63

5.6	Avaliação da atividade enzimática	64
5.7	Descoloração de RBBR por ação enzimática	72
5.7	Quantificação de proteínas totais.....	75
5.8	Mensuração de pH.....	79
5.9	Determinação da Biomassa Micelial.....	83
5.10	Análise comparativa: Atividades de descoloração e enzimática máximas	85
5.11	Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	87
5.12	Avaliação da fitotoxicidade.....	87
6	DISCUSSÃO	90
6.1	Colonização e biodiversidade	90
6.2	Viabilidade dos isolados	90
6.3	Seleção de fungos com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas - Teste de descoloração em placa.....	91
6.4	Cinética de descoloração em meio líquido, atividade enzimática, produção de proteínas totais e incremento de biomassa micelial	92
6.5	Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	99
6.6	Avaliação da fitotoxicidade.....	99
7	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

O intenso crescimento populacional e o aumento da atividade industrial tem tornado os problemas ambientais cada vez mais críticos e freqüentes nas últimas décadas. Esta combinação faz com que os danos devidos à ação antrópica atinjam dimensões catastróficas, podendo ser observadas através de alterações na qualidade do solo, ar e água (KUNZ et al., 2002).

No contexto da contaminação de águas naturais, um dos grandes problemas da sociedade moderna, o setor têxtil apresenta especial destaque, tanto pelos enormes volumes de efluentes gerados por seu parque industrial (KUNZ et al., 2002), quanto pela composição dos mesmos, que os tornam um dos mais poluidores entre todos os efluentes gerados no setor industrial (NIEBISCH et al., 2010).

Para mitigar os danos causados, novas tecnologias, visando ao tratamento adequado dos efluentes têxteis, têm sido desenvolvidas, de forma a atender as imposições legais e a suprir as exigências de mercado, considerando custos, tempo e eficiência dos processos existentes na reciclagem e eliminação de toxicidade (KAMIDA et al., 2005).

Há diversas formas de tratamento para esses efluentes: físicos, químicos e biológicos. Dentre os processos biológicos, a biorremediação tem sido cada vez mais utilizada, sendo os microrganismos e as enzimas produzidas por eles intensamente estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente (KAMIDA et al., 2005).

Os fungos filamentosos apresentam características que lhe conferem vantagens sobre os demais microrganismos no processo de biorremediação. Entre os fungos filamentosos, os basidiomicetos de degradação branca, que atuam na deterioração da madeira, decompondo a matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres, são os principais fungos envolvidos na degradação poluentes (TUOMELA et al., 2000).

Dentre os fungos filamentosos, os fungos filamentosos endofíticos constituem uma fonte potencial de substâncias bioativas ainda pouco exploradas e que podem conferir a esses microrganismos potencial para biodegradação de poluentes. Já a espécie *Coffea arabica* L. possui considerável valor cultural e interesse econômico, sendo largamente cultivada e ocupando extensas áreas, atendendo aos pré-requisitos necessários à escolha de plantas para o isolamento de fungos endofíticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Corantes

A origem dos corantes têxteis é incerta, mas há indicações de seu uso pelo homem desde os primórdios das civilizações (ZANONI e CARNEIRO, 2001). Negro-de-Fumo (*Carbon Black*) foi o primeiro corante a ser conhecido pela humanidade. Por volta de 3.000 a.C., foram produzidos alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. Com o tempo, muitos corantes naturais foram sendo descobertos (ABIQUIM, 2012). Sua presença foi detectada em amostras de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2500 a.C (ZANONI e CARNEIRO, 2001).

Até meados do século XIX, predominavam apenas os pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais. A grande revolução na história desses compostos ocorreu quando o químico inglês William H. Perkin descobriu, em 1856, o primeiro corante sintético (malva), derivado do coque (ZANONI e CARNEIRO, 2001). Após essa descoberta, houve uma corrida dos químicos para conseguirem sintetizar outros corantes.

Corantes podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicadas a um material, conferem-lhe cor (ABIQUIM, 2012). Apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver, durante seu processo de síntese, até 500 reações intermediárias. Geralmente apresentam um grupo cromóforo, que dá cor ao composto pela absorção de uma parte de energia radiante, também conhecido como azo, antraquinona, nitro etc., e grupos auxiliares que propiciam sua afinidade, por exemplo, pela fibra têxtil, natural ou sintética (ZANONI e CARNEIRO, 2001). São solúveis, não abrasivos, mostram alta capacidade de absorção luminosa. Porém, a mesma solubilidade que confere aos corantes a capacidade de interagir com a superfície do material, pode causar toxicidade (SARON e FELISBERTI, 2006).

Os corantes estão agrupados em várias classes de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo, indigóides, ftalocianina, triarilmetano etc.) e modo de fixação à fibra, dentre elas, corantes ácidos, reativos, básicos, diretos, dispersos, azóicos, à cuba, de enxofre e complexados com metais (BANAT et al., 1996).

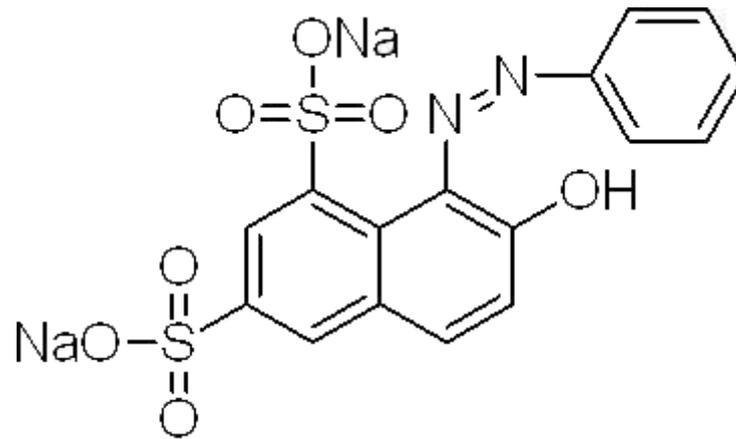


Figura 1 - Estrutura química do corante têxtil tipo antraquinona Brilhante Azul de Remazol (RBBR).

Existem mais de 10.000 diferentes corantes e pigmentos utilizados em indústrias de tingimento e impressão em todo o mundo (ASGHER; AZIM; BHATTI, 2009). Os principais grupos comercializados são os corantes azo, antraquinonas e indigóides. De acordo com o “Colour Index” (catálogo da Society of Dyers and Colourists) mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos estão associados à indústria têxtil (ZANONI e CARNEIRO, 2001). Sendo que a produção mundial de corante é estimada em 800.000 toneladas por ano e pelo menos 10-15% do corante usado é disperso para o ambiente em forma de resíduos (PALMIERI; CENNAMO; SANNIA, 2005; REVANKAR e LELE, 2007).

Dentre os corantes utilizados em indústrias têxteis, pode-se citar o RBBR (Figura 1), um corante do tipo antraquinona, a segunda classe mais importante de corantes têxteis (BAUGHMAN e WEBER, 1994). Este corante tem baixa toxicidade para os microrganismos e a sua utilização como um método de rastreio para avaliar a capacidade de degradar xenobióticos é comum (GLENN e GOLD, 1983).

2.2 Efluentes têxteis

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, gerando efluentes volumosos e complexos com elevada carga orgânica e elevado teor de sais inorgânicos, com baixos níveis de degradação (MELO e AZEVEDO, 2008).

Efluentes têxteis possuem características e composições variadas, que dependem do tipo de corante utilizado e do processo de coloração. Essas características, aliadas às características químicas que conferem grande estabilidade aos corantes, dificultam sua degradação, visto que eles são produzidos para resistir à exposição ao sabão, água, suor, luz e agentes oxidantes (KHALAF, 2008). Eles contêm, além dos corantes, outras substâncias utilizadas durante o processo de coloração, tais como goma, detergentes, soda cáustica, sabões, cloro, antiespumantes, formóis, resinas, óleos, entre outros (DELLAMATRICE, 2006). Um resumo dos principais componentes encontrados em efluentes de indústrias têxteis é descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais poluentes do efluente têxtil.

Poluente	Principais substâncias	Origem
Matéria orgânica	Amidos, enzimas, gorduras ácidos graxos, surfactantes e ácido acético	Limpeza, lavagens, tingimento
Cor	Corantes, impurezas de lã	Lavagem, tingimento
Nutrientes	Sais de amônia, uréia, tampões, surfactantes	Tingimento
pH e sais	Hidróxido de sódio, ácidos minerais e orgânicos, silicatos, sulfatos e carbonatos	Limpeza, alvejamento, tingimento, neutralização
Enxofre	Sulfatos, sulfitos e hidrosulfitos, ácido sulfúrico	Tingimento
Compostos tóxicos	Metais pesados, agentes oxidantes e redutores, biocidas, sais de amônio quaternário	Limpeza, alvejamento, tingimento, finalização

Fonte: RAMALHO (2005)

Os efluentes têxteis apresentam aparência desagradável e quando não tratados adequadamente, antes de seu despejo em águas naturais, podem modificar o ecossistema, causando sérios problemas de contaminação ambiental e toxicidade, interferindo na fotossíntese e diminuindo a dissolução do oxigênio na água, podendo permanecer cerca de 50 anos em ambientes aquáticos (NIEBISCH et al., 2010).

Dellamatrice (2005) cita ainda que além da poluição dos recursos naturais, o descarte de efluentes têxteis no ambiente pode trazer efeitos nocivos sobre a saúde humana. Estes resíduos se bioacumulam nos organismos vivos ao longo da cadeia alimentar. Muitas dessas

substâncias possuem potencial mutagênico e cancerígeno e os efeitos de sua entrada constante nos organismos ainda não são completamente conhecidos (BUMPUS, 1995). Cerca de 3.000 corantes azos comerciais foram considerados cancerígenos e não têm sido mais fabricados. Porém, em países em desenvolvimento continuam em uso alguns corantes de valor comercial elevado.

Considerando que a maioria dos corantes possui tempo de meia vida elevado, resíduos liberados persistem no ambiente por períodos muito longos e o tempo que seus efeitos continuam a serem sentidos podem superar décadas (GUARATINI e ZANONI, 2000).

2.2.1 Efluentes têxteis: Tratamento

Em decorrência de problemas ambientais e danos à saúde humana causados pela ação dos corantes, o governo tem adotado medidas que regulamentam o lançamento de efluentes em corpos de água (NIEBISCH et al., 2010). A Resolução nº. 430 instituída em 13 de maio de 2011 pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementando e alterando a Resolução nº. 357, de 17 de março de 2005, também do CONAMA. A Deliberação Normativa Conjunta do Conselho Estadual de Política Ambiental e o Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais (COPAM/CERH-MG) n.º 1, de 05 de Maio de 2008 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, no Estado de Minas Gerais.

Para atender às exigências da legislação, esforços estão sendo voltados para a busca de formas de tratamento de efluentes de indústrias têxteis. Há diversas formas de tratamento desses efluentes: físicos, químicos e biológicos, sendo que cada técnica apresenta suas limitações (DELLAMATRICE, 2006). Os métodos químicos compreendem: reação de Fenton, ozonação, processos fotoquímicos e destruição eletroquímica. Os mais utilizados são processos oxidativos, em decorrência de sua simplicidade de aplicação. A oxidação química remove a cor de efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes (NIEBISCH et al., 2010). Os métodos físicos consistem em técnicas de remoção resultantes de dois mecanismos: adsorção, onde o corante é fixado a um suporte ou resina, como carvão ativado ou outros materiais e troca iônica. Estes são influenciados por múltiplos

fatores físico-químicos como a interação corante/suporte, área de superfície do sorvente, tamanho da partícula, pH, temperatura e tempo de contato (SLOKAR e LE MARECHAL, 1997; ROBINSON et al., 2001).

No entanto, métodos químicos e físicos para o tratamento de efluentes não são amplamente aplicados às indústrias têxteis devido aos custos exorbitantes e problemas de eliminação dos resíduos (VERMA et al., 2010).

Dentre os métodos biológicos, o mais utilizado é o sistema de lodos ativados, o qual consiste na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante um tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica (BITTON, 1994 *appud* KUNZ, 2002). É o tratamento mais utilizado pela indústria têxtil em geral, precedido por processos físico-químicos de precipitação-coagulação. Este sistema apresenta eficiência relativamente alta, em torno 80%, porém o lodo gerado não pode ser reaproveitado ou descartado em aterros comuns em decorrência da alta concentração de corantes adsorvidos, necessitando de um novo tratamento (ROBINSON et al., 2001) e/ou de estudos visando o estabelecimento de novas formas de uso.

Processos alternativos para o tratamento mais eficiente dos efluentes têxteis estão sendo desenvolvidos, objetivando a degradação completa ou parcial dos poluentes. Entre tais processos, o tratamento biológico, principalmente com microrganismos, recebe atenção especial. Em decorrência disso, vem aumentando o interesse pela busca de microrganismos versáteis capazes de degradar de maneira eficiente estes resíduos a um baixo custo operacional (NIEBISCH et al., 2010).

Maiores níveis de degradação são obtidos através da seleção correta de microrganismos e estudos das condições favoráveis do meio. Porém, a ampla variedade estrutural dos corantes dificulta o isolamento de organismos capazes de degradar os diversos grupos químicos presentes. Ênfase tem sido dada ao estudo de enzimas do sistema ligninolítico fúngico e com largo espectro de ação tais como peroxidases e lacases (DELLAMATRICE, 2006).

2.3.2 Toxicidade

A mesma característica que permite ao corante interagir com a superfície do material, conferindo-lhe interesse comercial, pode torná-lo tóxico (SARON e FELISBERTI, 2006). Sua

toxicidade varia com a estrutura e grupo químico sendo os mais tóxicos os corantes à base de benzinas e os corantes catiônicos (DELLAMATRICE, 2006).

Zee (2002) analisou mais de 3.000 corantes quanto à toxicidade sobre peixes e mamíferos, onde menos de 2% deles apresentaram uma toxicidade considerável, sendo os corantes básicos, em ambos os casos, os que apresentaram maior toxicidade.

Os riscos à saúde humana variam de acordo com o tempo e modo de exposição. Alguns compostos não incorporados totalmente ao tecido podem causar dermatites e problemas respiratórios como asma e rinite alérgica (NILSSON et al., 1993). Quando ingeridos, apresentam maiores riscos relacionados às etapas de biotransformação (rotas do metabolismo destes corantes nos organismos), pois quando catalisados por enzimas específicas, podem gerar substâncias com propriedades carcinogênicas e mutagênicas (HUNGER, 1994).

Atenção especial deve ser dada ao efluente tratado para a remoção da cor, uma vez que a redução de coloração não implica necessariamente em redução de toxicidade de efluentes têxteis, portanto, mesmo após tratamentos que resultem em descoloração, não podem ser considerados não tóxicos (NIEBISCH et al., 2010). Para a degradação ser considerada eficiente deve resultar em redução nos níveis de toxicidade pela completa degradação das moléculas sem a formação de metabólitos tóxicos. O monitoramento da formação ou não desses metabólitos durante a degradação pode se dar através de testes utilizando organismos sensíveis a substâncias tóxicas como bioindicadores (DELLAMATRICE, 2005).

Estudos realizados por Gottlieb et al. (2003) demonstraram que após tratamento para redução de cor do corante Reactive Black 5 houve aumento da toxicidade para a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, organismo utilizado em avaliações de toxicidade de substratos como efluente e lodo têxtil.

Ensaio de toxicidade em organismos bioindicadores têm sido amplamente empregados para avaliação da qualidade de diferentes compartimentos ambientais (SAURABH et al., 2005; SVENSSON, 2005). Os testes ecotoxicológicos são capazes de identificar os efeitos prejudiciais de diversas substâncias, e são úteis para avaliar a qualidade da água e das águas residuais (COSTA et al., 2008; MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

A realização de bioensaios para a avaliação de toxicidade tem aumentado nas últimas décadas, uma vez que são capazes de integrar os efeitos de todos os contaminantes, incluindo sinergismo e antagonismo, os quais não podem ser identificados apenas por análises químicas (PANDARD et al., 2006).

Devido à complexidade dos ecossistemas aquáticos e das características multifuncionais dos testes de toxicidade, estes podem ser realizados com a mais variada gama de espécies biológicas de diferentes níveis tróficos, como cladóceros – daphnias e ceriodaphnias (VERSTEEG et al., 1997; ALVES, 1999; FERNANDEZ-ALBA et al., 2002; MENEZES et al., 2005), crustáceos (BIZUKOJE et al., 2005; SAUER et al., 2005), peixes (MENEZES et al., 2005), algas (TSVETNENKO e EVANS, 2002; FERNANDEZ-ALBA et al., 2002), bactérias (VANDERMEULEN FODA; STUTTARD, 1985; FERNANDEZ-ALBA et al., 2002; GOTTLIEB et al., 2003), células (BHAT et al., 2001), plantas (KUMMEROVÁ e KMENTOVÁ, 2004; CASA et al., 2003; ORTEGA et al., 1996) etc, dependendo do substrato a ser analisado e da disponibilidade de cada pesquisador.

2.4 Biorremediação

A biorremediação é um processo no qual, organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados para controlar e destruir compostos contaminantes. Essa alternativa tecnológica é atraente pela possibilidade de obter-se a completa degradação do poluente, isto é, sua mineralização, ou sua transformação para produtos finais menos tóxicos ou inócuos (MELO e AZEVEDO, 2008). Este processo de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual, como alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, águas subterrâneas e solos, além de resíduos industriais em aterro ou áreas de contenção (GAYLARDE, 2005).

Na biorremediação microbiana, são empregados microrganismos ou suas enzimas para degradar compostos poluentes a formas que não oferecem riscos de contaminação, para que o ambiente retorne à sua condição original. É uma metodologia atrativa e confiável, considerada muito eficiente, além de econômica, versátil e principalmente por causar menor perturbação ao ambiente (GAYLARDE, 2005).

Os fungos são capazes de secretar uma grande variedade de enzimas eficazes, que são usados para auxiliar a sua nutrição (BENNETT, 1998), e podem também deteriorar-se vários materiais naturais, refinados ou transformados (ANASTASI, 2012).

A utilização de microrganismos no saneamento básico e ambiental é prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamento de águas residuárias e resíduos sólidos. É evidente que a capacidade microbiana de catabolizar

diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo desses compostos fontes nutricionais e energéticas, é o que possibilitou o emprego desses agentes biológicos, pela engenharia sanitária, como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no ambiente (VAZOLLER, 2001).

As pesquisas de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes (KAMIDA et al., 2005). Algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, fazem com que estes tenham melhores potenciais para degradação do que as bactérias. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse: meios com valores baixos ou elevados de pH, pobres em nutrientes e com pouca umidade, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microrganismos (MOLLEA et al., 2005).

Dentre os fungos de interesse, estão os fungos endofíticos que constituem uma enorme diversidade de espécies que habitam plantas e merecem destaque especial devido à grande diversidade química, ineditismo de moléculas e suas atividades biológicas (BORGER, 2008; GUO et al., 2008). Outros fungos de destaque são os fungos decompositores da madeira, que podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca (*White-rot fungi*), de podridão parda (*Brown-rot fungi*) e de podridão mole (*Litter-rot fungi*) (Tabela 4). Entre eles, os fungos de podridão branca são considerados os organismos mais eficientes na biodegradação de poluentes (GLENN e GOLD, 1983; PASZCZYNSKI et al., 1992; SPADARO et al., 1992; POINTING, 2001; WESENBERG et al., 2003) o que torna o estudo destes organismos bastante interessante para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis (NIEBISCH et al., 2010).

Maiores níveis de degradação são obtidos através da seleção de microrganismos com habilidade para degradação e estudos das condições favoráveis do meio. Porém, a ampla variedade estrutural dos corantes dificulta o isolamento de organismos capazes de degradar os diversos grupos químicos presentes. Ênfase tem sido dada ao estudo de enzimas do sistema ligninolítico fúngico e com largo espectro de ação tais como peroxidases e lacases (DELLAMATRICE, 2006).

Os produtos finais da degradação do substrato pelas enzimas fúngicas podem ser utilizados como fertilizantes em plantações, suplementos para reação de animais ou ainda serem reciclados e misturados a outros materiais orgânicos para cobertura de plantações (ANDRADE, 2011).

2.4.1 Biorremediação por degradação enzimática

Devido à complexidade dos resíduos encontrados nos efluentes de indústrias têxteis, muitas vezes a degradação tem sido obtida com a combinação de mais de um tratamento. Assim, alguns tratamentos são capazes de remover a cor, porém não degradam completamente a molécula, necessitando de um tratamento posterior para completar a degradação dos metabólitos formados. Enzimas não específicas, em geral, são capazes de iniciar a degradação, aumentando a degradabilidade para o tratamento seguinte (DELLAMATRICE, 2006).

O uso de enzimas imobilizadas em processos industriais é de grande interesse devido à facilidade de sua obtenção através de processos de biotecnologia e suas vantagens em relação aos catalisadores químicos, como reutilização, maior especificidade, menor consumo energético, maior velocidade de reação e redução dos custos de maquinaria e laboratoriais (MUSSATO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Reys (2003) aponta ainda que as principais vantagens da utilização de sistemas enzimáticos em vez de tratamentos convencionais em efluentes têxteis sejam a sua aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em altas e baixas concentrações de compostos tóxicos contaminantes, atuação em amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, fácil processo de controle, entre outras. A crescente utilização de enzimas em tratamento de poluentes específicos tem possibilitado a produção de enzimas mais baratas e facilmente disponíveis.

As enzimas responsáveis pela degradação dos corantes são as enzimas modificadoras de lignina ou também denominadas enzimas ligninolíticas (LMES) (DELLAMATRICE, 2006). Estas são amplamente produzidas por fungos ligninolíticos como os basidiomicetos ligninolíticos, que atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a reciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA et al., 2000).

2.5 Enzimas ligninolíticas

As LMES, são oxidoredutases envolvidas na degradação e mineralização da lignina, apresentam baixa especificidade, o que as torna capazes de degradar, além da lignina, um

amplo espectro de organopoluentes persistentes com similaridades estruturais à lignina, dentre eles os corantes têxteis (Figura 2) (NIEBISCH et al., 2010).

Duas estratégias têm sido propostas para a utilização de LMES para a degradação de compostos recalcitrantes: a transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos pré-selecionados, e o uso de enzimas extraídas/purificadas do meio de cultura. Contudo, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições empregadas durante o processo de biodegradação (TRUPKIN et al., 2003).

As principais enzimas envolvidas são lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases (DELLAMATRICE, 2006).

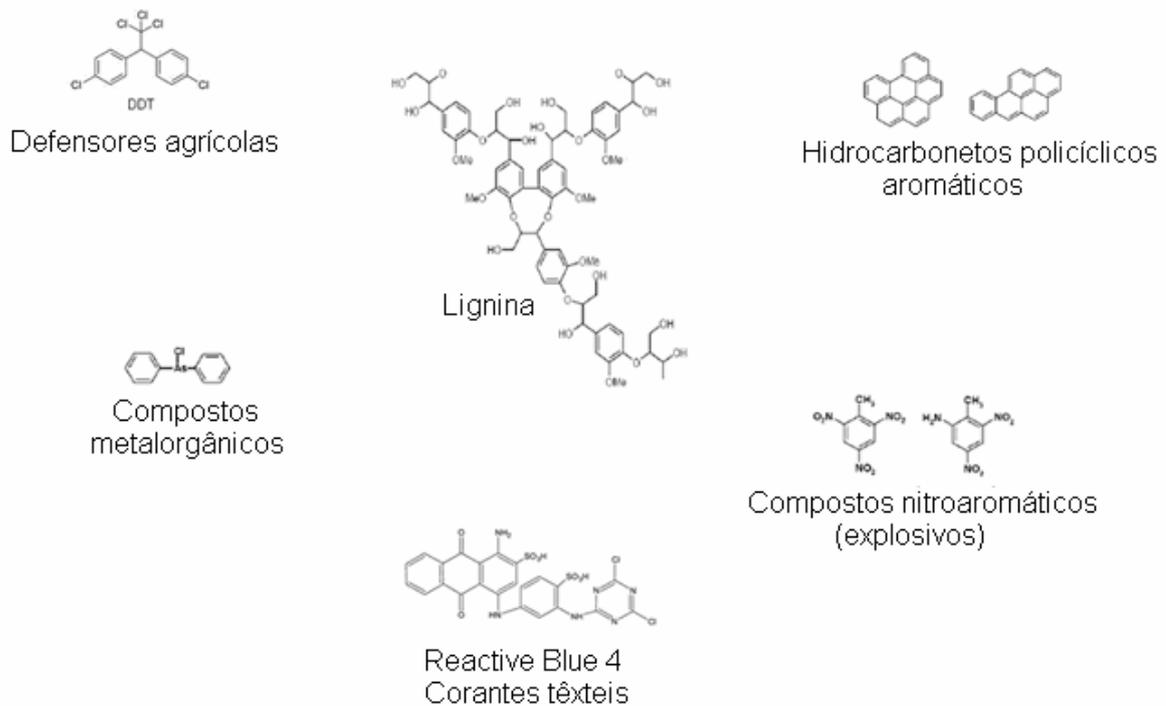


Figura 2 - Similaridades estruturais entre um segmento da molécula de lignina e alguns substratos poluentes.

Fonte: NIEBISCH et al. (2010).

2.5.1 Lacase

Lacase é uma enzima que pertence à família das multicobre-oxidases (grupo de oxidases que complexam cobre) (DURÁN e ESPÓSITO, 2008). Estas enzimas podem ser extra ou intracelulares e catalisam tanto depolimerização quanto polimerização de seus

substratos (RIVA, 2006). Catalisam a oxidação de uma variedade de doadores aromáticos de hidrogênio com a concomitante redução de oxigênio à água. Além de oxidar ácidos fenólicos e metoxifenólicos, também realizam descarboxilação e demetilação destes (REDDY, 1995; BANCI et al., 1999; WONG e YU, 1999; WESENBERG et al., 2003; CAVALLAZZI et al., 2004). Estas enzimas podem ser produzidas por plantas e por fungos, sendo secretadas pela maioria dos basidiomicetos. As massas molares variam dentro da faixa de 60-100 KDa (DURÁN e ESPÓSITO, 2008).

As lacases fúngicas em geral possuem três átomos de cobre embora no caso da enzima produzida por *Trametes versicolor* sejam encontrados quatro átomos de cobre, todos no estado de oxidação Cu^{2+} na enzima nativa. Catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos, gerando radicais fenoxilos (HIGUCHI, 1990; DURÁN, 1997; MAYER, 2002). Durante o ciclo catalítico da lacase, ocorre a redução de uma molécula de oxigênio à duas moléculas de água, simultaneamente à oxidação de quatro moléculas de substrato para produzir quatro radicais livres (Figura 3) (RIVA, 2006).

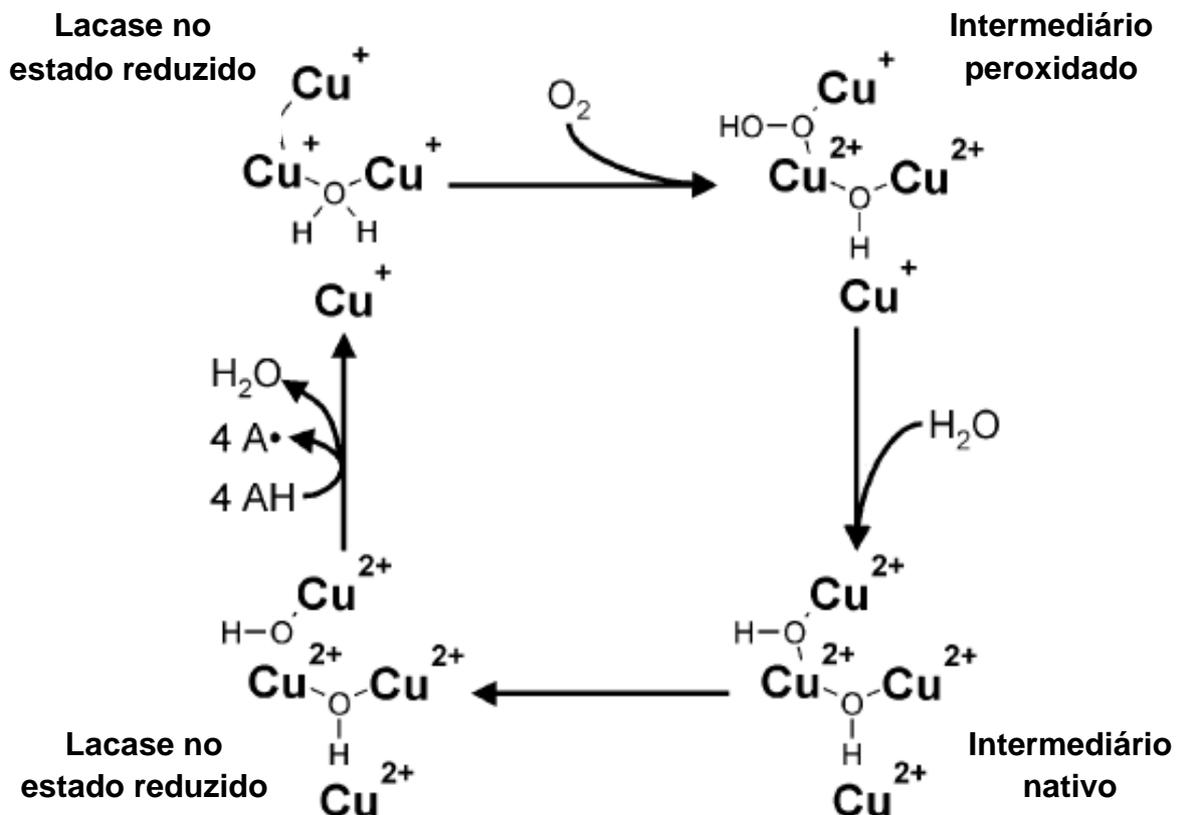


Figura 3 - Ciclo catalítico da enzima lacase.
Fonte: WESENBERG et al. (2003).

A oxidação de compostos não fenólicos pela enzima ocorre através de um composto intermediário ou “mediador”. Em geral, um mediador pode ser definido como uma molécula com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos. Depois de oxidado pela enzima, o mediador sai de seu sítio ativo e pode oxidar qualquer substrato, que, devido ao seu tamanho, não consegue entrar diretamente no sítio enzimático. A forma oxidada do mediador é distinta estruturalmente da enzima oxidada, o que lhe permite diferentes mecanismos de oxidação, e conseqüentemente aumenta a gama de substratos suscetíveis a ação da enzima (BAIOCCO et al., 2002).

A lacase de *T. versicolor* pode oxidar modelos de lignina não fenólicos na presença de ABTS ou siringaldeído, assemelhando-se a LiP (DURÁN e ESPÓSITO, 2008).

Devido a essas várias funções e a não especificidade pelo substrato, a lacase pode ser utilizada em muitos processos industriais como *biopulping*, (processamento enzimático da polpa de papel), branqueamento de corantes têxteis, remoção de compostos fenólicos, desintoxicação de efluentes e outros processos (NYANHONGO et al., 2002).

2.5.2 Manganês Peroxidase

A MnP foi descoberta em *Phanerochrata cryosporuim* junto à LiP. Esta enzima é a mais comum das ligninas peroxidase modificadas, produzida por quase todos os basidiomicetos colonizadores de madeira que causam podridão-branca e vários fungos do solo, colonizando a serrapilheira em decomposição. Esta enzima é extracelular, glicosilada, dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{2+} . Possui massa molar de 45-47 kDa e um grupo prostético heme (SCHELLER e ULVSKOV, 2010).

MnP pode oxidar uma grande faixa de substratos através da oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+} , ligando-se a substâncias quelantes excretadas também pelo fungo (PAPINUTTI e FORCHIASSIN, 2004).

O ciclo catalítico desta enzima é iniciado pela ligação de H_2O_2 a enzima nativa férrica e formação do complexo ferro-peróxido. A quebra da ligação oxigênio – peróxido de hidrogênio requer a transferência de dois elétrons do grupamento heme da enzima, resultando na formação do composto I da manganês peroxidase e uma molécula de água. A seguir, um íon Mn^{2+} doa um elétron para o composto I e há a formação do composto II e do íon Mn^{3+} . O composto II é reduzido de maneira similar à descrita anteriormente e outro Mn^{3+} é formado a

partir de um Mn^{2+} regenerando, deste modo, a enzima férrica nativa (CAMERON et al., 2007).

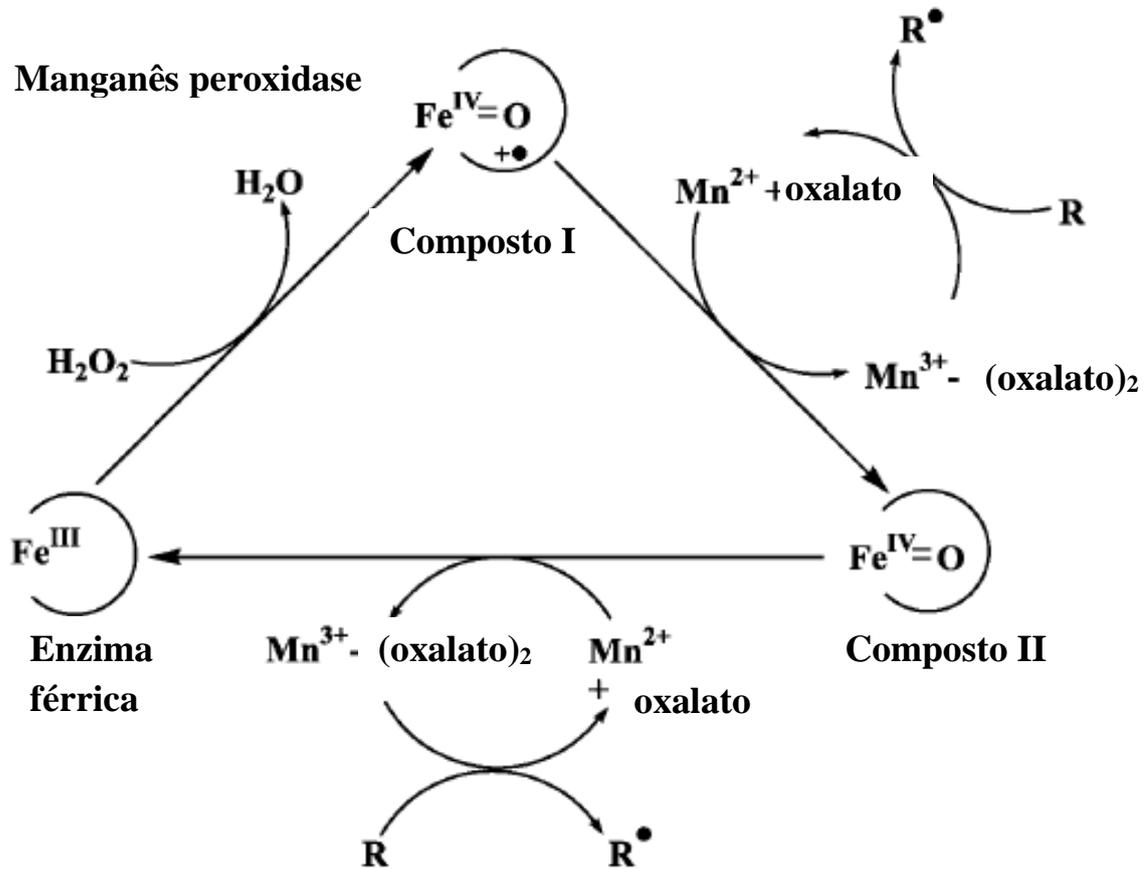


Figura 4 - Ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.
Fonte: CAMERON et al. (2007).

O composto I é capaz de oxidar vários compostos fenólicos, enquanto a redução do composto II requer exclusivamente Mn^{2+} como substrato. Mn^{3+} é estabilizado por ácidos orgânicos secretados por vários fungos, os quais quelam e oxidam Mn^{3+} , como por exemplo, o ácido oxálico. Este, quando quelado, age como um mediador difusível de óxido-redução, degradando esqueletos fenólicos, tióis e aminas aromáticas, degradando e depolimerizando, assim, seu substrato natural (lignina), assim como compostos xenobióticos (REDDY, 1995; BANCI et al., 1999; MESTER e TIEN, 2000; WESENBERG et al., 2003). Desta maneira, ácidos orgânicos são tidos como a origem de radicais centrados em carbono, radicais peróxil e superóxidos, que podem ser fonte de peróxidos para a utilização por MnP ao invés de H_2O_2 . Conseqüentemente, fungos que carecem de enzimas produtoras de H_2O_2 podem ser eficientes degradadores de lignina (HOFRICHTER, 2002). A degradação *in vitro* da lignina e outras

moléculas recalcitrantes por MnP é aumentada na presença de tióis (glutaciona reduzida e cisteína) e ácidos graxos insaturados (WESEMBERG et al., 2003).

2.6 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são aqueles cultiváveis ou não, que penetram a planta e vivem em seu interior durante parte ou todo o seu ciclo de vida. Estes fungos interagem com outras espécies de microrganismos, sem causar algum dano ou prejuízo ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

Estes microrganismos foram descritos pela primeira vez por Bary (1866), permanecendo durante mais de um século quase que ignorados. Porém, as constatações sobre suas funções reais no interior dos vegetais despertaram o interesse pelos microrganismos endofíticos, surgindo assim um campo de valor biotecnológico que vem resultando em um maior conhecimento destes seres e suas relações não totalmente esclarecidas com a planta hospedeira (PEIXOTO NETO et al., 2002).

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é imensa. Estima-se que cada espécie vegetal possua microrganismos endofíticos ainda não classificados e com propriedades pouco conhecidas, mas potencialmente de interesse aplicado (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Devido a sua ampla distribuição dentro das plantas, os endófitos podem ser isolados de raízes, folhas e caules, e alguns de flores, frutos e sementes (LODEWYCKX et al., 2002). Além disso, são encontrados na maioria das plantas, sendo considerados extremamente abundantes, bastante diversos (HALLMANN et al., 1997; RYAN et al, 2008), e conhecidos por desempenhar um papel benéfico para suas plantas hospedeiras (MELO e AZEVEDO, 2008).

Microrganismos endofíticos podem facilitar o crescimento da planta pelo fornecimento de hormônios e aumentar a resistência das mesmas a agentes patogênicos, falta de umidade, e até mesmo a herbívoros (SAIKKONEN et al., 2006; TAGHAVI et al., 2010). Simultaneamente, a planta fornece um ambiente favorável para o desenvolvimento dos microrganismos endofíticos de modo a reduzir estresses bióticos e abióticos que poderiam atuar na colonização dos endófitos (NEWMAN e REYNOLDS, 2005).

Pesquisas sugerem que os efeitos benéficos, promovidos pelos fungos endofíticos, podem, em caso de plantas que crescem em locais contaminados, estender-se à degradação de compostos xenobióticos (GERMAINE et al., 2006).

A versatilidade bioquímica e diversidade de microrganismos endofíticos representam uma enorme variedade de genes que são ainda desconhecidos. Esta se descobrindo cada vez mais funções gênicas, particularmente para remediação ambiental e propósitos industriais (MELO, 2005).

Várias modificações fisiológicas em plantas foram relacionadas com a presença de microrganismos que habitam seu interior. Alguns endófitos associados a folhas e pecíolos têm alta produção de enzimas, como celulasas e ligninases. Esses fungos, principalmente os pertencentes ao gênero *Xylaria*, podem iniciar o processo de queda das folhas atuando por degradação da celulose e lignina, após a morte do tecido (CARROLL e CARROLL, 1978).

A identificação de novas substâncias e as atividades biológicas já estabelecidas com o cultivo de fungos endofíticos indicam que esses microrganismos constituem uma fonte potencial de substâncias bioativas e novas entidades químicas que ainda é pouco explorada (GUIMARÃES, 2006). Há dados na literatura que reportam a habilidade de fungos endofíticos em produzir metabólitos secundários bioativos de diversas classes químicas, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, peptídeos, esteróides, xanonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, terpenos, citocalasinas, compostos alifáticos e clorados (TAN e ZOU, 2001; SCHULZ e BOYLE, 2005).

Deng et al. (2011) mostraram que um fungo endofítico, identificado como *Mucor* sp. CBRF59, isolado de *Brassica chinensis* foi potencialmente aplicável para a biorremediação de solos contaminados com metais, como cádmio e chumbo. Resultados satisfatórios também foram encontrados para biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo pelos fungos endofíticos *Neotyphodium coenophialum* e *Neotyphodium uncinatum* isolados das gramíneas *Festuca arundinacea* Schreb. e *Festuca pratensis* Huds, respectivamente, por Soleimani e colaboradores (2010).

Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares (CARROLL e PETRINI, 1983).

Strobel e Daisy (2003) afirmam que a seleção das plantas hospedeiras para o isolamento de endofíticos, que sejam interessantes do ponto de vista químico e biológico, deveria ser feita baseada em alguns critérios: i) a planta deve apresentar um histórico etnobotânico, ii) deve adaptar-se facilmente ao meio ambiente, podendo apresentar atividade

alelopática, iii) deve crescer em regiões de alta diversidade e /ou iv) deve ser endêmica (BORGER, 2008). O cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.) atende à maioria destes requisitos, apresentando um grande valor econômico, como fonte de grão utilizados na alimentação; por ser originário do continente africano e ter se adaptado, quando introduzido pelos colonizadores nas novas colônias americanas, provocando um impacto socioeconômico (FERRÃO, 1992) e se espalhado com facilidade pelo continente, inclusive em áreas de alta diversidade, como regiões de mata atlântica.

2.7 A espécie *Coffea arabica* L.

O café é o principal gênero da família Rubiácea, que possui mais de 6.000 espécies. Atualmente, duas espécies deste gênero apresentam importância econômica: *Coffea arabica* L. (aproximadamente 70% da produção mundial) e *Coffea canephora* (aproximadamente 30% da produção mundial) (MATIELLO et al., 2002).

O cafeeiro é uma planta natural das estepes da Etiópia que chegou ao Brasil e teve sua cultura iniciada 1727, no Pará. Ao longo dos anos, quase que de mãos em mãos as sementes do café foram “descendo” a costa do litoral brasileiro, e alcançando praticamente todo o território nacional. Muitas regiões produtoras estão localizadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo (SEDIYAMA et al., 2001).

Após sua difusão para todo o país, a cultura do café acabou por se transformar numa das maiores culturas propulsoras da economia desde a época da colonização, sendo um dos principais produtos agrícolas da pauta de exportações e comércio do Brasil atualmente (CONAB, 2013).

O Brasil é o maior produtor de café do mundo (DaMATTA, 2004) e a produção do café arábica representa 74,71% (34,99 a 37,47 milhões de sacas) da produção do País. O maior produtor destes grãos é o Estado de Minas Gerais, com 67,93% (24,25 a 25,45 milhões de sacas) de café beneficiado. Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1.241,12 mil hectares, predominando a espécie arábica com 97,7%. A área total estadual representa 52,49% da área cultivada com café no País, e conseqüentemente o primeiro do ranking nacional (CONAB, 2013).

As plantas de café são arbustos perenes ou pequenas árvores. Apresentam fases de florescimento, formação e maturação dos frutos, compreendidas nos meses de outubro a

março, que corresponde ao período de renovação de ramos e de folhas; e fase de colheita e repouso, de junho a setembro (SEDIYAMA et al., 2001).

Existem diversos tipos de manejo dos agroecossistemas cafeeiros, sendo o manejo convencional e orgânico de ampla utilização (LOPES e FERRAZ, 2009) na região Sul de Minas Gerais.

Os sistemas ditos convencionais representam monocultivo, com uso de grandes quantidades de insumos, como fertilizantes inorgânicos e fungicidas sistêmicos, que podem ocasionar alteração na planta (ALMEIDA, 2007), nos organismos associados e em seu entorno.

A produção orgânica é baseada em princípios de diversificação, reciclagem, processos biológicos e imitação de habitats naturais (IFOAM, 1996) e pode ser uma alternativa interessante sob os aspectos ambiental, social e econômico, pois não contamina o meio ambiente nem as pessoas direta e indiretamente envolvidas, além de agregar mais valor ao produto final (RICCI et al., 2006). Na cafeicultura orgânica, a diversificação do sistema pode ser obtida pela incorporação de árvores (GUHARAY et al., 2001) ou outras plantas de interesse econômico, como milho ou feijão.

Em relação ao cafeeiro, algumas informações sobre a diversidade, frequência e distribuição de fungos endofíticos já são conhecidas. No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade e os metabólitos produzidos pelos microrganismos presentes nos sistemas alternativos de cultivo, quando comparados aos tradicionais (ALMEIDA, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar a diversidade e o potencial remediador sobre corantes têxteis, da comunidade endofítica fúngica associada à espécie *Coffea arabica* L. proveniente de manejos convencional e orgânico no Sul do Estado de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- i) Coletar e isolar fungos endofíticos associados às plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes propriedades no município de Poço Fundo, no estado de Minas Gerais;
- ii) Avaliar se existe e quais são as diferenças entre os fungos isolados em comunidades endofíticas de cultivos com manejo convencional e orgânico;
- iii) Selecionar linhagens fúngicas com capacidade de produzir enzimas ligninolíticas e degradar o corante RBBR em meio sólido;
- iv) Determinar a presença e a atividade das enzimas manganês peroxidase e lacase nos fungos isolados dos diferentes cultivos de café, e no fungo padrão *Lentinula edodes* INCQS 40220;
- v) Testar o potencial de remediação de efluentes de indústria têxtil pelos microrganismos selecionados;
- vi) Comparar o perfil de degradação dos fungos isolados dos diferentes cultivos de café e do fungo *Lentinula edodes* INCQS 40220 o qual apresenta conhecida capacidade degradativa de corantes;
- vii) Comparar a capacidade enzimática entre os fungos isolados dos diferentes cultivos de café e do fungo *Lentinula edodes* INCQS 40220 para avaliar o potencial dos endófitos isolados para tratamento de efluentes;
- viii) Avaliar e comparar o perfil de incremento de biomassa dos fungos selecionados na presença do corante RBBR e do efluente de indústria têxtil;

- ix) Monitorar e avaliar o comportamento dos valores de pH do meio de crescimento dos fungos selecionados;
- x) Avaliar a eficiência do tratamento do efluente têxtil por meio da análise de DQO e teste de fitotoxicidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de coleta

As amostras de cafeeiro foram coletadas em seis lavouras, sendo três delas mantidas sob manejo convencional, e localizadas a 21,875021° Lat. S; 45,895783° Long. O, 21°96'45" Lat. S; 45°89'67" Long. O e 21°88'58" Lat. S; 45°91'38" Long. O. E três lavouras mantidas sob manejo orgânico localizadas a 21°89'59" Lat. S; 45°89'45" Long. O, 21°93'85" Lat. S; 45°90'87" Long. O e 21°88'70" Lat. S; 45°91'35" Long. O, todas situadas em propriedades rurais no município de Poço Fundo, no estado de Minas Gerais.

Um pequeno fragmento da planta de café foi retirado para a confecção de uma exsicata depositada no UALF- Herbário da Universidade Federal de Alfenas, identificada sob número de tombo 2274.

4.2 Coleta dos vegetais e isolamento dos fungos endofíticos

As folhas dos espécimes de cafeeiro foram coletadas de seis plantas aparentemente saudáveis em cada lavoura, escolhidas aleatoriamente. Foram retiradas folhas maduras de ramos plagiotrópicos, que se originam do ramo principal.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e processadas no máximo 48 horas após a coleta.

Foram utilizadas cinco folhas de cada planta coletada, essas folhas foram desinfetadas superficialmente com álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (2 minutos), álcool 70% (30 segundos) e água destilada esterilizada para lavagem (COLLADO et al., 1996). Após desinfecção, as folhas foram transferidas para placas de Petri estéreis e cinco quadrados de aproximadamente 5 mm foram retirados de cada folha, com auxílio de pinça e bisturi. Os fragmentos foram transferidos para a superfície do meio Batata Dextrose Agar (BDA) disposto em placa de Petri, e contendo Cloranfenicol (50mg/L) para inibição do crescimento de bactérias. Alíquotas da água destilada utilizada no processo de desinfecção também foram plaqueadas para assegurar que somente os fungos endofíticos fossem isolados.

Os microrganismos obtidos no isolamento só foram utilizados quando o controle apresentou resultado negativo. As placas foram incubadas a 25-28 °C por um período de até 15 dias, e, após crescimento, as colônias foram transferidas para novo meio BDA, em placa, para purificação dos isolados fúngicos (COLLADO et al., 1996).

Todos os isolados de fungos filamentosos e leveduras obtidos foram purificados em meio BDA e preservados, em duplicata, em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967).

4.3 Caracterização e identificação preliminar das espécies isoladas

A identificação de fungos endofíticos é realizada com base principalmente na fase assexuada, devido à dificuldade que estes têm de formar estruturas reprodutivas sexuais em meio de cultura. Fez-se o agrupamento em morfoespécies de acordo com suas características em cultura (BAYMAN et al., 1998). Para tal, as amostras foram submetidas ao teste de microcultivo e colônia gigante, seguido pela identificação morfológica baseada na literatura especializada (atlas e livros de taxonomia) (GAMS; HOEKSTRA; APTROOT, 1998; HOOG, et al., 2009; TORTORA, 2005; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Os resultados de todas as coletas foram combinados para as análises. A taxa de colonização foi determinada de acordo com Petrini e colaboradores (1982).

$$\% \text{ de colonização} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de fragmentos de folha na amostra com } \geq 1 \text{ isolado}}{\text{N}^\circ \text{ total de fragmentos de folha na amostra}}$$

$$\% \text{ de isolamento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de isolados obtidos em uma dada amostra}}{\text{N}^\circ \text{ total de fragmentos de folha na amostra}}$$

Fez-se também a classificação das morfoespécies em grupos, de acordo com a coloração, para seleção de isolados predominantes para o teste de viabilidade.

4.4 Teste de viabilidade dos isolados

Para os testes de viabilidade foram utilizadas seis morfoespécies, sendo três originárias de plantas de café de manejo orgânico e três morfoespécies iguais, provenientes de manejo convencional. As análises foram feitas em colônias recém isoladas de forma a tentar evitar o efeito da manutenção em condições de laboratório sobre os fungos.

4.4.1 Crescimento radial da colônia

Um disco de 5mm de diâmetro do fungo mantido em meio Agar Malte 2% foi transferido para o centro das placas que foram mantidas à temperatura ambiente. Foram feitas 3 repetições.

A avaliação do crescimento radial da colônia foi realizada com régua milimétrica, medindo-se, a cada 24 horas, por um período de 15 dias, ou até o preenchimento total da placa, dois diâmetros perpendiculares previamente marcados na face externa do fundo da placa de Petri (BARBOSA et al., 2002).

4.4.2 Esporulação

A avaliação da produção de esporos foi realizada no 15º dia de incubação dos fungos utilizados para o teste de crescimento radial, descrito no item 4.4.1.

Fez-se a determinação do número de conídios/mL em cada placa. Para liberação dos conídios, foram utilizados 2 mL da mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p/v) e solução de Tween 80 (0,1% v/v) e uma espátula para raspar a superfície do meio. De cada placa, foram feitas três lâminas, e procedeu-se à leitura de 10 campos da Câmara de Neubauer, conforme metodologia adaptada de Cruz e colaboradores (2009).

4.4.3 Mecanismo de redução do derivado tetrazólio XTT

As seis colônias puras isoladas do cafeeiro e selecionadas foram submetidas à análise de atividade metabólica revelada pelo nível de metabolização do derivado tetrazolium XTT.

Os fungos foram cultivados em meio complexo Agar Nutriente por 10 dias a temperatura ambiente e em triplicata. Para liberação dos conídios e hifas, foram utilizados 2 mL de solução salina (NaCl a 0,89% p/v), adicionados sobre a colônia crescida, e uma espátula, para raspar a superfície do meio.

A suspensão de salina contendo as estruturas dos fungos foi então transferida para microtubos do tipo eppendorf estéreis, com o auxílio de uma ponteira com a ponta cortada, de forma a permitir a transferência das hifas. Após homogeneização, 200 µL dessa suspensão foram transferidos para outro microtuboestéril. Adicionou-se 200 µL da mistura XTT-Menadiona (XTT 1 mg/mL e Menadiona 0,4 mM)/PBS1x à suspensão nos microtubos e a mistura foi incubada, ao abrigo da luz, a 37°C por 2 horas.

Passado o tempo de incubação necessário para a redução do XTT os microtubos do tipo eppendorf foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos para promover a sedimentação celular. Transferiu-se então 200 µL do sobrenadante de cada microtubo para uma microplaca de 96 poços. A leitura da absorbância a 490 nm foi feita no leitor automático de placas, espectrofotômetro do tipo Anthos Zenyth 200 rt.

A análise dos resultados foi feita com base em porcentagem de atividade metabólica, ou seja, quanto maior a absorbância, maior a porcentagem de atividade metabólica. Atribuiu-se, portanto, o valor 1 ou 100 % para a amostra correspondente ao maior valor de absorbância, sendo esta a referência de atividade metabólica máxima. Todas as amostras restantes tiveram sua atividade metabólica calculada em relação à amostra de maior atividade.

4.5 Seleção de fungos com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas - Teste de descoloração em placa

As colônias puras isolados do cafeeiro foram cultivados em meio complexo AM 0,5% (0,5% de extrato de malte e 2% de ágar) por aproximadamente 5 dias e a 28°C. Após o

período de incubação, foi retirado um disco de meio complexo AM de 5 mm contendo o fungo já crescido, e este foi depositado sobre outra placa contendo meio complexo AM acrescido de 0,005% de corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). As placas foram incubadas por 14 dias a 28°C, e a degradação do corante foi observada através da descoloração visual do meio de cultura ao redor da colônia fúngica. Como controle, foram utilizadas placas com meio complexo AM acrescido de 0,005% de corante RBBR com o disco de AM sem o inóculo fúngico.

Com base nos resultados deste teste em placa foram selecionados os fungos para a realização do teste de descoloração em meio líquido.

4.6 Teste de descoloração do efluente sintético

Os fungos isolados do cafeeiro que demonstraram capacidade de descolorir o corante RBBR em placa foram inoculados em placas de Petri com meio complexo AM 0,5%. Após 5 dias de incubação a 28°C, quatro discos de 5 mm de diâmetro contendo as amostras fúngicas foram transferidos para 10 Erlenmeyers contendo o efluente sintético

Para os testes em meio líquido foram utilizados dois tratamentos: meio complexo Extrato de Malte 0,5%, acrescido de 100 mL de solução de RBBR (100mg/L) e meio complexo Extrato e Malte 0,5% acrescido de 100 mL de solução de RBBR (100mg/L) e 1,6g de raspas de madeira.

Como controle, foi utilizado o mesmo meio de cultura, com de 100 mL de solução do corante RBBR (100mg/L), com e sem o acréscimo de 1,6g de raspas de madeira, sem o inóculo fúngico. As raspas de madeira foram acrescentadas ao meio de cultivo como um indutor para a produção de enzimas do sistema ligninolítico

Os testes foram feitos com agitação (150 rpm), à 28 °C, em pH 5, ajustados com hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H₂SO₄). O período total do estudo foi de 40 dias. A cada dois dias, na primeira semana e a cada sete dias nas semanas seguintes, alíquotas de 5 mL foram filtradas em membrana 0,45 µm e a descoloração monitorada espectrofotometricamente pelo decréscimo do pico de absorbância no comprimento de onda de 560nm, determinado previamente por varredura em espectrofotômetro do tipo Anthos Zenyth 200 rt.

Os dados referentes à descoloração foram dados em absorbância relativa, e o controle sem inóculo, considerado como tendo a absorbância de 100%. Os valores das amostras foram calculados proporcionalmente ao valor do controle. Quando a absorbância das amostras foi inferior a obtida no controle, esta redução de absorbância foi denominada de atividade decolorante. Estes experimentos foram realizados em 5 repetições.

A porcentagem de descoloração foi calculada seguindo a equação:

$$\text{Descoloração (\%)} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde:

A_{controle} = absorbância do sobrenadante do meio sem inóculo

A_{cultura} = absorbância do sobrenadante do meio inoculado

4.7 Teste de descoloração de efluente têxtil

4.7.1 Coleta e processamento de efluente têxtil bruto

As amostras foram coletadas na tubulação de entrada, no tanque de tratamento, da estação de tratamento da Indústria têxtil localizada no sul de Minas Gerais.

Para recolher o efluente, foi utilizado um frasco de plástico de 5 litros com tampa. Em laboratório, o pH do efluente têxtil foi ajustado para 5, em seguida, 100mL do mesmo foi distribuído em Erlenmeyers de 250mL e estes foram esterilizados em autoclave. Após a esterilização, o fungo *A. niger* (CC.22) foi inoculado e fez-se o monitoramento e cálculo da descoloração, conforme descrito previamente, no item 3.6, porém o comprimento de onda utilizado para o efluente têxtil foi 310nm, previamente determinado por varredura em espectrofotômetro do tipo Anthos Zenyth 200 rt.

A alíquota do efluente bruto que não foi submetida ao tratamento biológico em laboratório foi mantida congelada à -18°C por no máximo 15 dias também segundo recomendações de Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)-NBR 13373 (2005).

4.7.2 UV– Análise espectral na região ultravioleta

Após o período de incubação para tratamento do efluente têxtil bruto com *A niger* (CC.22), uma alíquota do efluente tratado e outra do efluente controle (sem a presença do inóculo) foram submetidas a análise de varredura espectral de UV na faixa comprimento de onda (λ) de 200 a 600nm. Foi utilizado o espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 2550.

4.8 Avaliação da Atividade Enzimática

Para análise de atividade enzimática, foi utilizado o sobrenadante do meio inoculado, conforme descrito no item 3.6.

4.8.1 Manganês peroxidase

A atividade de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol. Para esta reação devem ser adicionados 0,5 mL do meio de cultura; 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M; 0,05 mL de MnSO_4 ; 0,2 mL de albumina bovina 0,5 %; 0,05 mL de H_2O_2 em tampão $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1 % que é o iniciador da reação. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 M, sendo feitas leituras de absorbância a 610 nm no início e no final da reação. Uma unidade enzimática (UE) correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para Vermelho de fenol oxidado ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (KUWAHARA et al., 1984).

4.8.2 Lacase

A atividade de Lacase foi determinada pela oxidação de ABTS. Utilizou-se 0,6 mL de sobrenadante; 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0) e 0,1 mL de ABTS, que é o iniciador da reação. A leitura em espectrofotômetro a 420 nm foi feita no início da reação e após 10 minutos. Uma unidade enzimática (UE) correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (BOURBONNAIS e PAICE, 1988).

4.8.3 Cálculo das atividades ligninolíticas

A atividade cinética de produção das enzimas foi calculada seguindo a equação descrita por Aguiar Filho (2008).

$$\text{UI/mL} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6$$

Onde:

ΔAbs = absorvância (Abs final – Abs inicial)

ϵ = coeficiente de absorção molar

R = quantidade de solução da amostra

t = tempo de reação em minutos

UI/L = Unidade Internacional

4.8.4 Descoloração enzimática do corante RBBR

Em adição aos testes descritos no item 2.4, nos mesmos dias, 1 mL do sobrenadante do meio inoculado foi adicionado a 5mL de uma solução teste contendo meio extrato de malte (0,5%) e o corante RBBR na concentração de 0,1mg/mL. A solução acrescida do sobrenadante foi incubada a 28°C, em agitação de 150rpm durante 150 minutos. A descoloração foi

monitorada pela mensuração da absorvância em espectrofotômetro a 560nm, após o período de incubação.

A atividade de descoloração enzimática foi calculada seguindo a equação:

$$\text{Descoloração enzimática (\%)} = [(A_0 - A_{150}) / A_0] \times 100$$

Onde:

A_0 = Absorvância inicial

A_{150} = Absorvância da solução teste após 150 minutos de incubação a 28°C.

4.9 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação das proteínas totais foi utilizado o método proposto por Bradford (1976).

Os fungos de interesse foram cultivados em meio líquido, e incubado nas condições descritas no item 3.6. Alíquotas foram filtradas para retirar o sobrenadante necessário.

O meio de reação é composto por 0,04mL do Reagente de Bradford, 0,150mL de água e 0,010mL do sobrenadante. Para o branco, adicionou-se 0,160mL de água junto ao Reagente de Bradford. Incubou-se por 15 minutos ao abrigo da luz e, em seguida, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 595 nm.

O teor de proteínas totais foi dado em mg/mL. A atividade enzimática foi relacionada ao teor de proteínas totais em função do tempo de incubação.

A proteína total foi calculada seguindo a seguinte equação, obtida de acordo com Bradford, para o reagente utilizado:

$$Y = 0,0094x + 0,0269$$

Onde:

Y = Absorvância

x = Proteínas

4.10 Determinação da Biomassa Micelial

Para obtenção de biomassa foi feito o cultivo em Erlenmeyers com meio complexo AM 2% acrescido de 50 mL de solução de corante RBBR na concentração de $0,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

A obtenção da biomassa seca foi obtida através do processo de filtração do meio de cultivo seguido de secagem, a cada 5 dias de incubação, por um período de 40 dias. Para filtração utilizou-se o filtro Watman nº1 previamente pesado e a secagem foi realizada em estufa elétrica com circulação forçada à 50°C até peso constante.

A massa micelial foi expressa pela seguinte equação:

$$\text{MM} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{\text{Pi}} \times 100,$$

Onde:

Pi = Peso seco do papel filtro (peso inicial)

Pf= Peso seco do papel filtro após filtragem (peso final)

MM = Massa micelial em porcentagem

4.11 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A determinação de DQO foi realizada com as amostras de efluente antes e após o seu tratamento com *A. niger* (C.22). Os resultados obtidos foram comparados como forma de avaliar a eficiência do tratamento.

Utilizou-se a metodologia baseada na determinação da DQO pela redução de Cr (VI) a Cr (III) na presença de H_2SO_4 , conforme definido por Ringbom (1939).

A reação ocorreu em tubos contendo a amostra de efluente, uma solução digestora composta por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (um forte agente oxidante), H_2SO_4 e HgSO_4 e uma solução ácida composta por H_2SO_4 e Ag_2SO_4 . Os tubos foram mantidos em um bloco digestor microprocessado Thermo Digest - 100.024.00.00 por 2 horas a 150°C . Após esse período e com as amostras já frias fez-se a leitura em espectrofotômetro para análise do Cr (III) formado, a 600nm. O cálculo de DQO foi feito por meio da equação que se segue, obtida a

através de uma curva padrão construída a partir de parâmetros experimentais definidos por Zuccari (1996):

$$Y = - 0,00354x + 2,$$

Onde:

y= absorvância

x= DQO

4.12 Avaliação da fitotoxicidade

Para a realização dos ensaios biológicos o recurso escolhido foram as sementes de alface (*Lactuca sativa*) para avaliar a possível interferência na germinação.

4.12.1 Testes de germinação de sementes de alface – *Lactuca sativa*

As amostras de efluente tratadas com o fungo *A.niger* (CC 22) foram submetidas a testes de toxicidade para avaliar a qualidade destes substratos após o tratamento biológico.

Os bioensaios com sementes de alface foram realizados de acordo com técnica descrita por Sobrero e Ronco (2004).

As amostras de efluente sofreram 5 diluições através da adição de água destilada, ficando as amostras para testes com as seguintes concentrações: 100%, 80%, 50%, 20% e 10% v/v.

Um disco de papel de filtro (Whatman nº 3, 9 cm de diâmetro) foi colocado em cada placa de Petri (10 cm de diâmetro) previamente marcada com a diluição correspondente. O papel foi então saturado com 4 mL da respectiva solução de diluição. Com a ajuda de uma pinça, vinte sementes de alface foram colocadas sobre o papel, com espaço suficiente entre elas para permitir o crescimento das raízes.

As placas foram tampadas e acondicionadas em sacos plásticos para evitar a perda de água e incubadas durante 5 dias (120 h) a uma temperatura de 22 ± 2 °C, no escuro. Para cada diluição foram feitas três repetições. Como controle utilizou-se água destilada no lugar das diluições, e as placas foram incubadas nas mesmas condições.

4.12.2 Avaliação da fitotoxicidade

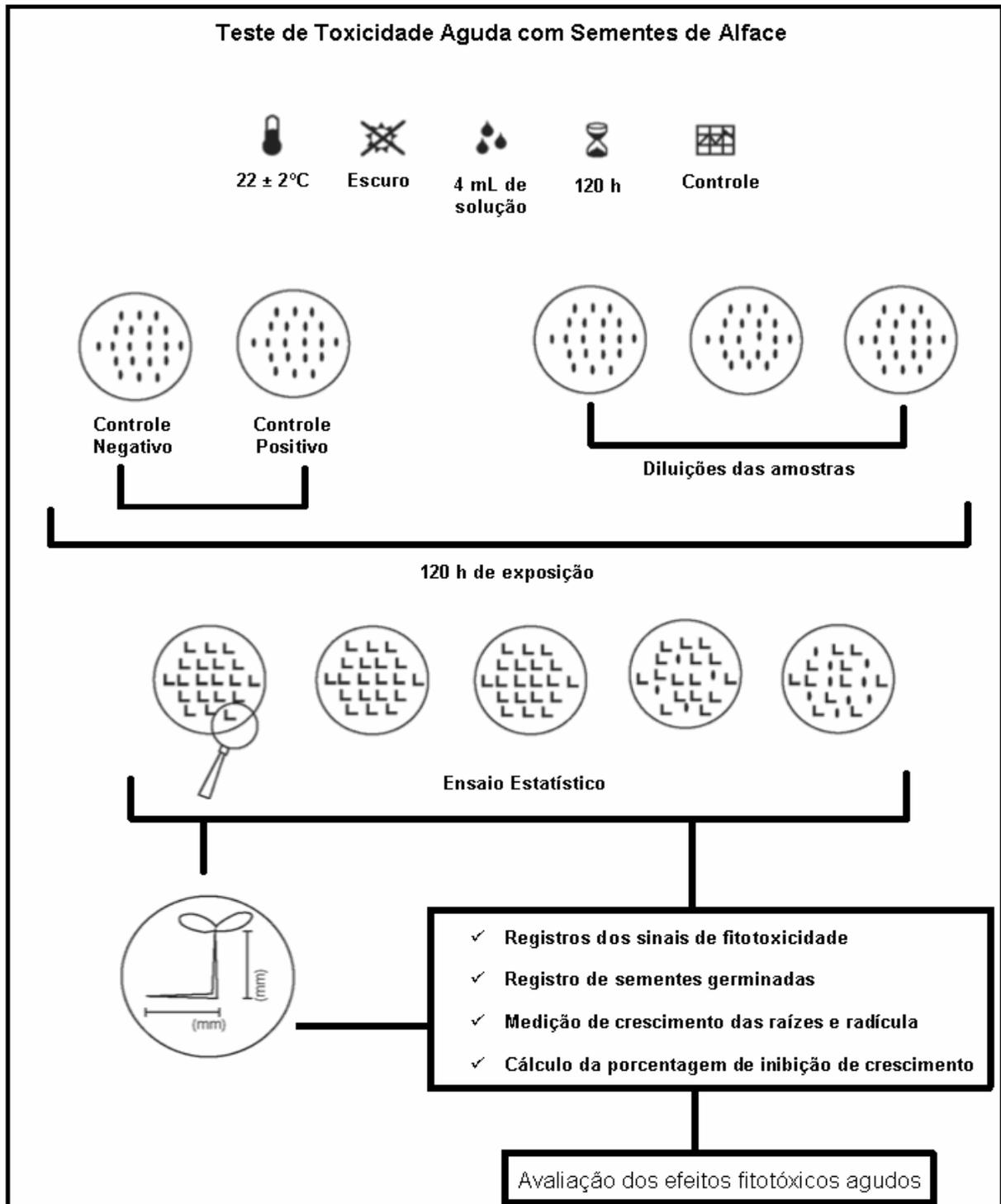


Figura 5 - Fluxograma da técnica de bioensaio para a avaliação da fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* (alface).

Fonte: SOBRERO e RONCO (2004).

Fez-se a comparação entre o efeito gerado nos organismos testes expostos às amostras e a resposta gerada nos organismos do controle negativo (expostos à água pura) sujeitos às mesmas condições do ensaio.

Terminado o período de incubação, o efeito na germinação e no crescimento das raízes e das radículas foi quantificado (Figura 5).

- a) Efeito na germinação: Registrou-se o número de sementes que germinaram normalmente, considerando como critério de germinação o aparecimento efetivo da raiz.
- b) Efeito no comprimento das raízes e das radículas: Fez-se a medida da raiz e da radícula de cada uma das plântulas, cuidadosamente, utilizando-se uma régua de acrílico. Para a medida do comprimento da raiz foi considerada a distância desde o nó (região mais grossa de transição entre a raiz e a radícula) até o ápice radicular. Para a medida do crescimento da radícula considerou-se desde o nó até o local de inserção dos cotilédones (SOBRERO e RONCO, 2004).

4.12.3 Expressão dos resultados

Com as medidas obtidas foram realizados os seguintes cálculos:

- a) Média e desvio padrão do crescimento das raízes e das radículas;
- b) Porcentagem de inibição do crescimento das raízes e das radículas, com a média de comprimento para cada diluição com relação à média de crescimento do controle negativo.

$$\% \text{ crescimento relativo da raiz} = \frac{\text{média comprimento da raiz na amostra (MCRA)}}{\text{média comprimento da raiz no controle (MCRC)}} \times 100$$

$$\% \text{ inibição crescimento relativo da raiz} = \frac{\text{MCRC} - \text{MCRA}}{\text{MCRC}} \times 100$$

$$\% \text{ crescimento relativo da radícula} = \frac{\text{média comprimento da radícula amostra (MCRaaA)}}{\text{média comprimento da radícula controle (MCRC)}} \times 100$$

$$\% \text{ inibição crescimento relativo da radícula} = \frac{\text{MCRaC} - \text{MCRaA}}{\text{MCRaC}} \times 100$$

c) Porcentagem de inibição da germinação, com a média dos valores de sementes que germinaram para cada diluição com relação à média de germinação do controle negativo.

$$\% \text{ germinação relativa} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sementes que germinaram na amostra}}{\text{n}^\circ \text{ de sementes que germinaram no controle}} \times 100$$

$$\% \text{ germinação absoluta} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sementes que germinaram}}{\text{n}^\circ \text{ de sementes totais}} \times 100$$

4.13 Análise dos dados

Os testes foram realizados em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Todos os dados serão testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e submetidos à Análise de Variância (ANOVA).

As médias das variáveis analisadas foram comparadas pelo modelo de regressão polinomial quadrática, aceitando coeficiente de determinação (R^2) maior que 50% e as médias que apresentaram R^2 baixo foram comparadas pelo teste de Scott-knott para $p < 0,05$. Análises de correlação foram utilizadas para determinar a relação entre as variáveis analisadas.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico SISVAR 5.3 de 2010.

5 RESULTADOS

5.1 Colonização e biodiversidade

Após o processamento das folhas de *Coffea arabica* L. e isolamento dos fungos (Figura 3), foram obtidos 1.855 isolados, sendo 1.185 provenientes do sistema orgânico e 670 do sistema convencional (Tabela 1). A taxa de colonização total diferiu e apresentou-se maior ($p < 0,0001$) no sistema orgânico, sendo de 0,78 e no sistema convencional, de 0,64 (Tabela 1).

A taxa de isolamento também foi maior ($p < 0,0001$) no sistema orgânico com 1,291, contra e 0,749 para o sistema convencional.

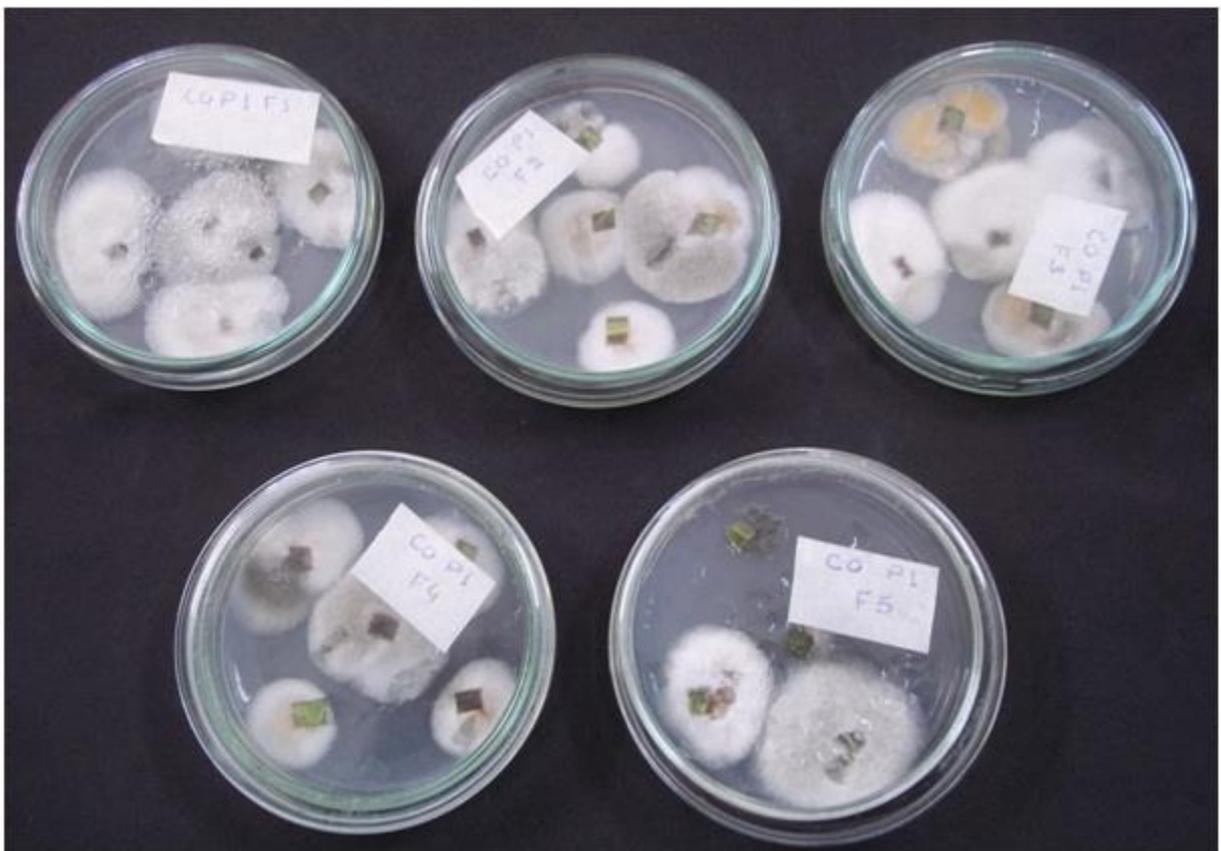


Figura 6 - Placas com Agar Malte contendo fragmentos de folhas de *Coffea arabica* cultivados em manejo orgânico, para isolamento, com fungos já crescidos, após 4 dias de incubação.

Fonte: O autor.

De acordo com as características morfológicas, foram identificadas 39 morfoespécies no sistema orgânico e 27 no sistema convencional (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxa de colonização e número de fragmentos de folhas e hastes de plantas de cafeeiro *Coffea arabica* L. colonizados por fungos endofíticos nos sistemas de cultivo orgânico e convencional.

	Sistema de produção	
	Orgânico	Convencional
Nº total de fragmentos de folha	895	895
Nº fragmentos \geq 1 isolado	886	575
% de colonização	78%	64%
Nº fragmentos com 1 isolado	303	249
Nº fragmentos com 2 isolados	244	140
Nº fragmentos com $>$ 2 isolados	99	39
Nº de morfoespécies isoladas	39	27
Nº total de colônias	1185	670

O número total de isolados por lavoura diferiu estatisticamente ($p < 0,001$), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Médias do número de isolados por lavoura em cada manejo estudado.

Manejo	Isolados
Orgânico	31,56 a
Convencional	17,05 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na coluna, pelo teste de Scott- Knot, com nível de significância de 5%.

Quadro 2- Classificação das morfoespécies fúngicas de acordo com a cor das colônias e a porcentagem de ocorrência em cada manejo.

		Classes				
		Verde	Cinza	Branco	Amarelo	Preto
	Código	1	2	3	4	5
Manejo Orgânico	%	15	21,18	22,18	-	-
Manejo Convencional	%	9,56	10	13	4,54	4,54

As morfoespécies foram classificadas ainda de acordo com a coloração para facilitar a análise de predominância e selecionar os isolados para o teste de viabilidade, descrito a seguir no item 5.2. (Quadro 2).

5.2 Teste de viabilidade dos isolados

Houve efeito significativo da interação entre o microrganismo analisado e o tipo de manejo do qual foi isolado sobre o número de esporos produzidos, o crescimento da colônia e a viabilidade pelo teste de XTT.

5.2.1 Crescimento radial da colônia

Em relação ao diâmetro da colônia, observou-se que este foi maior nos isolados de originários de plantas de café de manejo convencional, exceto para o fungo 3, no qual o diâmetro apresentou-se igual entre os manejos, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3- Média do diâmetro de morfoespécies fúngicas isoladas de plantas de *Coffea arabica* L. de manejo convencional e orgânico, após 5 dias de cultivo em Agar Malte.

Fungo	Diâmetro da colônia (mm)	
	Orgânico	Convencional
1	59,33 b A	66,00 a A
2	51,33 b A	59,67 a A
3	48,00 a A	46,67 a B

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos; médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott 5%).

O comportamento do crescimento das colônias, em todos os fungos analisados ajustou-se ao modelo de regressão polinomial quadrático, com R^2 acima de 0,9, ou seja, o modelo escolhido explica 90% do padrão de crescimento das colônias.

O crescimento foi constante e mais acelerado até aproximadamente 10 dias de incubação. A partir do décimo dia houve uma redução no crescimento em CO.1 e CC.1; CO.2 e CC.2 permaneceram com crescimento um pouco mais acentuado, enquanto CO.3 e CC.3 já haviam atingido o diâmetro total da placa (Figura 7).

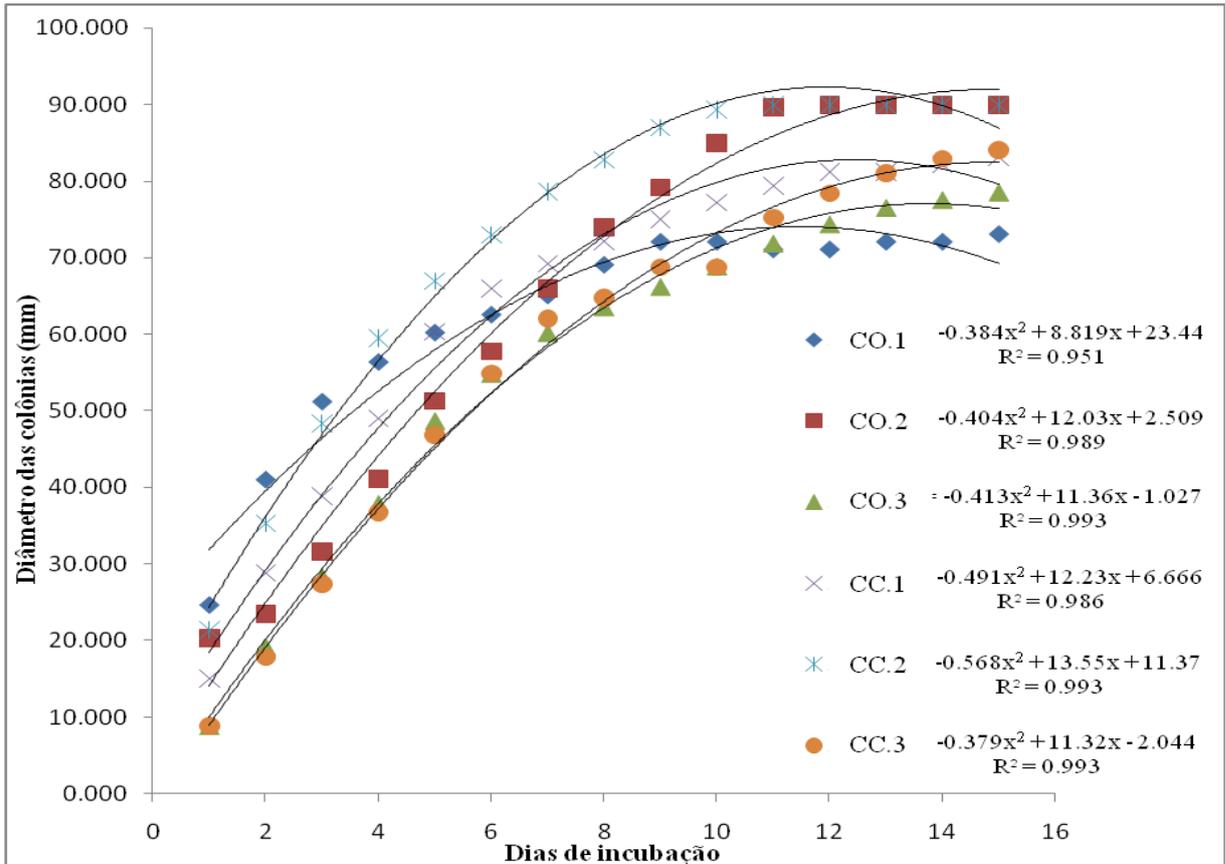


Figura 7- Modelo de regressão polinomial quadrática que relaciona o crescimento radial dos fungos CO.1, CO.2 e CO.3, isolados de *Coffea arabica* de manejo orgânico e dos fungos CC.1, CC.2 e CC.3, isolados de *Coffea arabica* de manejo convencional, com o tempo de incubação, em dias.

Fonte: O autor.

5.2.2 Esporulação

O número de esporos produzidos foi maior estatisticamente ($p < 0,001$) nas morfoespécies 1 e 2 isoladas de manejo convencional (Tabela 4).

Tabela 4- Número médio de esporos produzidos por morfoespécies fúngicas isoladas de plantas de *Coffea arabica* L. de manejo convencional e orgânico.

Fungo	Número de esporos	
	Orgânico	Convencional
1	173,00 b A	162,33 a A
2	21,00 b B	9,00 a B
3	3,33 a B	3,67 a B

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos; médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott 5%).

5.2.3 Mecanismo de redução do derivado tetrazólio XTT

A absorvância no teste de XTT, para avaliação da viabilidade foi maior nos fungos isolados do manejo orgânico, exceto para o fungo 3, em que as absorvâncias foram iguais entre os manejos.

Tabela 5- Viabilidade média de morfoespécies fúngicas isoladas de plantas de *Coffea arabica* L. de manejo convencional e orgânico, em valores de absorvância, após 10 dias de cultivo em Agar Malte.

Fungo	Viabilidade (absorvância)	
	Orgânico	Convencional
1	0,0477 (30,86%) a B	0,0393 (21,61%) b A
2	0,1523 (100%) a A	0,0680 (44,65%) b A
3	0,0370 (24,29%) a B	0,0373 (24,29%) a B

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos; médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott 5%).

Em porcentagem, o fungo CO. 2 (isolado do manejo orgânico) apresentou maior absorvância e foi lhe foi atribuído o valor de 100% de atividade. Em comparação com este valor, foram atribuídas porcentagens de atividade aos demais fungos (Tabela 5).

5.3 Seleção de fungos com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas - Teste de descoloração em placa

Após 14 dias de incubação, as placas foram analisadas para o rastreio primário da capacidade de degradar o corante RBBR presente no meio.

Todos os fungos testados cresceram na presença de corante. Não foi possível observar a formação de um halo de descoloração ao redor das colônias, no entanto sete fungos apresentaram capacidade de descoloração de RBBR na região onde suas hifas cresceram e estes foram selecionados para análises posteriores. Sendo CO. 5 (Figura 8.1), CO. 9 (Figura 8.2), CO. 10 (*Colletotrichum* sp.) (Figura 8.3) e CO.11a (Figura 8.4) provenientes do manejo orgânico e CC. 18 (Figura 8.5), CC. 22 (*Aspergillus niger*) (Figura 8.6) e CC. 24 (Figura

8.7), provenientes do manejo convencional. A Figura 8.8 refere-se ao meio Agar Malte acrescido de corante RBBR sem o inóculo fúngico, como controle do experimento.

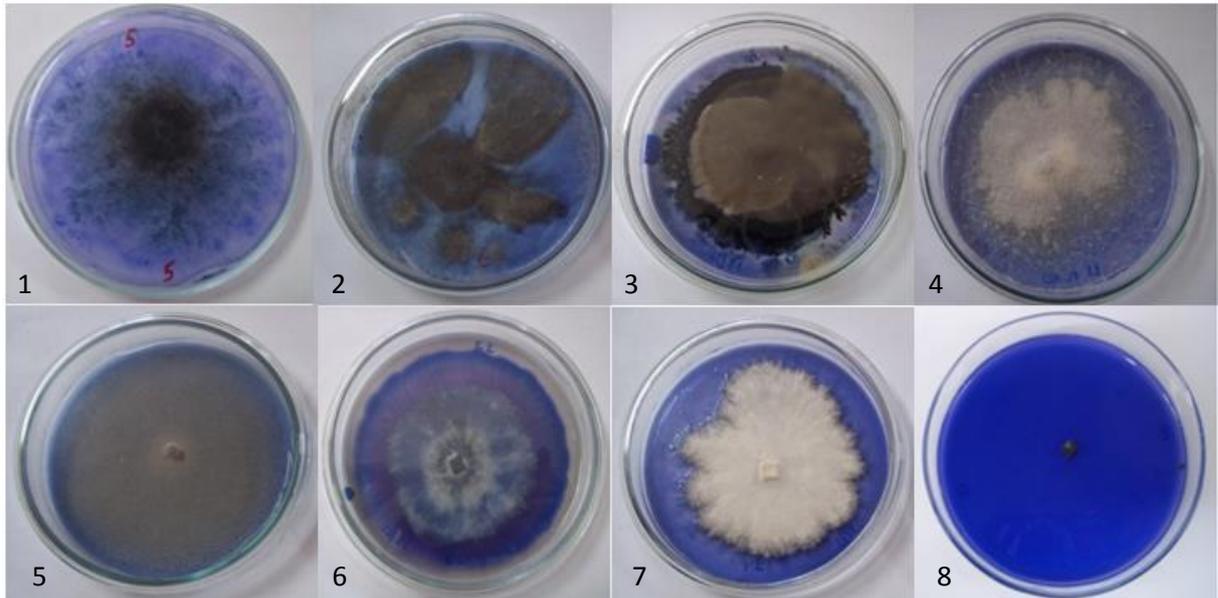


Figura 8 - Descoloração do corante Brillhante Azul de Remazol em meio Agar Malte após 14 dias de incubação à temperatura 28°C. 1= CO.5, 2= CO.9, 3= CO.10 e 4= CO.11a isolados de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico; 5= CC.18, 6= *Aspergillus niger* CC.22 e 7= CC.24 isolados de *Coffea arabica* L. de manejo convencional e 8= controle sem inóculo.

Fonte: O autor.

5.4 Testes de descoloração em meio líquido

Para o fungo *L. edodes* (INCQS 40220) o efeito da interação entre os dias de incubação e o tratamento foi significativo ($p < 0,001$). Na presença de madeira, este fungo apresentou capacidade de descolorir o meio Extrato de Malte acrescido de corante RBBR em 17,76% com 5 dias de experimento, no entanto esta atividade diminuiu para 2,82% e cessou após 10 dias. Já na ausência de madeira, a descoloração do meio por *L. edodes* (INCQS 40220) só ocorreu no 15º dia de incubação, com 13,7% de remoção da cor e não foi mais observada durante todo o período de experimento (Figura 9).

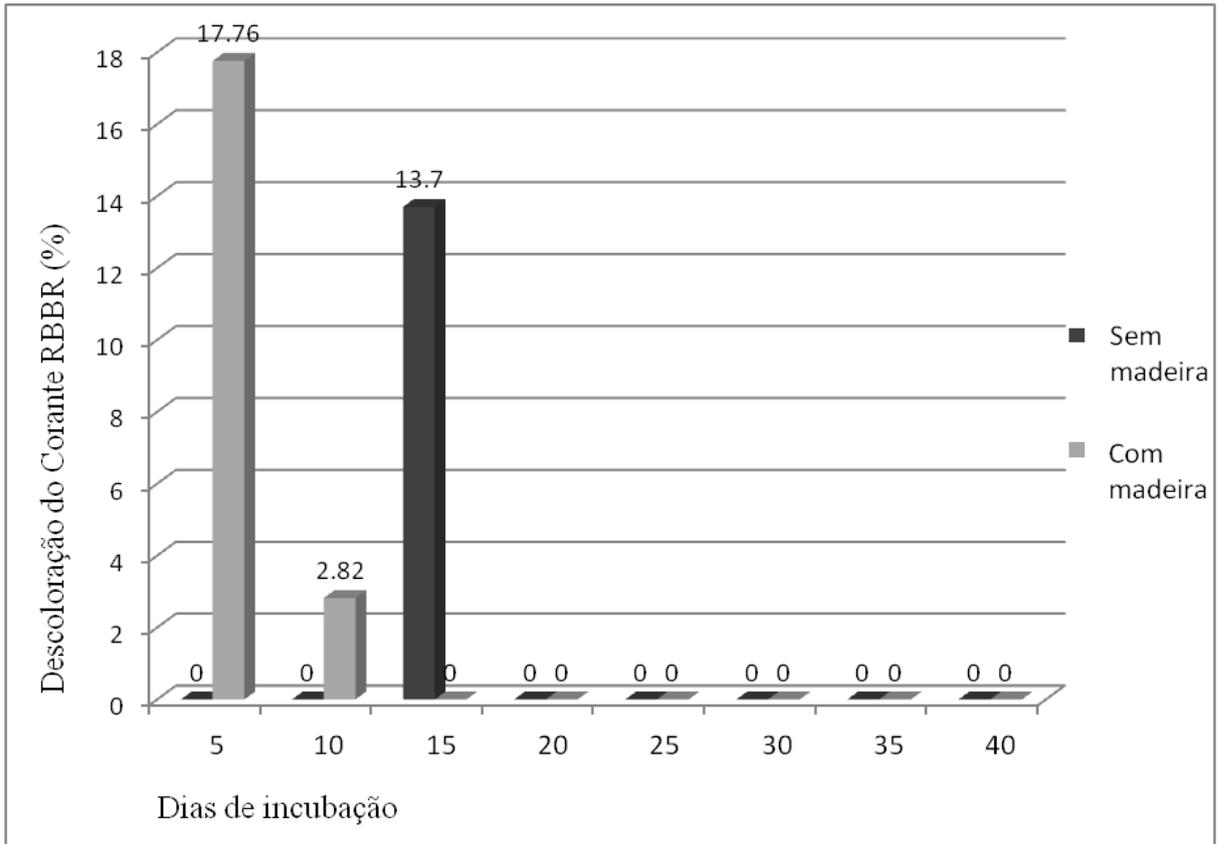


Figura 9- Descoloração do corante Brillhante Azul de Remazol pelo fungo ligninolítico padrão *Lentinula edodes* (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Após as mensurações, verificou-se que CO.11a apresentou descoloração de 15,83% da solução de RBBR, com 48 horas de incubação, na presença de madeira. Já na ausência de madeira a descoloração do meio foi de 11,02% com 24 horas de experimento.

Para o fungo CO. 5 o padrão da atividade de descoloração foi bastante semelhante na presença e ausência de madeira, com início logo no primeiro dia de incubação, permanecendo até o 11º dia, a partir do qual não foi mais observada. Além disso, a descoloração promovida por CO.5 foi maior no 4º dia de incubação em ambos os tratamentos com pico de 59,74% na presença de madeira e 51,12% na ausência de madeira (Figura 10).

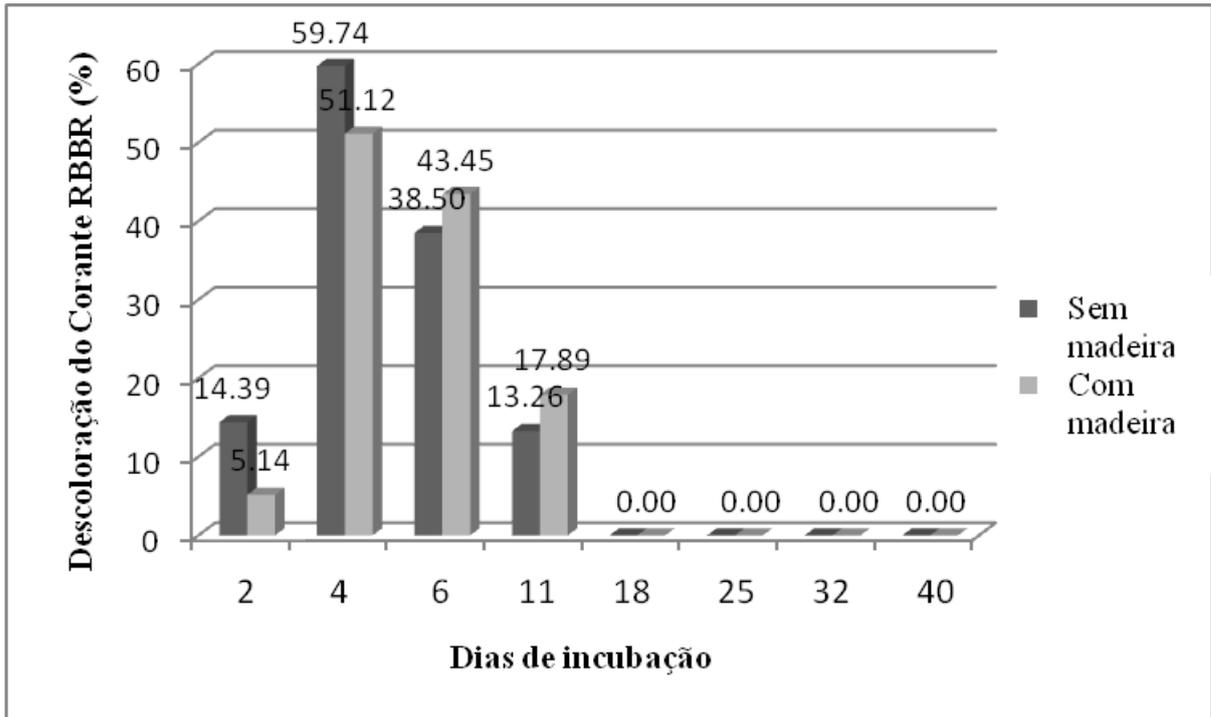


Figura 10- Descoloração do corante Brillante Azul de Remazol pelo fungo endofítico identificado com CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

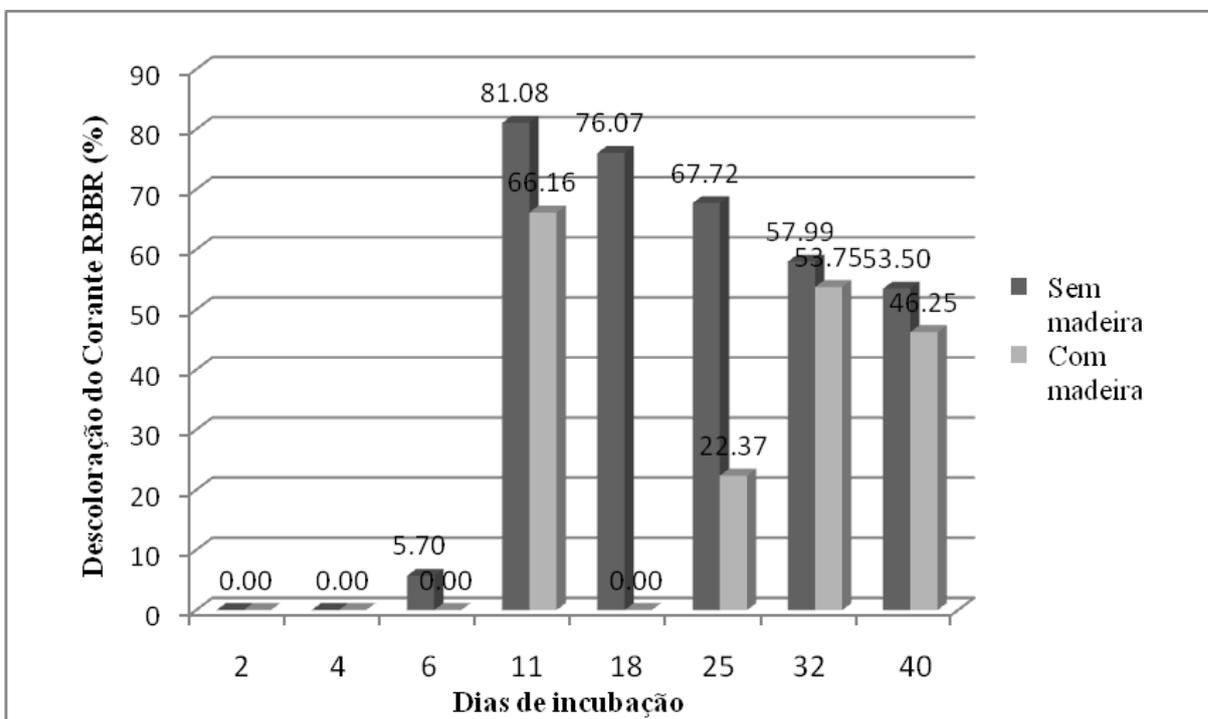


Figura 11- Descoloração do corante Brillante Azul de Remazol pelo fungo endofítico identificado com CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Houve efeito significativo da interação entre os dias e o tratamento sobre a descoloração da solução de RBBR promovida pelo fungo CO. 10. Esta foi maior no meio sem adição de madeira.

Como o observado na Figura 11, Para CO. 10 na ausência de madeira, a descoloração pode ser verificada a partir do sexto dia de experimento e permaneceu até o final, com pico de 81,08% no 11º dia. Já no meio com acréscimo de madeira a descoloração teve início no 11º de experimento, quando teve seu pico com 66,16%.

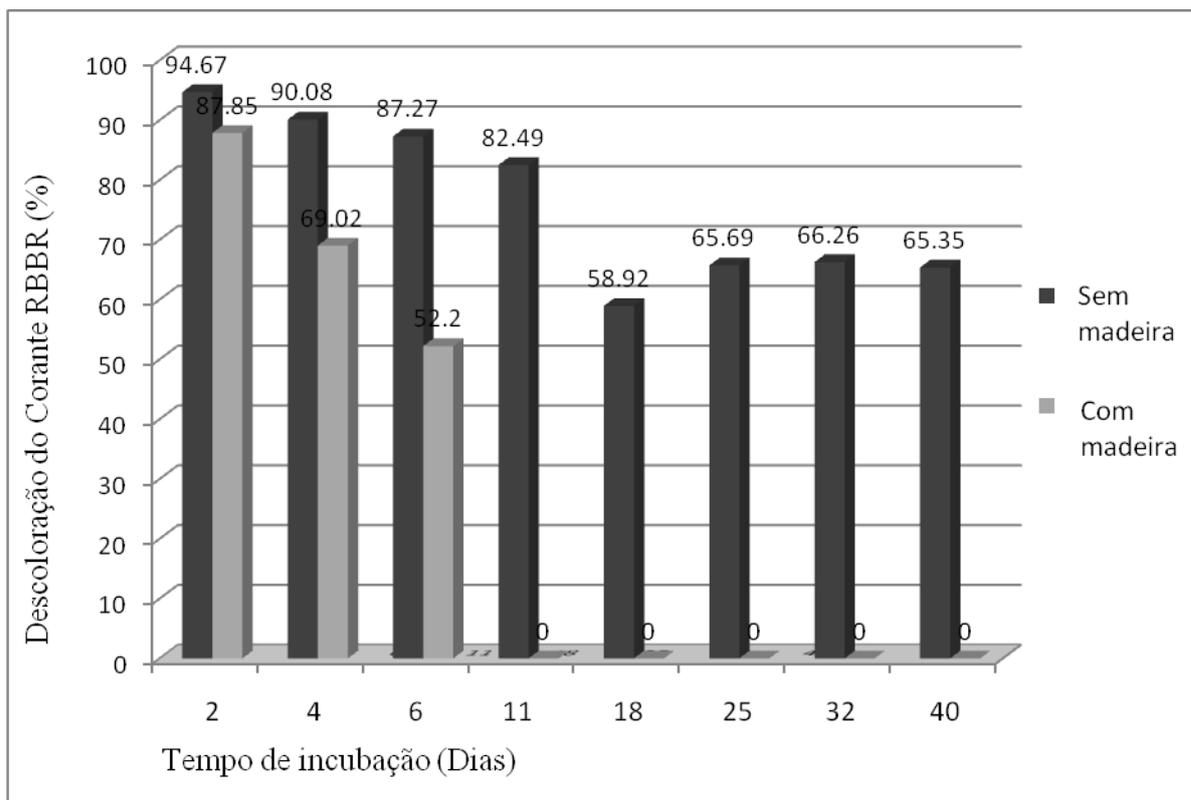


Figura 12 - Descoloração do corante Brillante Azul de Remazol pelo fungo endofítico *Aspergillus niger*, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

O fungo *A. niger* (CC. 22), foi capaz de remover, na ausência de madeira, até 94,67% da cor da solução de RBBR, em 48 horas (Figura 13), permanecendo com valores elevados de descoloração, durante todo o período de incubação, com o mínimo de 58,92% aos 18 dias de realização do experimento, conforme pode ser observado na Figura 12.

Ainda de acordo com o Figura 12, pode-se observar que o valor máximo de descoloração atingido por *A. niger* (CC.22), na presença de madeira, ocorreu em 48 horas, e

foi de 87,85%. No entanto, a partir desta primeira leitura houve decréscimo na descoloração, que já não pode ser verificada aos 11 dias de incubação.

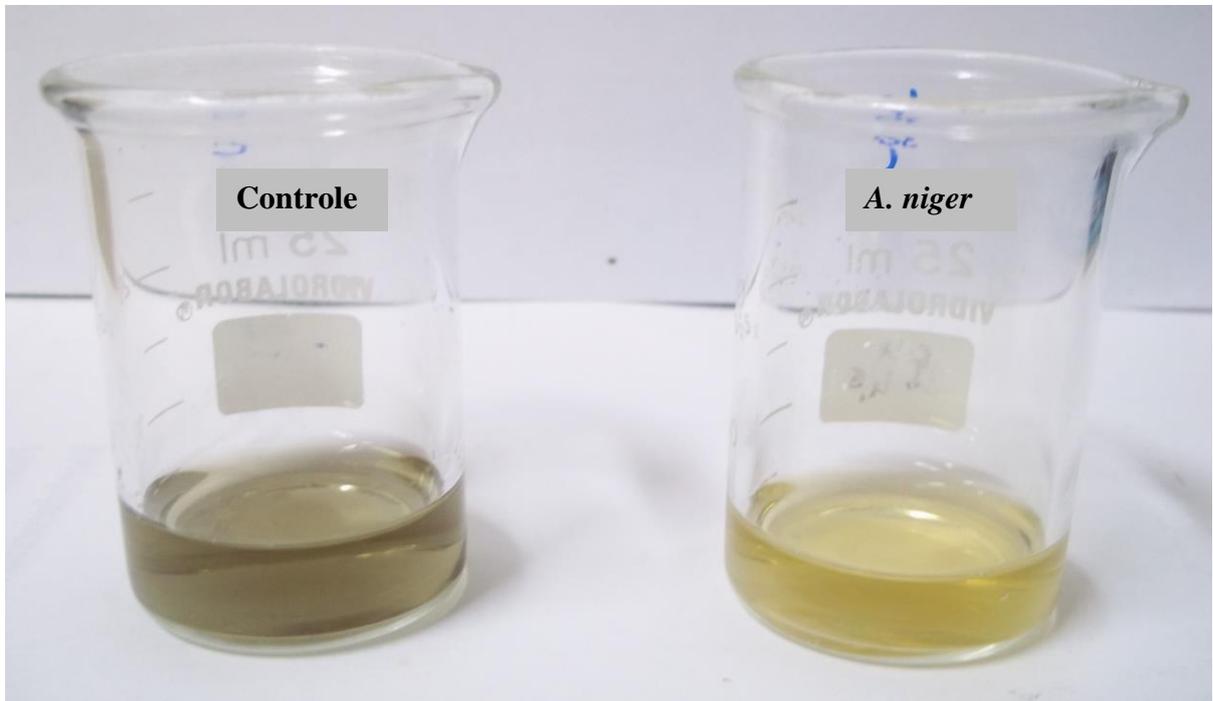


Figura 13 - Descoloração do corante RBBR por *Aspergillus niger* (CC.22), sem adição de raspas de madeira ao meio, com 48 horas de incubação.

Fonte: O autor.

Quando *A. niger* (CC.22) foi inoculado e cultivado diretamente em efluente textil a descoloração promovida foi de 72,22% com 48 horas, no entanto nos demais dias de experimento a remoção da cor não foi mais observada.

5.5 UV– Análise espectral na região ultravioleta

Como pode ser observado na Figura 14, na região ultravioleta, a amostra tratada e o controle apresentaram o mesmo padrão de absorbância, no entanto, a amostra tratada apresentou valores de absorbância mais baixos que o efluente não tratado após o período de incubação do fungo *A. niger* (CC.22).

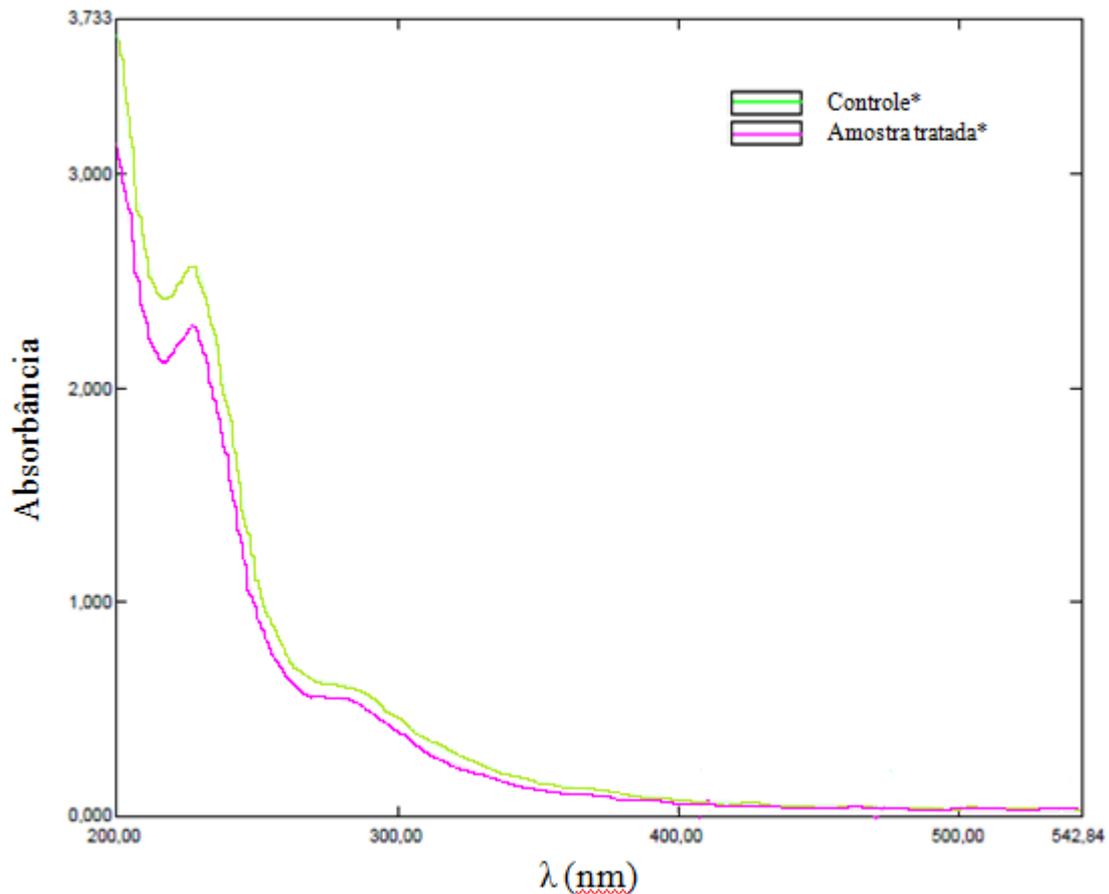


Figura 14- Varredura da absorvância do efluente têxtil na região ultravioleta após 40 dias de tratamento com o fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22) em comparação ao controle não tratado. * Valores de absorvância das amostras diluídas em água destilada para a leitura (1:5).

Fonte: O autor.

5.6 Avaliação da atividade enzimática

A atividade de Lacase sofreu efeito significativo da interação entre os dias de incubação e adição de madeira em *L. edodes* (INCQS 40220). Esta enzima não foi observada quando o fungo padrão *L. edodes* (INCQS 40220) foi cultivado em meio AM 0,5% com corante RBBR, sem a adição de raspas de madeira (Figura 15).

Na presença de madeira, a produção da Lac manteve-se durante todo o período de experimento, variando do máximo de 338,25 UI/L, com 15 dias de incubação, ao mínimo de 66,94 UI/L aos 40 dias de incubação. Para este caso, foi ajustado o modelo de regressão polinomial quadrática, com $R^2=0,525$ (Figura 15).

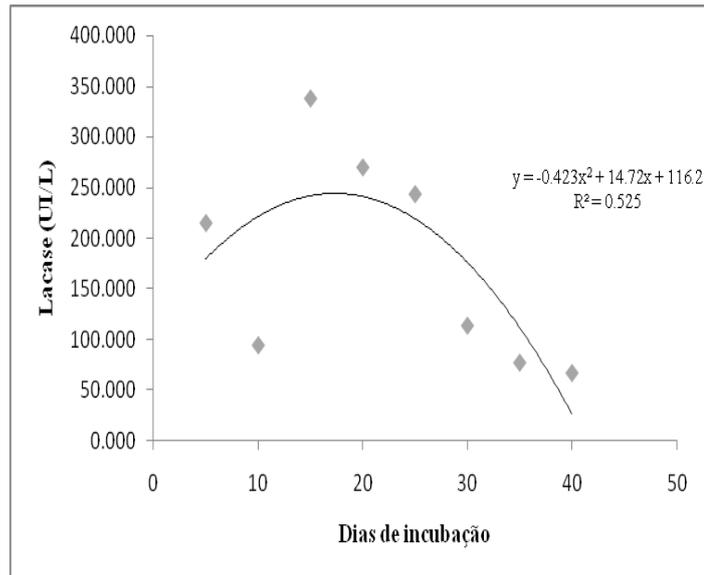


Figura 15 - Modelo de regressão polinomial quadrática que relaciona a atividade de Lacase produzida pelo fungo ligninolítico padrão *Lentinula edodes* (INCQS 40220), com a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Já para a enzima MnP *L. edodes* apresentou comportamento oposto, como pode ser observado na Figura 16. Na presença de madeira sua atividade foi detectada apenas aos 5 dias de incubação, com 2.250,44UI/L, tendo sido a maior produção desta enzima por *L.edodes*, quando comparamos os dois tratamentos. Enquanto a atividade da mesma enzima, no meio sem acréscimo de madeira pode ser detectada logo no primeiro dia de mensuração e permaneceu até o 25º dia de experimento, tendo seu pico com 15 dias, de 1.469,66 UI/L. O efeito da interação entre o período de incubação e a adição ou não de madeira foi significativo ($p < 0,001$) também para MnP.

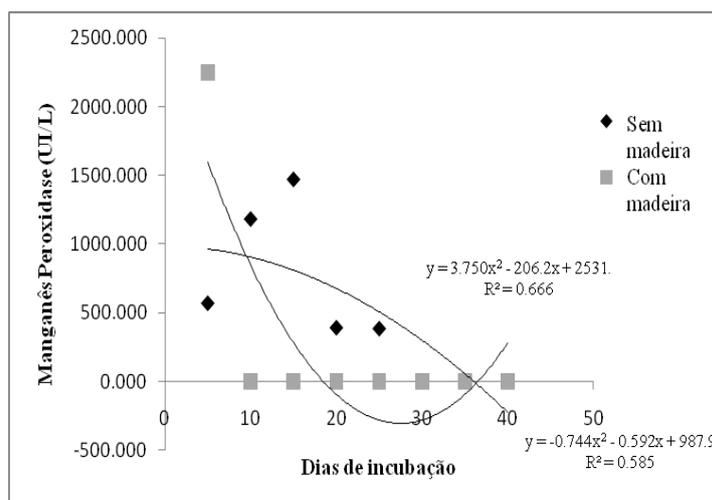


Figura 16 - Modelo de regressão polinomial quadrática que relaciona a atividade de Manganês Peroxidase do fungo ligninolítico padrão *Lentinula edodes* (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Não foi detectada a atividade da enzima MnP em CO. 11a.

A atividade da enzima Lac, produzida pelo fungo CO.11a começou a ser detectada aos 4 dias de incubação e os picos de atividade, com 146,29 UI/L e 186,11 UI/L deram-se aos 6 e 40 dias de incubação respectivamente, na ausência de madeira. Quando cultivado com madeira, o máximo de produção da Lac por CO. 11a foi de 259,29 UI/L aos 25 dias de execução do experimento e o início da atividade pode ser verificado aos 6 dias (Figura 17).

Quando comparamos os dois tratamentos, verificou-se que, na presença de madeira, a produção de Lac por CO.11a foi maior em quase todos os dias de incubação, exceto no 6º, 32º e 40º dia quando a atividade desta enzima foi maior no meio sem acréscimo e madeira (Figura 17).

Já entre os tratamento, o comportamento da atividade de Lac foi diferente. Na ausência de madeira houve uma correlação positiva, com maior atividade encontrada no último dia e na ausência de madeira a correlação foi negativa, tendo aumentado entre 10 e 25 dias e voltando a diminuir antes do final do experimento (Tabela 6).

Tabela 6. Médias da atividade de Lacase do fungo endofítico CO. 11a, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Lacase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	28,71 a	0,00 b
4	34,26 a	34,26 a
6	111,11 b	146,29 a
11	184,26 a	97,22 b
18	196,29 a	87,04 b
25	259,26 a	107,41 b
32	139,82 a	138,32 a
40	164,81 b	186,11 a

*Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos (Scott-Knott 5%).

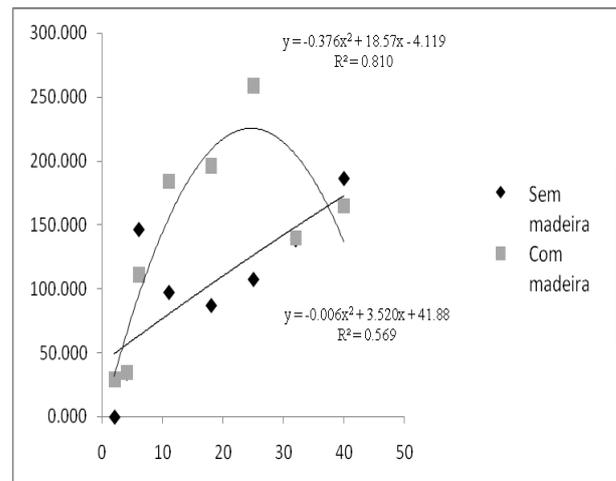


Figura 17 - Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 11a, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Para a atividade da Lac produzida pelo fungo CO.5 a interação entre os dias de experimento e a presença ou ausência de madeira tiveram efeito significativo. Tal enzima

apresentou maior atividade na ausência de madeira, exceto no 18º dia de experimento (Tabela 7). Em ambos os tratamentos a Lac foi detectada durante todo o período de experimento.

Na ausência de madeira, a maior atividade de Lac produzida por CO.5 foi de 15.824,08 UI/L detectada com 25 de incubação (Figura 18). No meio acrescido de madeira, a atividade de lacase teve seu pico de 4.723,15 UI/L com 32 dias de incubação, no entanto, permaneceu relativamente constante desde o 18º dia de leitura (Figura 18).

Tabela 7- Médias da atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Lacase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	137,95 a	107,41 a
4	102,78 a	262,95 a
6	96,30 a	322,22 a
11	912,96 b	5.803,70 a
18	4.137,04 a	2.906,48 b
25	4.410,19 b	15.824,08 a
32	4.723,15 a	4.687,04 a
40	2.713,89 b	6.571,29 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos (Scott-Knott 5%).

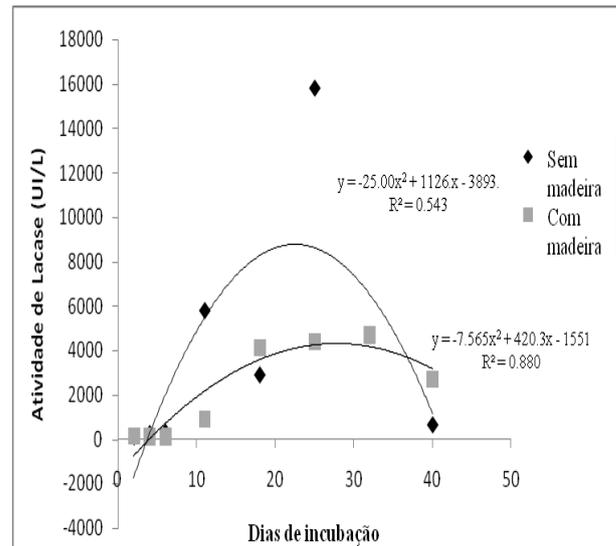


Figura 18 - Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

A interação entre os dias e o tratamento também teve efeito significativo sobre a atividade de MnP produzida por CO.5. A atividade desta enzima foi maior estatisticamente na ausência de madeira, exceto no 11º dia de experimento, quando houve uma queda na atividade de MnP nesta condição.

Na presença de madeira CO.5 produziu MnP apenas entre o 4º e o 11º dias de incubação, sendo o seu pico de 1.974,55 UI/L verificado com 6 dias, embora este valor não tenha diferido dos encontrados nos demais dias para este tratamento (Tabela 8).

Na ausência de madeira a atividade da enzima MnP foi detectada durante todo o experimento, exceto no 18º, para CO. 5. O pico de atividade desta enzima deu-se no 6º dia e foi de 2.009,09 UI/L, no entanto este diferiu apenas do 11º, 18º e 40º dias, quando a atividade de MnP foi menor (Tabela 8).

Tabela 8- Médias da atividade de Manganês Peroxidase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de rasas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação e do tratamento utilizado.

Dias	Manganês Peroxidase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,00 b A	1.540,00 a A
4	1.541,82 b A	1.763,64 a A
6	1.974,55 a A	2.009,09 a A
11	1.267,27 a A	454,55 b B
18	0,00 a B	0,00 a B
25	0,00 b B	1.147,30 a A
32	0,00 b B	1.340,00 a A
40	0,00 b B	727,27 a B

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos; médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott 5%).

Tabela 9- Médias da atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de rasas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação e do tratamento utilizado.

Dias	Lacase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,00 a G	0,00 a C
4	948,97 a F	254,52 b C
6	30.166,67 a C	587,98 b C
11	0,00 b G	5.525,00 a A
18	58.170,37 a A	3.895,37 b B
25	34.321,29 a B	725,92 b C
32	9.698,15 a D	262,96 b C
40	5.264,98 a E	158,34 b C

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos; médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott 5%).

Houve efeito significativo da interação entre os dias de incubação e o tratamento sobre a atividade da enzima Lac produzida por CO.10. Foi possível verificar a presença desta enzima a partir do 4º dia de incubação e maiores atividades foram observadas na presença da madeira, exceto no 11º dia de incubação (Tabela 9).

O pico de produção de Lac por CO.10 no meio acrescido de madeira foi de 58.170,37 UI/L com 10 dias de incubação. Na ausência de madeira o pico deu-se aos 11 dias de andamento do experimento, com 5.525 UI/L (Tabela 9).

Para a atividade de MnP produzida por CO.10 não houve efeito significativo da interação entre os dias de incubação e o tratamento. Na presença de madeira a atividade desta enzima foi aproximadamente três vezes maior (Tabela 10).

Tabela 10- Médias da atividade de Manganês Peroxidase produzida pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte.

Tratamento	Manganês Peroxidase (UI/L)
Com madeira	1.576,67 a
Sem madeira	596,17 b

*Medias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas colunas, pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

Analisando o efeito dos dias sobre a atividade de MnP produzida por CO.10, verifica-se que a na presença de madeira a atividade desta enzima foi detectada a partir do 6º dia de incubação e seu pico de 1.623,63 UI/L deu-se no 32º dia. Já no meio sem acréscimo de madeira o pico de atividade de MnP foi 3.727,27 UI/L verificado no último dia de experimento e teve início no 4º dia (Tabela 11).

Tabela 11- Médias da atividade de Manganês Peroxidase produzida pelo fungo endofítico CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Manganês Peroxidase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,00 f	0,00 f
4	0,00 f	910,96 e
6	683,64 c	1.191,97 e
11	374,55 e	1.304,84 d
18	0,00 f	1.363,78 d
25	500,00 d	1.560,00 c
32	1.623,63 a	2.554,55 b
40	1.587,56 b	3.727,27 a

*Medias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas colunas, pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

Para *A. niger* (CC. 22) foi possível mensurar a atividade das enzimas MnP e Lac. O pico de atividade/produção da MnP, quando *A. niger* (CC.22) foi cultivado sem madeira, foi 2.183,64 UI/L aos 18 dias de incubação. No entanto nos demais dias de leitura, a atividade permaneceu aproximadamente constante, apenas com uma queda no 25º dia. Já quando o fungo foi cultivado em meio acrescido de madeira, o pico de atividade de MnP foi de 1.570,91 UI/L e deu-se com 4 dias de incubação, a partir do qual houve um decréscimo na atividade, que não foi mais detectada após 6 dias de experimento (Tabela 12).

A atividade, em ambos os tratamentos, pode ser detectada logo no primeiro dia de leitura, com 48 horas, no entanto, a atividade máxima e, provavelmente, maior produção de MnP foram observadas por *A. niger* (CC.22) quando cultivado em meio sem acréscimo de madeira (Figura 19).

Tabela 12- Médias da atividade de Manganês Peroxidase em *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de rasas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.

Dias	Manganês Peroxidase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	1.440,00 a	1.618,18 a
4	1.570,91 a	1.727,27 a
6	574,55 b	1.803,67 a
11	0,00 b	1.754,59 a
18	0,00 b	2.183,64 a
25	0,00 b	1.854,55 a
32	0,00 b	1.872,73 a
40	0,00 b	1.856,42 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas (Scott-Knott 5%).

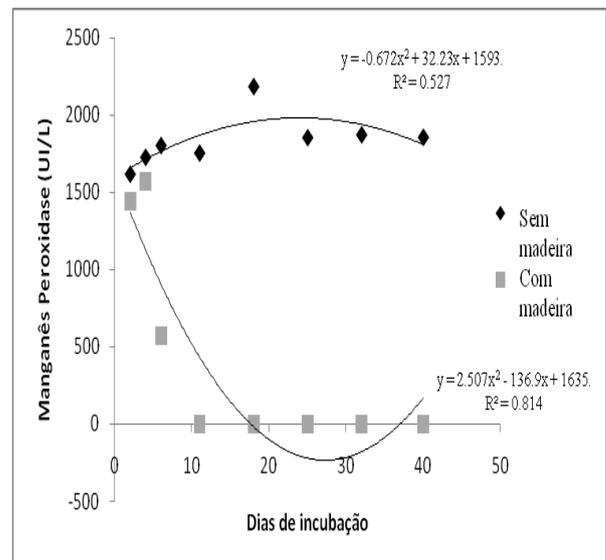


Figura 19 – Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Manganês Peroxidase em *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de rasas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

A atividade da Lac produzida por *A. niger* (CC.22) em meio sem acréscimo de madeira, pode ser detectada a partir do primeiro dia de incubação e o pico de atividade, nessas condições, foi de 739,81 UI/L aos 18 dias, permanecendo estável com 25 e 32 dias, e atividades de 722,69 UI/L, 705,55 UI/L, respectivamente (Tabela 13). Na presença de madeira, a atividade/produção máxima de Lac foi de 1.537,96 UI/L aos 40 dias e a partir de 6 dias de incubação já foi possível verificar sua atividade (Tabela 13). Apesar de a produção de

lacase ter sido verificada logo no início do experimento, tanto na presença quanto na ausência de madeira, esta enzima apresentou comportamentos opostos nos diferentes tratamentos, como pode ser observado na Figura 20.

Tabela 13- Médias da atividade de Lacase em *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.

Dias	Lacase (UI/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,00 b	39,62 a
4	372,22 a	31,49 b
6	232,41 a	122,22 b
11	525,63 a	169,47 b
18	249,99 b	739,82 a
25	107,87 b	722,69 a
32	115,74 b	705,56 a
40	1.537,96 a	377,78 b

*Medias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas (Scott-Knott 5%).

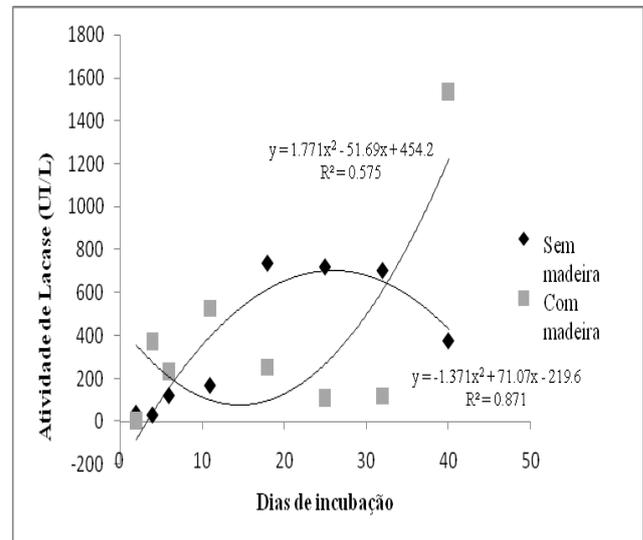


Figura 20 - Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta a atividade de Lacase produzida pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Tabela 14. Médias da atividade da enzima Manganês Peroxidase produzida por *Aspergillus niger* (CC.22) isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, cultivado em efluente têxtil.

Dias	Manganês Peroxidase (UI/L)
2	387,27 c
4	710,91 a
6	0,00 d
11	509,09 b
18	336,36 c
25	301,82 c
32	0,00 d
40	0,00 d

*Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si na coluna (Scott-Knott 5%).

Em efluente têxtil, não foi possível verificar a atividade de Lac produzida por *A. niger* (CC.22). Em contrapartida, a atividade de MnP foi detectada e seu pico de atividade foi de 710,91 UI/L, observado com 48 horas de incubação (Tabela 14).

5.7 Descoloração de RBBR por ação enzimática

O sobrenadante extraído do meio de cultivo do fungo padrão *L. edodes* (INCQS 40220) e de CO.11a não foram capazes de promover a descoloração de RBBR na ausência do fungo.

Tabela 15- Descoloração média do corante Brilhante Azul de Remazol por ação das enzimas presentes no sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Descoloração (%)	
	Com madeira	Sem madeira
2	8,97 a	3,78 b
4	0,00 b	4,31 a
6	5,50 a	0,00 b
11	3,16 a	2,57 a
18	0,00 b	4,71 a
25	4,30 b	6,58 a
32	11,60 a	9,25 b
40	12,95 a	10,11 b

*As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, nas linhas (Scott-knott, 5%).

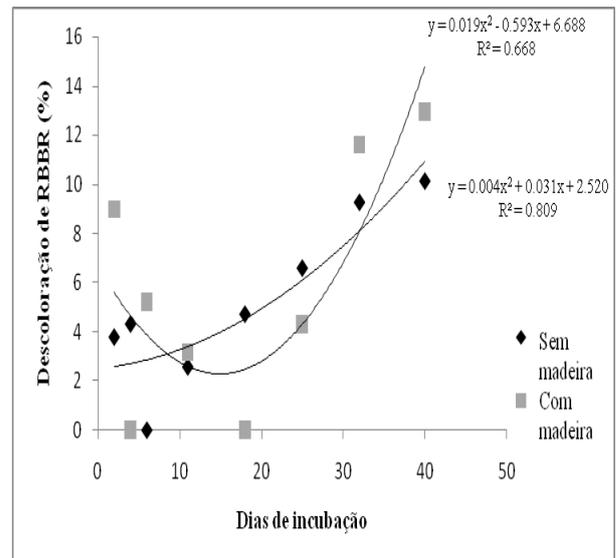


Figura 21- Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona a descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol pelo sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

A descoloração da solução de RBBR pelas enzimas presentes no sobrenadante extraído do meio de cultivo de CO. 5 não apresentou um padrão e variou entre os tratamentos, tendo os valores, oscilado também ao longo dos dias (Figura 21). No entanto, a descoloração promovida por ambos os sobrenadantes foi maior no último dia de incubação, com valores de 12,95% para

o sobrenadante do meio com acréscimo de madeira e 10,11% para o sobrenadante do meio sem madeira (Tabela 15).

Tabela 16- Média da descoloração do corante Brillante Azul de Remazol pelo sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Descoloração (%)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,00 a B	0,00 a D
4	0,00 a B	0,00 a D
6	0,00 a B	0,00 a D
11	0,00 b B	10,56 a A
18	0,00 b B	7,77 a C
25	3,99 b A	8,34 a B
32	0,00 a B	0,00 a D
40	0,00 a B	0,00 a D

*Medias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas, pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

A descoloração promovida pelo sobrenadante do meio de crescimento de CO.10 foi maior na ausência de madeira. O sobrenadante do meio acrescido com madeira promoveu descoloração da solução de RBBR apenas com 25 de incubação, enquanto o sobrenadante do mesmo fungo sem acréscimo de madeira promoveu descoloração entre o 11º e o 25º dias de incubação (Tabela 16).

Conforme pode ser observado na Figura 18, em *A. niger* a descoloração da solução de RBBR por ação das enzimas presentes no sobrenadante foi semelhante entre os tratamentos com e sem madeira. Em ambos a descoloração teve início com 18 dias de incubação a partir do qual foi observado um aumento exponencial que permaneceu até o final do experimento, exceto no 25º dia no meio na presença de madeira (Tabela 17).

A ação das enzimas presentes no sobrenadante de *A. niger* (CC.22) cultivado em efluente têxtil foi observada já no segundo dia de leitura e o pico de descoloração foi de com 5,53 % e deu-se com 18 dias, permanecendo elevado até o final do experimento (Figura 23).

Tabela 17- Descoloração média do corante Brilhante Azul de Remazol por ação das enzimas presentes no pelo sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Descoloração (%)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,000 a	0,000 a
4	0,000 a	0,000 a
6	0,000 a	0,000 a
11	0,000 a	0,000 a
18	6,396 a	6,744 a
25	0,000 b	3,610 a
32	10,636 a	11,146 a
40	10,552 b	14,116 a

*As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, nas linhas (Scott-knott, 5%).

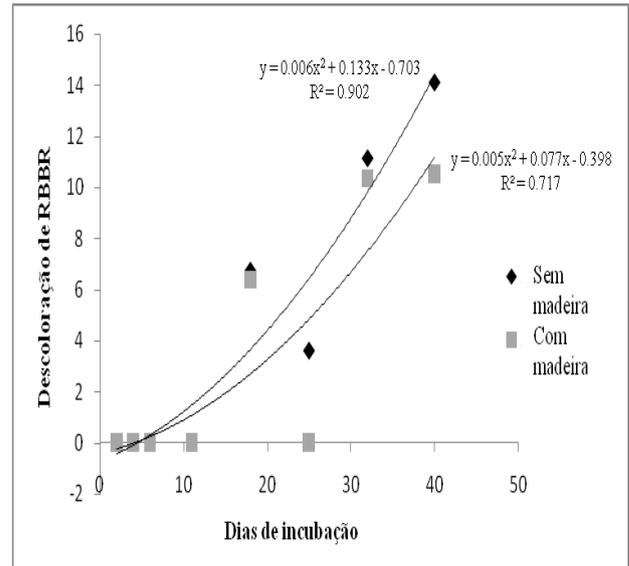


Figura 22- Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona a descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol pelo sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, e cultivado com e sem a adição de raspas de madeira em meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

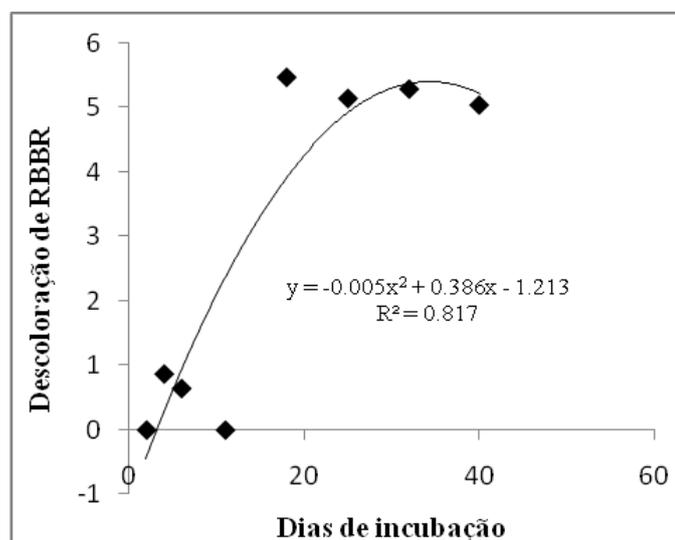


Figura 23- Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona a descoloração do corante Brilhante Azul de Remazol por ação de enzimas presentes no sobrenadante retirado do meio de crescimento do fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, e cultivado em efluente têxtil, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

5.7 Quantificação de proteínas totais

Para a análise de proteínas totais em *L. edodes* (INCQS 40220) foi utilizado o teste de comparação de médias. A mensuração das proteínas produzidas por *L. edodes* (INCQS 40220) pode ser realizada a partir do primeiro dia de leitura, em ambos os tratamentos. Quando cultivado em meio sem acréscimo de madeira, a produção de proteína apresenta uma correlação positiva com o tempo, tendo aumentado ao longo dos dias de experimento, até 25 dias de incubação, quando apresentou seu pico de produção com 556,00 mg/L. A partir de então não foi mais possível detectar a produção de proteínas totais pelo método de Bradford, nessas condições (Tabela 18).

Tabela 18 – Média das Proteínas Totais produzidas pelo fungo ligninolítico padrão *Lentinula edodes* (INCQS 40220) com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Proteínas Totais (mg/L)	
	Com madeira	Sem madeira
5	305,44 a G	47,820 b E
10	500,46 a F	69,36 b D
15	714,62 a C	80,32 b C
20	469,38 a G	213,10 b B
25	533,74 b E	556,00 a A
30	684,46 a D	0,00 b F
35	753,12 a A	0,00 b F
40	723,90 a B	0,00 b F

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos; médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott 5%).

Pode-se observar na Tabela 18 que a produção de Proteínas Totais por *L. edodes* (INCQS 40220) cultivado em meio Extrato de Malte com corante RBBR acrescido de madeira foi detectada durante todo o período de experimento. A produção máxima deu-se aos 35 dias de incubação, com 753,12 mg/L, no entanto mensurações menores, mas bastante próximas foram realizadas com 15 e 40 dias de experimento.

A mensuração das proteínas totais produzidas por CO. 11a teve seu pico aos 40 dias, quando o fungo foi cultivado sem madeira, com 1.113,99 mg/L. A presença de proteínas pode

ser detectada pelo método de Bradford a partir de 4 dias de incubação nessas condições (Tabela 19).

As proteínas totais produzidas por CO. 11a, cultivado na presença de madeira pode ser detectada a partir do primeiro dia de mensuração (48 horas) e seu pico foi de 806,68 mg/mL aos 18 dias de experimento (Tabela 19).

Na presença de madeira a produção de proteínas totais foi maior estatisticamente ($p < 0,0001$) que na ausência, do início até o 25º dia de incubação.

Tabela 19 – Média de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 11a, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Proteína Total (mg/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,00 a G	0,00 a F
4	633,05 a B	111,17 b E
6	557,70 a D	104,56 b E
11	573,05 a C	0,00 b F
18	806,68 a A	370,19 b C
25	277,48 a E	211,27 b D
32	191,77 b F	470,33 a B
40	190,68 b F	1113,99 a A

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias (Scott-Knott, 5%).

As proteínas totais produzidas por CO.5 sofreram efeito significativo da interação entre os dias de incubação e o tratamento utilizado. Quantidades maiores de proteína foram encontradas na presença da madeira, exceto no 11º dias de experimento (Figura 24).

Em CO.5 incubado em meio com madeira a quantificação de proteínas totais foi possível desde o primeiro dia de leitura e o pico de produção foi de 1.822,34 mg/L e deu-se no último dia de experimento. Já na ausência de madeira, a quantificação de proteínas totais foi possível apenas a partir do segundo dia de leitura e seu pico ocorreu também no último dia de experimento, com 1.285,55 mg/L (Tabela 20).

Tabela 20– Média de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Proteína Total (mg/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	682,98 a	0,00 b
4	538,29 a	5,74 b
6	322,14 a	10,85 b
11	194,65 b	702,13 a
18	953,52 a	559,70 b
25	1.497,934 a	1.067,72 b
32	1.251,69 a	844,46 b
40	1.822,34 a	1.285,55 b

*Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos (Scott-Knott, 5%).

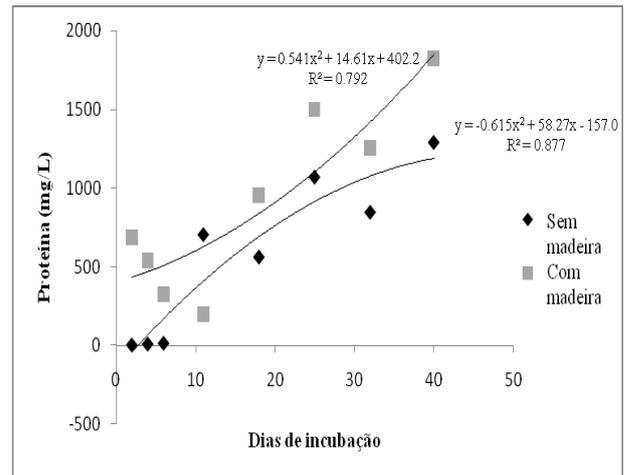


Figura 24- Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta as Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Tabela 21- Média de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Proteína Total (mg/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	369,84 a D	87,36 b E
4	485,80 a C	122,98 b D
6	517,37 a B	140,56 b C
11	586,88 a A	517,37 b A
18	3,66 b F	161,81 a B
25	34,04 b E	122,34 a D
32	0,00 b F	79,79 a E
40	0,00 b F	27,98 a F

*Medias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas, pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

As proteínas totais produzidas por CO. 10 sofreram efeito significativo da interação entre os dias de incubação e o tratamento utilizado. Em ambos os tratamentos a quantificação

foi possível logo no primeiro dia de leitura e foi maior até o 11º dia na presença de madeira e entre o 18º e o 40º dias na ausência de madeira (Tabela 21).

O pico de produção de proteínas por CO. 10, na presença de madeira, foi de 586,88 mg/L aos 11 dias de experimento e a quantificação não foi mais possível após 25 dias. Na ausência de madeira a quantificação de proteínas foi possível durante todo o período de experimento e o pico deu-se também no 11º dia e foi de 517,37 mg/L (Tabela 21).

As proteínas totais produzidas por *A. niger* foram detectadas pelo método de Bradford a partir de 11 dias de incubação e tiveram seu pico de produção aos 40 dias de experimentos para ambos os tratamentos (Figura 25). No entanto no meio com adição de madeira essa produção foi maior, atingindo o máximo de 1.298,20 mg/L, enquanto no meio sem acréscimo de madeira a produção máxima foi de 507,60 mg/L, conforme pode ser observado na Tabela 22.

Tabela 22- Médias de Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	Proteína Total (mg/L)	
	Com madeira	Sem madeira
2	0,000 a	0,000 a
4	0,000 a	0,000 a
6	0,000 a	0,000 a
11	461,20 a	230,60 b
18	680,40 a	261,00 b
25	943,00 a	383,80 b
32	946,60 a	398,00 b
40	1.298,20 a	507,60 b

*Medias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos (Scott-Knott, 5%).

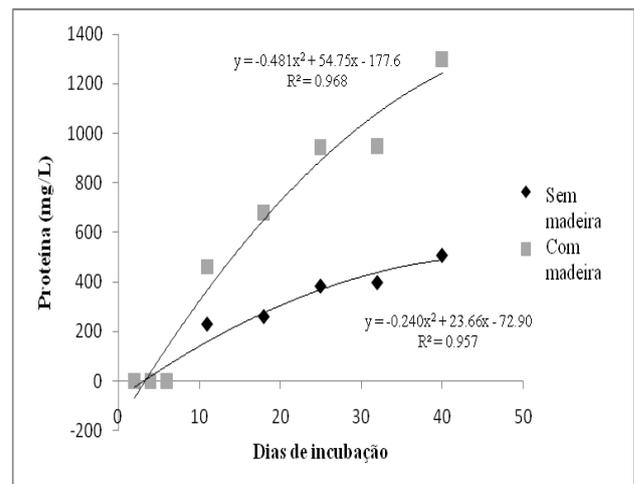


Figura 25- Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta as Proteínas Totais produzidas pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor

No cultivo de *A. niger* (CC.22) em efluente têxtil, a quantificação de proteínas totais produzidas não foi possível através do método utilizado.

5.8 Mensuração de pH

Os valores de pH foram mensurados a cada dia de leitura e foram observadas diferenças significativas ao longo do período de incubação em ambos os tratamentos, para todos os fungos estudados.

Em *L. edodes* (INCQS 40220), para a variável pH o efeito da interação entre os dias e a madeira não foi significativa, bem como o efeito dos dias isoladamente. Apenas a madeira teve influência significativa. Conforme pode ser observado na Tabela 23, na ausência de madeira o valor de pH apresentou-se maior, permanecendo mais próximo a 5.

Tabela 23 – Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo *Lentinula edodes* (INCQS 40220), com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Tratamento	pH do meio
Com madeira	4,75 b
Sem madeira	5,06 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na coluna, pela teste de Scott-Knott, com 5% de significância.

Tabela 24– Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 11a, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	pH do meio	
	Com madeira	Sem madeira
2	4,86 a A	4,65 b C
4	4,26 b C	4,91 a B
6	4,33 b C	4,83 a B
11	4,60 a B	4,63 a C
18	4,60 b B	4,88 a B
25	4,49 b B	4,95 a B
32	4,50 b B	4,95 a B
40	4,95 b A	5,61 a A

*As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias de experimento (Scott-knott, 5%).

O pH do meio de cultivo de CO.11 a sem adição de madeira permaneceu próximo de 5, valor inicial, no entanto, apresentou quedas com 2 e 11 dias de incubação e um aumento aos 40 dias de incubação. Já o pH do meio acrescido de madeira apresentou oscilação, permanecendo abaixo de 5 após 4 dias de incubação e retornando a um valo estatisticamente igual apenas no 40° dia de experimento (Tabela 24).

Entre os tratamentos não foi observado um padrão de variação nos valores de pH.

Tabela 25- Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	pH do meio	
	Com madeira	Sem madeira
2	4,96 b A	5,04 a A
4	4,74 b C	5,10 a A
6	4,92 a A	4,95 a B
11	4,85 b B	4,92 a B
18	4,80 b B	4,88 a C
25	4,82 a B	4,84 a C
32	4,80 b B	4,91 a B
40	4,83 a B	4,87 a C

*As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si nas colunas e entre os dias de experimento (Scott-knott, 5%).

Para o fungo CO.5, o pH do meio de crescimento foi maior na ausência de madeira que na presença deste material. O meio acrescido de madeira apresentou um decréscimo maior (de 5 para 4,74) no valor de pH com 4 dias de experimento, a partir do qual voltou a aumentar, embora tenha permanecido sempre menor que o valor inicial (pH= 5). Comportamento semelhante foi observado no pH do meio sem acréscimo de madeira, porém neste tratamento a maior queda foi verificada no 18°, 25° e 40° dias de incubação (Tabela 25).

Tabela 26. Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	pH do meio	
	Com madeira	Sem madeira
2	4,73 b	4,87 a
4	4,65 b	4,74 a
6	4,64 b	4,75 a
11	4,56 b	4,56 a
18	4,48 b	4,56 a
25	4,57 b	4,68 a
32	4,63 b	4,74 a
40	4,77 b	4,85 a

*As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si nas linhas e entre os tratamentos (Scott-knott, 5%).

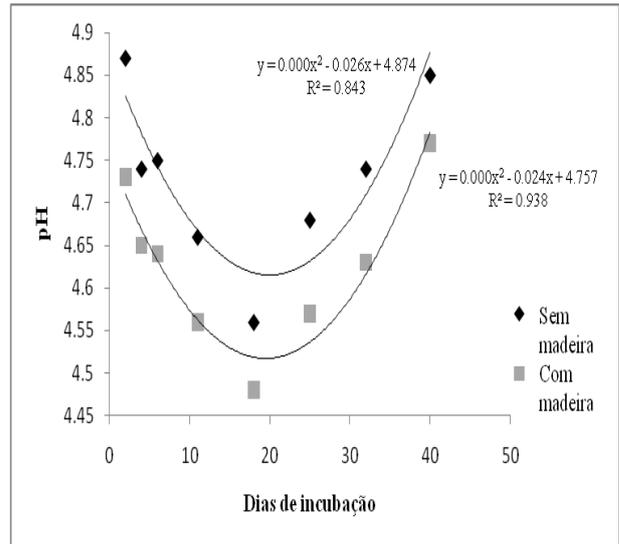


Figura 26- Modelo de regressão polinomial quadrática que apresenta o pH do meio de crescimento do fungo endofítico CO. 10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

De acordo com a Tabela 26, pode-se observar que o pH do meio de cultivo de CO. 10 foi maior na ausência de madeira ($p < 0,0001$), durante todo o período de experimento. Ao longo dos dias o pH de ambos os tratamentos apresentou o mesmo comportamento, com valores elevados no primeiro e último dias de incubação e valores mais baixos no 20º dia (Figura 26).

De acordo com a Tabela 27 o pH do meio de cultivo de *A. niger* (CC.22) sem acréscimo de madeira atingiu um valor mínimo de 2,16 com 4 dias de incubação, e um valor máximo de 6,4 com 11 dias de incubação. Os valores de pH do meio acrescido de madeira apresentou menor variação que o pH do meio sem adição de madeira, oscilando entre o mínimo de 3,85 com 2 dias de incubação e o valor máximo de 7,29 também com 11 dias de experimento.

Em ambos os tratamentos, para *A. niger* (CC.22), o comportamento do pH seguiu o mesmo padrão de variação, decaindo nos dias iniciais, voltando a aumentar até atingir seu valor máximo no 11º dia e permanecendo a cima de 5 até o final do experimento. Porém, na ausência de madeira, o pH do meio permaneceu abaixo dos valores apresentados por aquele acrescido de madeira (Figura 27).

Tabela 27 - Valores médios de pH do meio de crescimento do fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, com e sem a adição de raspas de madeira ao meio Extrato de Malte, em função do tempo de incubação.

Dias	pH do meio	
	Com madeira	Sem madeira
2	3,85 a	2,81 b
4	4,77 a	2,16 b
6	5,31 a	5,19 a
11	7,29 a	6,40 b
18	7,08 a	6,19 b
25	6,66 a	6,09 b
32	6,64 a	6,00 b
40	6,46 a	5,78 b

*As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, nas linhas (Scott-knott, 5%).

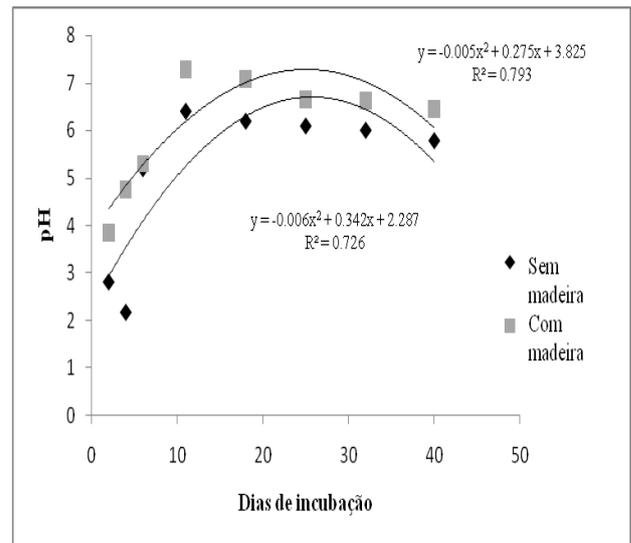


Figura 27- Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona o pH do meio de incubação de *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, cultivado com e sem a adição de raspas de madeira, em função do tempo de incubação.

Fonte: o autor.

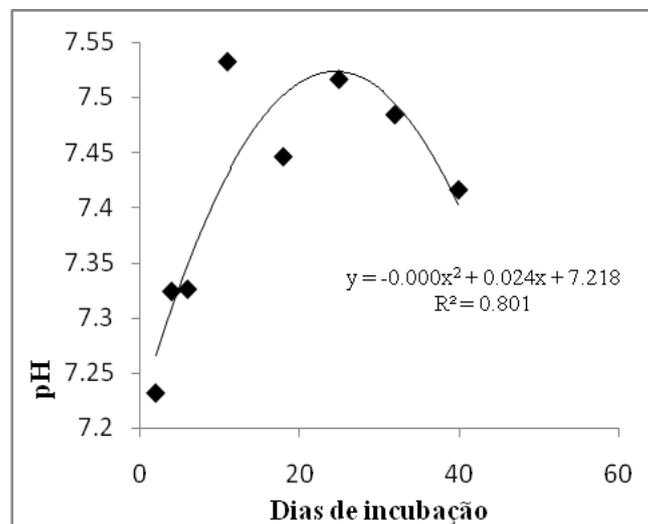


Figura 28- Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona o pH do meio de incubação de *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, cultivado em efluente têxtil, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Diferente do observado no cultivo em meio extrato de malte acrescido de RBBR, o pH do efluente no qual *A. niger* (CC.22) foi cultivado manteve-se com valores mais elevados, acima de 7, durante todo o período de experimento. O menor valor de pH foi de 7,23,

observado com 24 horas de incubação a partir de então, apresentou aumento até o 11º dia e voltou a diminuir novamente (Figura 28).

5.9 Determinação da Biomassa Micelial

Lentinula edodes (INCQS 40220) apresentou o pico de produção de biomassa, em torno de 25 dias, seguida novamente por uma queda de produção (Tabela 28)

Tabela 28 – Incremento médio de biomassa micelial do fungo *Lentinula edodes* (INCQS 40220), em função do tempo de incubação.

Dias	Biomassa (g)
5	0,1249 f
10	0,2256 b
15	0,1673 d
20	0,1441 e
25	0,3758 a
30	0,1897 c
35	0,1872 c
40	0,1197 f

*As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, na coluna (Scott-knott, 5%).

Para CO. 11a foi possível ajustar o modelo de regressão polinomial quadrático, com R de 0,67 e maior valor observado aos 30 dias de experimento, com 0,4995g. A partir do 30º dia a biomassa voltou a diminuir (Figura 29).

De acordo com a Tabela 29, pode-se observar o incremento de biomassa em CO.5 sofreu um aumento a partir do primeiro dia de experimento até o 30º, quando teve seu pico de crescimento, com 0,8033g, e desde então, apresentou um decréscimo na produção de biomassa.

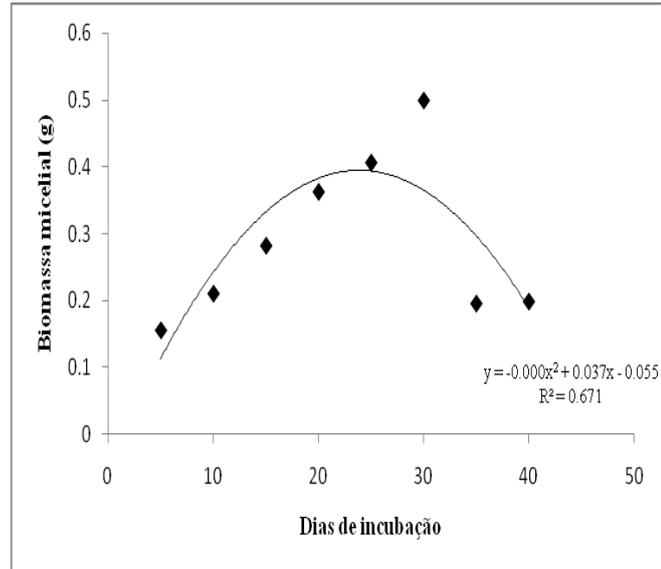


Figura 29- Modelo de regressão polinomial quadrático que relaciona o incremento da biomassa micelial do fungo endofítico CO. 11a, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, em função do tempo de incubação.

Fonte: O autor.

Tabela 29- Incremento médio da biomassa micelial do fungo endofítico CO.5, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, em função do tempo de incubação.

Dias	Biomassa (g)
5	0,1267 d
10	0,1467 d
15	0,1700 d
20	0,3200 c
25	0,5567 b
30	0,8033 a
35	0,1567 d
40	0,1733 d

*As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, na coluna (Scott-knott, 5%).

O pico de produção de biomassa por CO.10 deu-se no 30º dia de incubação, com 0,5805mg, no entanto, seu aumento foi observado logo a partir do primeiro dia de incubação. Após os 30 dias houve uma queda na produção de biomassa novamente (Tabela 30).

Aspergillus niger (CC.22) apresentou 2 picos de produção de biomassa, o primeiro deu-se em torno de 10 a 15 dias de incubação, com uma queda acentuada em torno de 20 dias, seguida por um aumento e outro pico em torno de 30 a 35 dias de incubação (Tabela 31).

Tabela 30- Incremento médio da biomassa micelial do fungo endofítico CO.10, isolado de *Coffea arabica* L. de manejo orgânico, em função do tempo de incubação.

Dias	Biomassa (g)
5	0,1449 d
10	0,1452 d
15	0,1614 c
20	0,2859 c
25	0,4555 b
30	0,5805 a
35	0,1546 c
40	0,1385 d

*Medias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si na coluna, pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

Tabela 31- Incremento médio da biomassa micelial do fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional, em função do tempo de incubação.

Dias	Biomassa (g)		
	<i>A. niger</i> em RBBR	<i>A. niger</i> em efluente têxtil	<i>A. niger</i> em meio Extrato de Malte
5	0,2775 f	0,0061 d	0,0859 a
10	0,4202 d	0,0089 c	0,0911 a
15	0,7170 a	0,0166 b	0,0725 b
20	0,4544 c	0,0188 a	0,0926 a
25	0,5694 b	0,0052 d	0,0693 b
30	0,3443 e	0,0061 d	0,0763 b
35	0,3668 e	0,0070 d	0,0706 b
40	0,3664 e	0,0065 d	0,0633 c

*As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, nas colunas (Scott-knott, 5%).

5.10 Análise comparativa: Atividades de descoloração e enzimática máximas

As maiores atividades de lacase foram encontradas para CO. 5 na ausência de madeira e para CO.10 na presença de madeira, no entanto na presença de também foram encontrados valores elevados para CO.5 e *A. niger* (CC.22) (Quadro 4).

Como pode ser observado no Quadro 3, a enzima manganês peroxidase apresentou atividades mais elevadas na ausência de madeira em CO.10 e valores altos também foram

observados em CO.5 e *A. niger* (CC.22). Já na presença de madeira as maiores atividade de MnP foram encontradas para *L.edodes*, embora CO.5 também tenha apresentado alta atividade.

Ainda de acordo com o Quadro 3, descoloração mais eficiente, na presença do fungo foi promovida por *A. niger* (CC.22) na ausência de madeira, seguido pelo mesmo fungo cultivado em efluente têxtil e CO.10 sem madeira. A descoloração enzimática foi maior para CO.5 e *A. niger* (CC.22).

Quadro 3- Atividades máximas de descoloração, descoloração enzimática e das enzimas Manganês Peroxidase e Lacase produzidas pelo fungo padrão *Lentinula edodes* (INCQS 40220) e pelos fungos CO.5, CO.10 e CO. 11a isolados de cafeeiro orgânico e *Aspergillus niger* (CC.22) isolado de cafeeiro convencional.

Fungos	Tratamento	MnP (UI/L)	Lac (UI/L)	Descoloração (%)	Descoloração enzimática (%)
<i>L. edodes</i>	Sem madeira	1.469,64	--	17,76	--
	Com madeira	2.250,44	338,25	13,70	--
CO.5	Sem madeira	2.009,09	15.824,08	59,74	10,11
	Com madeira	1.974,55	4.723,15	51,12	12,95
CO.10	Sem madeira	3.727,27	5.525	81,08	10,56
	Com madeira	1.623,63	58.170,37	66,16	3,99
CO.11a	Sem madeira	--	186,11	--	--
	Com madeira	--	259,29	15,83	--
<i>A. niger</i>	Sem madeira	2.183,64	739,81	94,67	14,12
	Com madeira	1.440	1.537,96	58,92	10,52
	Efluente	710,91	--	87,85	7,53

5.11 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Tabela 32- Resultados de Demanda Química de Oxigênio obtidos para efluente têxtil, antes e após o tratamento com o fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional.

	DQO inicial (mg O ₂ /L)	DQO final (mg O ₂ /L)
Media	747,43	739,36
DP	2,07	1,78
P	<0,0001	
Redução na DQO	1,08%	

Conforme pode ser observado na Tabela 32, houve uma redução de 1,08% na DQO. Esta redução foi medida pela queda na absorbância no comprimento de onda do Cr (VI) (435nm), que evidencia a sua redução a Cr (III) na presença de H₂SO₄.

5.12 Avaliação da fitotoxicidade

Para a análise da toxicidade do efluente sobre a semente de *Lactuca sativa* (alface) foi utilizado como um dos parâmetros o efeito na germinação, através da contagem do número de sementes que germinaram normalmente, dentro de cada diluição, considerando como critério de germinação o aparecimento efetivo da raiz.

Tabela 33- Médias da germinação de sementes de *Lactuca sativa* após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional.

Diluição	Germinação
Controle com água	6,00 a
Controle sem tratamento	3,40 b
10 %	5,20 a
20%	5,00 a
50%	4,80 a
80%	4,60 a
100%	1,80 c

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na coluna (Scott Knott 5%).

Conforme pode ser observado na Tabela 33, entre o controle negativo e as diluições de 10 a 80% do efluente tratado não houve diferença significativa entre a média de germinação. NO entanto, na presença do efluente bruto, sem tratamento e do efluente tratado sem diluição as médias de germinação foram menores.

Tabela 34- Comprimento de raízes e radículas de sementes de *Lactuca sativa* após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional.

Diluição	Comprimento (mm)	
	Raiz	Radícula
Controle com água	2,50 d	2,57 e
Controle sem tratamento	2,94 a	3,41 d
10 %	2,58 c	3,35 d
20%	2,76 b	2,52 e
50%	2,63 c	3,13 c
80%	2,91 a	5,00 a
100%	2,89 a	4,33 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas colunas (Scott Knott 5%).

Outro parâmetro considerado foi o efeito da presença do efluente no comprimento das raízes e das radículas de *L. sativa* durante os primeiros cinco dias de germinação.

Os maiores comprimentos para ambas as variáveis foi encontrado para a diluição de 80% e os menores valores foram observados para o controle negativo, no qual foi utilizado apenas água destilada (Tabela 34).

Considerou-se também a porcentagem de germinação e a porcentagem de inibição da germinação das sementes de alface na presença do efluente bruto e do efluente tratado nas diferentes diluições em relação ao controle negativo.

Observamos como o demonstrado na Tabela 35, que somente os valores para a radícula de alface mantida na presença de efluente tratado a 20% foram discrepantes em relação aos demais. Para este houve 1,94 % de inibição da germinação e o crescimento foi menor que 100%, enquanto para todos os outros tratamentos a germinação superou 100% e não houve inibição, em relação ao controle com água destilada.

Tabela 35- Porcentagem de crescimento e de inibição do crescimento das raízes e das radículas de sementes de *Lactuca sativa* após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional.

Diluição	% Crescimento		% Inibição	
	Raiz	Radícula	Raiz	Radícula
Controle sem tratamento	117,60	132,68	NH	NH
10 %	103,30	130,35	NH	NH
20%	110,40	98,50	NH	1,94
50%	105,20	121,79	NH	NH
80%	116,40	194,55	NH	NH
100%	115,60	168,48	NH	NH

Porcentagens mais elevadas de germinação foram encontradas para a diluição de 10% do efluente tratado, mas valores muito próximos foram apresentados pelas diluições de 20 e 50%. O efluente tratado, sem diluição apresentou as menores porcentagens de germinação (Tabela 36).

Tabela 36- Porcentagem de germinação relativa e absoluta de sementes de *Lactuca sativa* após cinco dias de cultivo na presença de diferentes diluições de efluente têxtil tratado com o fungo endofítico *Aspergillus niger* (CC.22), isolado de *Coffea arabica* L. de manejo convencional.

Diluição	% germinação	
	Relativa	Absoluta
Controle sem tratamento	56,66	14,17
10 %	86,67	21,67
20%	83,33	20,83
50%	80,00	20,00
80%	76,67	19,17
100%	30,00	7,50

6 DISCUSSÃO

6.1 Colonização e biodiversidade

Pode-se observar, de acordo com a Tabela 1, que o sistema orgânico comporta um maior número de isolados e apresenta maior porcentagem de colonização das folhas por fungos, corroborando os resultados obtidos por Almeida (2007). Embora o número total de morfoespécies isoladas não tenha diferido estatisticamente entre os manejos, observa-se uma tendência no sistema orgânico de abrigar uma maior diversidade fúngica.

Considerando a existência de certo grau de especificidade endofítico-hospedeiro (SAIKKONEN, 1998), é possível inferir sobre a ação de fatores externos que podem alterar a comunidade endofítica fúngica estudada, como exposição ao sol, ventos e proximidade a carreadores. No entanto, devido à variação encontrada entre os manejos, é provável que mesmo que a utilização de insumos agrícolas não seja a única fonte de variação, certamente exerce influência na diversidade e abundância de microrganismos que vivem associados à *Coffea arabica* L. e na atividade/potencial destes microrganismos.

6.2 Viabilidade dos isolados

A morfoespécie C3 não apresentou diferença entre os isolados do manejo orgânico e convencional em nenhum dos testes realizados, tornando possível inferir que o tipo de manejo não exerce influência sobre suas atividades fisiológicas.

Por outro lado, as morfoespécies C1 e C2 parecem sofrer efeito do tipo de cultivo de suas lavouras de origem, tendo apresentado números de esporos e diâmetro da colônia maiores nos isolados de manejo convencional. Em contrapartida, a atividade de redução do derivado tetrazólio XTT foi maior nestes isolados provenientes do manejo orgânico.

Alguns trabalhos, como o de Mo e colaboradores (2005) apontam que diferentes linhagens de uma mesma espécie fúngica podem apresentar necessidades nutricionais e comportamentos distintos entre si. No entanto, com base nos dados encontrados para C1 e C2 e, considerando as diferentes condições do ambiente de origem e que os procedimentos e

meios de cultivo em laboratório foram iguais entre os fungos, entendemos que possivelmente a explicação esteja realmente na origem dos microrganismos.

No manejo convencional a condição de estresse a que os fungos são submetidos poderia selecionar aqueles que investirem mais em crescimento e reprodução, mantendo assim sua linhagem. Já no caso de fungos associados a plantas de café cultivadas em manejo orgânico o ambiente em que se encontram é mais favorável para seu metabolismo e sobrevivência, no entanto isso permite que haja maior número de organismos, gere maior competição e leve a seleção daqueles que forem mais viáveis, o que explicaria a maior viabilidade de suas estruturas, e a menor necessidade de produzir muitos esporos reprodutivos, por exemplo (ALMEIDA, 2007).

A interferência do ambiente nas características dos fungos nos permite fazer um paralelo com uma teoria biológica bastante explorada em ecologia, que define espécies como estrategistas r e k. Um estrategista-r maximiza o crescimento populacional, produzindo vasto número de descendentes garantindo grandes números, em face de uma baixa sobrevivência, permite uma próxima geração para manter a espécie. Estrategistas-k são espécies para as quais atingir um tamanho estável e equilibrado representa uma estratégia bem sucedida investindo mais recursos para conseguirem poucos descendentes, mas de ‘alta qualidade’, esperando que a maioria sobreviva (BEGON et al., 2007).

6.3 Seleção de fungos com capacidade de produção de enzimas ligninolíticas - Teste de descoloração em placa

Sete morfoespécies fúngicas degradaram o corante RBBR, demonstrando a possível capacidade de secretar enzimas ligninolíticas e justificando a necessidade de realizar novos testes com a finalidade de identificar e caracterizar a atividade das referidas enzimas.

Embora em um estudo anterior Bragulat e colaboradores (1991) tenham relatado que alguns corantes poderiam restringir o crescimento de colônias de fungos, todos os fungos testados apresentaram crescimento considerável, mesmo na presença do corante RBBR.

Com base nos resultados encontrados e em dados na literatura, pode-se inferir que alguns microrganismos não são afetados pelo corante, e outros, possivelmente são capazes de degradar o corante e extrair nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio, por meio da produção de enzimas que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável (MADIGAN;

MARTINKO; PARKER, 2004), uma vez que há fungos que hidrolisam substâncias orgânicas mais complexas e alguns substratos podem ainda induzir a formação de enzimas degradativas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Machado e colaboradores (2005) demonstraram a capacidade de degradação do corante RBBR, após 14 dias de crescimento em meio sólido, por 106 basidiomicetos. Eichlerová et al. (2006) testaram a atividade descorante de oito espécies pertencentes ao gênero *Pleurotus*, sendo que quatro foram capazes de descolorir os dois corantes testados (“Orange G”, corante azo) e “RBBR”, corante antraquinona), três descoloraram apenas o corante RBBR, porém nenhuma delas apresentou capacidade de descolorar somente “Orange G”. O fato sugere, segundo os autores, que corantes antraquinonas são menos resistentes à degradação do que corantes azo.

6.4 Cinética de descoloração em meio líquido, atividade enzimática, produção de proteínas totais e incremento de biomassa micelial

A descoloração apresentada pelo fungo padrão *L. edodes* foi de 17,86% e 13,7% na presença e ausência de madeira, respectivamente, corroborando os resultados apresentados por Lenhard (2004), que encontrou um máximo de 20% de descoloração de RBBR para este mesmo fungo e atribui tal comportamento às maiores exigências nutricionais apresentadas pelo fungo durante o estudo.

Na ausência de madeira, *L. edodes* não apresentou produção/atividade da enzima lacase (Figura 15), enquanto a enzima MnP pode ser detectada logo no primeiro dia de leitura e permaneceu até o vigésimo quinto dia (Figura 16). No entanto, na presença de madeira, a MnP foi detectada apenas no primeiro dia de leitura e a Lac foi produzida e pode ser detectada durante todo o experimento. A produção de enzimas ligninolíticas por *L. edodes* foi analisada por Boer e colaboradores (2004), em culturas de milho, na qual detectaram alta atividade de MnP e muito baixa atividade de LiP e Lac.

Peralta e colaboradores (2004) constataram a indução de lacases por *Pleurotus pulmonarius* na presença de compostos fenólicos. Compostos fenólicos podem ser encontrados em diversos ambientes, estando largamente presentes na natureza como componentes naturais da madeira (lignina e tanino) (CAMPANELLA et al. 1993). Assim, acredita-se que a Lac em *L. edodes* tenha sido produzida devido à presença das raspas de

madeira, como substrato, que induziu uma maior produção enzimática pelo sistema ligninolítico, já que tais enzimas são produzidas para a degradação da madeira, em condições naturais.

A produção de proteínas totais mais elevada na presença da madeira (Tabela 18) pode ser atribuída a proteínas liberadas após a degradação do material vegetal pelo fungo de degradação branca *L. edodes*. Fungos da podridão branca são basidiomicetos que possuem um sistema enzimático capaz de degradar eficientemente a lignina, bem como a celulose e hemicelulose, três componentes principais da madeira (TUOR; WINTERHALTER; FIECHTER,1995).

Considerando a capacidade de descoloração da solução de RBBR apresentada pelo fungo endofítico CO. 11a do meio sólido e do meio líquido acrescido de madeira, de 15, 83%, e a ausência de descoloração no meio sem acréscimo de madeira, pode-se inferir que a diferença de descoloração entre o meio sólido (em placa) e os meios líquidos pode ter sido influenciada pela umidade, uma vez que as condições de temperatura e pH foram iguais entre os tratamentos. De acordo com Botella e colaboradores (2005), a umidade é um dos fatores que mais interferem na produção das enzimas do sistema ligninolítico e quando esta é excessiva ocorre diminuição na transferência de O₂ e da produção das enzimas pelo sistema. Desse modo, acredita-se que em meio líquido essa produção também possa ser prejudicada para alguns fungos.

A descoloração observada no meio com madeira pode ser atribuída a capacidade de adsorção de corante pela madeira, associada à capacidade de degradação apresentada pelo sistema enzimático de CO. 11a. Resultados obtidos por Antunes e colaboradores (2010) utilizando a serragem como adsorvente, demonstram alta percentagem de remoção do corante “Direct Green 26” atingindo uma redução de até 78,8% do mesmo, para concentração inicial de 500mg/L. Este mesmo autor afirma que a capacidade máxima de adsorção da serragem para o corante “Direct Green 26”, obtida através de modelos estatísticos, é igual a 119mg/g e, que este valor demonstra que a capacidade de adsorção da serragem é superior a de outros adsorventes já estudados.

A atividade da enzima ligninolítica Lac de CO.11a (Figura 17) foi relativamente baixa, quando comparada a atividade apresentada pela mesma enzima em *A. niger*, não tendo apresentado um padrão coincidente com os apresentados pela descoloração, produção de proteínas e pH, tanto na presença quanto na ausência de raspas de madeira.

Em CO.5 foi observada correlação linear positiva (0,6534) entre a atividade de descoloração e da enzima MnP, em ambos os tratamentos, indicando que esta enzima possa ser uma dos responsáveis pela degradação do corante RBBR presente no meio.

A enzima MnP, na ausência de madeira, apresentou correlação também com os valores de pH, apresentando maior atividade quando os valores de pH estavam mais elevados, no início do experimento. Já a enzima Lac apresentou correlação negativa com o pH, ou seja, as maiores atividades da enzima deram-se em valores mais baixos de pH, tanto na presença quanto na ausência de madeira acrescida ao meio.

Na presença de madeira no meio de cultivo foi observada correlação negativa entre as atividades das enzimas Lac e MnP produzidas por CO.5, uma vez que a produção de MnP foi detectada logo no início do período de incubação e a produção de lacase só passou a ser verificada em meados do período de incubação, quando a atividade de MnP já havia diminuído.

Para o fungo CO.10 a descoloração apresentou correlação com ambas as enzimas analisadas, na ausência de madeira. Para este tratamento, a enzima lacase apresentou correlação também com a descoloração promovida pelo sobrenadante retirado do meio de cultivo do fungo. No meio acrescido de madeira apenas a enzima MnP apresentou correlação com a atividade de descoloração promovida pelo fungo. Estes resultados reforçam a capacidade de degradação de corantes pelas enzimas do complexo ligninolítico.

Em ambos os tratamentos, a enzima Lac apresentou correlação negativa com os valores de pH do meio de cultivo do fungo CO.10, ou seja, a atividade de Lac foi maior valores de pH mais baixos.

Os fungos CO.5, CO.10 e CO.11a ainda não foram identificados a nível taxonômico, porém considerando as características bioquímicas investigadas como a capacidade de degradação de corantes e as enzimas secretas, acredita-se que os mesmos possam pertencer ao grupo dos fungos de podridão branca. Microrganismos deste grupo, ao degradar os constituintes da madeira, proporcionam coloração clara ao substrato, como o observado nos testes de descoloração realizados com os isolados. Além disso, os fungos CO.5, CO.10 e CO.11a apresentaram ainda capacidade de produzir lacase e/ou manganês peroxidase, enzimas produzidas pelos fungos da degradação branca. Sendo a lacase produzida por todos os fungos deste grupo, com exceção do *P.chryso sporium*, que apresenta pouca ou nenhuma atividade (TUOR et al., 1995)

Aspergulus niger é um ascomiceto ou fungo de degradação mole que desempenha um papel significativo no ciclo global do carbono. Como um microrganismo saprófito do solo,

produz grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na decomposição de lignocelulose de plantas e, grande variedade destas enzimas são importantes na indústria de biotecnologia (BAKER, 2006).

Em nosso estudo, na ausência de madeira, *A. niger* (CC.22) apresentou valores elevados de descoloração (94,67%) com 48 horas de experimento, indo de encontro aos resultados obtidos por outros autores. Dullius (2004) demonstrou que um fungo do gênero *Aspergillus* apresenta alta capacidade de remoção de corantes uma vez que este, no período de 24 horas, foi capaz de descolorir totalmente efluentes sintéticos preparados com os corantes Diresul Oliva RDT-T e Marinho Sulfuroso 4RT-VLS. Erum e Ahmed (2011) demonstraram remoção de corante Acid Red 151 de 95% para *A. flavus* SA2, 81% para *A. niger* SA1 e 93% para *A. terreus* SA3. Namdhari et al (2012) encontraram 95,13%, 93,01% e descoloração 83,14% do Reactive Blue MR por *A. allhabadii*, *A. sulphureus* e *A. niger*, respectivamente.

As atividades de descoloração do corante RBBR e de MnP em *A. niger* (CC.22) sem acréscimo de madeira oscilaram de forma um pouco diferentes, no entanto permaneceram elevadas durante todo o período analisado. O padrão de atividade de descoloração na presença de madeira coincidiu com o de atividade da enzima MnP, tendo início logo no primeiro dia de mensuração e não sendo mais detectada após o sexto dia de experimento, sugerindo que esta enzima tenha participação na descoloração do corante RBBR, tanto na presença quanto na ausência de madeira no meio de cultura. A diferença na descoloração entre os dois tratamentos pode ser atribuída também à capacidade de adsorção de corante apresentada pela madeira, que ocorre no período inicial de contato entre os materiais.

Em estudos da capacidade adsortiva da madeira, nota-se que quanto menor a concentração inicial de corante em solução maior a eficiência na remoção de cor. Isso devido ao número limitado de sítios superficiais disponíveis para adsorção, que durante o processo vão sendo ocupados pelas moléculas de corante (CARVALHO, FUNGARO, IZIDORO, 2010). Quando a concentração de corante em solução aumenta, aumenta também a competição por espaços vazios no material adsorvente, que após atingir a saturação não apresenta mais propriedade adsortiva. Desse modo, pode-se considerar também que mesmo em casos em que a concentração de corante é constante, após certo tempo, todos os sítios superficiais são ocupados e não há mais capacidade de descoloração (ANTUNES et al., 2010).

A atividade da enzima ligninolítica Lac produzida por *A. niger* (CC.22), mostrou uma correlação linear negativa (-0,9117) com a remoção de corante RBBR na presença do fungo, o que permite deduzir que ambas as atividades têm uma relação direta. No entanto, há uma

correlação positiva entre a atividade de Lac e a descoloração enzimática da solução de RBBR, demonstrando que no extrato enzimático do fungo, esta enzima pode ser mais eficiente na degradação do corante. Ambos foram detectados após a primeira metade do período de incubação. Em seu trabalho, Novotny e colaboradores (2004) também mostraram que os níveis de atividade de MnP e Lac não mostraram relação direta com a descoloração eficaz do RBBR por extratos de *Irpex lacteus* cultivado em substrato sólido.

Ainda em *A. niger*, correlação linear positiva também pode ser observada entre a atividade de Lac e de proteínas totais quantificadas. Uma vez que a proteína foi detectada depois de seis dias de incubação, quando houve um aumento na atividade de Lac. Portanto, acreditamos que a elevada atividade de Lac, em conjunto com outras enzimas secretadas pelo fungo, poderiam ter contribuído de uma forma significativa para a quantidade de proteína encontrada.

A maior produção de proteínas totais, no final do experimento, mostrou uma correlação positiva linear (0,7848) com a descoloração enzimática da solução de RBBR. Baseado nesta relação, pode-se inferir que o aumento na proteína total deva-se a um aumento da produção de enzimas, incluindo a Lac, e que estas enzimas estão presentes no sobrenadante e são responsáveis pela remoção de cor a da solução de RBBR.

Aspergillus niger é bastante conhecido por seu papel como um produtor de ácido cítrico durante o processo de fermentação (MAGNUSON e LASURE, 2004), e esta produção, possivelmente pode ser utilizada para explicar a queda inicial nos valores de pH, observada em ambos os tratamentos. Coincide com os valores mais baixos de pH também o período de maior atividade de MnP produzida por *A. niger* no tratamento com adição de madeira, que parece ter seu pH ótimo em torno de 3,5 a 4,5 e, conseqüentemente, a maior atividade de descoloração. Os valores mais elevados de pH foram encontrados no período em que esta enzima parou de ser detectada pelo método utilizado. No entanto, a Lac só passou a ser expressa quando os valores de pH já estavam acima de 5, em ambos os tratamentos, provavelmente devido ao fim da produção de ácido cítrico. Esta elevação nos valores de pH pode ter diminuído a atividade da Lac, fazendo com que esta enzima não apresentasse relação com a descoloração, uma vez que de acordo com a literatura, seu pH ótimo encontra-se entre 3,0 e 3,5.

Cavallazzi et al. (2004) analisaram a produção das principais LMEs por *Lepista* sp., em meio de cultivo líquido em condições estáticas (sem agitação), detectando a produção de MnP e Lac. A temperatura ótima para atividade de lacase foi 45°C, com relação ao pH ótimo,

obtiveram uma maior atividade em pH 3,5 e um segundo pico de atividade com pH 6, porém em valores superiores a pH 6,5 não foi detectada atividade.

Em *A. niger*, o aumento na biomassa (Tabela 31) corresponde ao período de maior descoloração (Figura 13), assim como a queda na biomassa corresponde ao período de queda na descoloração. Esta correlação indica que a massa micelial pode atuar diretamente na remoção de corante por adsorção. Esta hipótese é suportada pelos resultados obtidos por Baskaralingam e colaboradores (2005) que mostraram que o pH ácido favorece a adsorção do corante Acid Red 151. Outro estudo mostrou a capacidade de adsorção de corante por *Rhizopus arrhizus* quando o pH ótimo era de 2 e uma diminuição na absorção de corante foi observado com o aumento do pH (AKSU e TEZER, 2000).

Outra hipótese para explicar a correlação entre o aumento da biomassa micelial e descoloração é que, quando há maior produção de biomassa, o fungo, possivelmente, seja capaz de produzir e secretar maior quantidade de enzimas, que atuam na degradação do corante. Embora já tenha sido descrito que estas enzimas normalmente são secretadas (WESENBERG et al., 2003; CAVALLAZZI et al., 2004), também existem relatos que as enzimas envolvidas no processo de descoloração possam estar associadas à membrana do micélio (YESILADA et al., 2002; SVOBODAVÁ et al., 2008).

Quando cultivado em efluente têxtil *A. niger* (CC.22) promoveu descoloração, verificada pela alteração nos valores de absorbância do efluente tratado por 40 dias, em relação ao efluente controle, obtidos por varredura em UV/visível (Figura 14).

A atividade de Lac não foi verificada, mas houve atividade da enzima MnP e também descoloração enzimática do corante RBBR, demonstrando a produção de enzimas por *A. niger* incubado em efluente têxtil.

Em relação aos valores de pH do meio, apenas o pH do meio de crescimento de *A. niger* apresentou-se mais elevado quando cultivado na presença de madeira. Nos demais fungos analisados o pH do meio foi estatisticamente menor no tratamento com acréscimo de madeira. Tal alteração nos valores de pH podem ser o resultado da concentração de compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos, principalmente os fungos causadores de decomposição branca e parda, que devido a massa molar relativamente baixa, poderiam se difundir pela parede celular dos componentes da madeira e degradar os componentes ali existentes. Com isso, a parede celular seria desestruturada a ponto de permitir a subsequente penetração das enzimas lignocelulolíticas, nos estágios mais avançados de degradação (ARANTES e MILAGRES, 2009). Um exemplo de composto molecular de baixa massa molar produzido é o ácido oxálico, ao qual já foram associadas várias funções

importantes durante a biodegradação da madeira, tanto por fungos de decomposição branca quanto parda, como por exemplo o abaixamento do pH no microambiente próximo à hifa fúngica, protegendo o fungo, contra a geração de oxigênio reativo (ROS) próximo à hifa (GOODELL et al., 1997).

A produção de biomassa micelial por todos os fungos analisados indica que mesmo na presença de corante os meios continham as macromoléculas requeridas por esses organismos para o seu crescimento. Entretanto, a quantidade de massa micelial é dependente dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, grau de aeração, entre outros. Estes parâmetros podem interferir tanto na produção da biomassa quanto dos compostos isolados desse substrato. Segundo Magnelli (2005), o resultado obtido ao final do procedimento determina como essas variáveis são aplicadas no cultivo microbiano.

A influência da composição do meio na produção de biomassa micelial fica ainda mais evidente quando comparamos o comportamento de *A. niger* que foi cultivado em três condições diferentes, sendo elas, em meio extrato de malte, em meio extrato de malte acrescido de corante RBBR e em efluente têxtil. Ao contrario do esperado, em meio extrato de malte acrescido de corante a quantidade de biomassa produzida foi aproximadamente seis vezes maior que a biomassa produzida apenas em meio extrato de malte e mais de 20 vezes maior que a biomassa produzida pelo fungo quando cultivado em efluente têxtil.

Vários trabalhos comprovaram que cada fungo tem suas exigências nutricionais específicas (POINTING et al., 2000; BARBOSA et al., 2002; GARCIA et al., 2006; VALERIANO et al., 2009). Todos os organismos precisam encontrar em seu ambiente, unidades estruturais bem como fontes de energia para a construção e manutenção de sua estrutura e organização. Alguns elementos são essenciais para o crescimento dos fungos. Carbono e nitrogênio são elementos essenciais no crescimento micelial dos fungos e estão diretamente relacionados à produção de biomassa destes microrganismos. As quantidades de carbono e nitrogênio necessárias mostram variações de acordo com a espécie e o meio estudado (GARCIA, 2006).

A possibilidade de utilização da biomassa em processos biotecnológicos tais como o da tecnologia de biorremediação para absorção de metais pesados, remoção de substâncias xenobióticas e outros processos industriais e biotecnológicos torna o estudo de otimização da produção de biomassa de fundamental importância.

6.5 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Os valores iniciais de DQO foram em média 747 mg O₂/L, valor considerado baixo, quando comparado aos encontrados por pesquisadores em outros efluentes têxteis, como no trabalho de Salgado e colabores (2009) que encontraram uma média de 1.437 mg O₂/L e Bertazzolli e Pelegrini (2002) que encontraram 2500 mg O₂/L.

Após o tratamento com o fungo *A. niger* houve redução de 1,08% na DQO do efluente têxtil, atingindo uma média de 739 mg O₂/L. Estando este valor acima dos estabelecidos pela Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG n.º 1, de 05 de Maio de 2008 que determina níveis de até 180 mg O₂/L como aceitáveis para efluentes a serem lançados no ambiente.

A baixa redução na DQO pode ser por uma pequena redução da matéria orgânica degradável. A dificuldade em reduzir a DQO pode ser atribuída ainda a não degradabilidade ou toxicidade de muitas substâncias utilizadas no processamento têxtil, que acarretam altos valores de DQO e problemas em sistemas de tratamento de efluentes (PERES e ABRAHÃO, 1998). Além disso, Seabra (2008) afirma que caso não haja as condições ambientais específicas das quais as populações microbianas necessitam para realizar a biodegradação de contaminante, estas entram em latência até que condições ideais sejam disponibilizadas. Dessa forma, melhores níveis de degradação dos componentes do efluente têxtil e redução da DQO podem ser obtidos pelo acréscimo de meio de cultura ao efluente como fonte de nutrientes para o fungo (TAMBOLI et al., 2010), tornando as condições ambientais mais adequadas para a atividade microbiana.

6.6 Avaliação da fitotoxicidade

De acordo com Garcia e colaboradores (2006) a água é o fator ambiental que mais influencia o processo de germinação. A absorção de água promove a reidratação dos tecidos, desencadeando a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que por sua vez fornecem a energia e os nutrientes necessários para o crescimento do eixo embrionário. No entanto, agentes tóxicos presentes na água podem interferir no processo

germinativo, o que torna altamente importante a avaliação da germinação de espécies sensíveis, como forma de identificar a presença de contaminantes (GARCIA et al., 2006).

As informações geradas a partir de testes de toxicidade com a semente de alface (*Lactuca sativa*) fornecem dados a cerca do possível efeito dos contaminantes nas comunidades vegetais das margens dos corpos de água afetados, sendo também uma das espécies vegetais bastante empregadas na avaliação da germinação, pela facilidade de obtenção e por oferecer resultados rápidos e fáceis de avaliar (SOBRERO e RONCO, 2004).

Os bioensaios com sementes de alface são provas de toxicidade aguda (120 horas de exposição), nos quais se podem avaliar os efeitos fitotóxicos de substâncias puras ou de uma mistura de compostos no processo de germinação e desenvolvimento de plântulas durante o período inicial de crescimento. Como pontos finais para avaliação dos efeitos fitotóxicos, é feita a análise da inibição da germinação e da inibição do crescimento da raiz e radícula. *L. sativa* tem sido empregada por diversos pesquisadores em seus estudos (PALÁCIO et al. 2012; GINOS et al., 2006; KUMMEROVÁ e KMENTOVÁ, 2004; BELTRAMI et al., 1999; ORTEGA et al., 1996).

A análise da germinação e do desenvolvimento da raiz e da radícula nos permite avaliar a capacidade de estabelecimento e desenvolvimento da planta em meios potencialmente tóxicos (GARCIA et al., 2006). A ausência de efeito significativo do efluente tratado nas diluições de 10 a 80% na média de germinação pode ser relacionado à baixas concentrações de compostos tóxicos, ou seja, em concentrações insuficientes para afetar o processo de germinação. No entanto o efluente tratado sem diluição e o efluente não tratado interferiram na germinação das sementes de alface, indicando, que os componentes presentes e mais concentrados apresentaram toxicidade para as sementes.

Os maiores comprimentos de raízes e radículas observados para a diluição de 80% do efluente tratado, assim como as maiores porcentagens de germinação encontradas nas diluições entre 10 a 80%, comparativamente ao controle podem ser atribuídos ao fato do efluente veicular macro e micronutrientes em quantidades significativas para a nutrição da alface.

A avaliação da influência do efluente sobre o crescimento da raiz e radícula das plântulas permite analisar o efeito tóxico de compostos solúveis presentes em níveis de concentração mais baixos e insuficientes para inibir completamente a germinação, podendo, no entanto, retardar ou inibir crescimento da raiz ou da radícula, dependendo do modo e sítio de ação do composto. Assim, a alteração no crescimento da raiz e radícula constituem indicadores sub-letais muito sensíveis para a avaliação de efeitos biológicos em vegetais

(GARCIA et al., 2006). Na análise do efeito causado pelo efluente têxtil tratado com *A. niger* (CC.22), com exceção da diluição de 20%, para todas as demais diluições, o crescimento da radícula superou o da raiz, e não houve inibição. Este comportamento é característico de amostras com baixas concentrações de compostos fenólicos, que estimulam o crescimento da radícula (ORTEGA et al., 1996).

Diversos compostos fenólicos podem ser encontrados em efluentes industriais e sua concentração é limitada pela resolução Conama 357. Isto faz com que a identificação da presença de compostos fenólicos nos efluentes têxteis e sua eliminação antes do lançamento do efluente tratado no ambiente sejam fundamentais, uma vez que a contaminação por compostos fenólicos em águas potáveis pode causar sérios problemas de saúde pública, além de ser tóxico ao meio ambiente aquático, podendo provocar a morte de peixes e destruir o balanço ambiental aquático (MISHRA et al., 1995).

7 CONCLUSÕES

Há diferença entre os fungos isolados de plantas de *Coffea arabica* mantidas sob manejo orgânico e convencional tanto na diversidade e abundância, quanto no potencial biotecnológico. Pode haver ainda influência do tipo de manejo do café na atividade metabólica dos fungos isolado, com maior viabilidade dos fungos isolados do manejo orgânico e maior taxa de crescimento e produção de esporos nos fungos os isolados do manejo convencional.

Todos os fungos apresentaram aumento na quantidade de biomassa quando cultivados na presença do corante RBBR, entre o 10º e o 30º dias de incubação. E menores valores de pH foram observados nos meios de cultivo acrescidos de madeira para todos os fungos.

Dentre os fungos isolados 15,56% apresentaram capacidade de degradar o corante RBBR e os melhores resultados em efluente sintético foram encontrados para *A. niger* (CC.22), que foi isolado do manejo convencional. Este fungo apresentou elevadas atividades de descoloração e MnP em todos os tratamentos utilizados e altas atividades de Lac quando cultivado em meio extrato de malte acrescido do corante RBBR, tanto na presença quanto na ausência de madeira.

Embora não tenha havido alteração nos padrões de fitotoxicidade e níveis de DQO, o fungo *A. niger* foi capaz de remover até 94,81% da cor em efluente sintético e 72,22% de em efluente têxtil, em apenas 48 horas de incubação, demonstrando que este fungo apresenta potencial para biorremediação.

Entre as enzimas analisadas, a MnP parece estar mais envolvida no processo de descoloração, no entanto a atividade de descoloração na presença dos fungos foi maior que a promovida pela atividade das enzimas presentes no sobrenadante, indicando que existam outros fatores envolvidos na descoloração e que estão relacionados com a presença do fungo.

De modo geral, os resultados obtidos reforçam a possibilidade de aplicação de enzimas ligninolíticas no tratamento de águas residuais, especialmente para a remoção de corantes. Por conseguinte, o potencial de *A. niger* (CC.22) para o tratamento de efluentes têxteis deve ser mais bem investigado.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustácea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA (ABIQUM). **Corantes e Pigmentos**. 1996. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>. Acesso em: 10 jul. 2012.

AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana- de açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Microbiológica) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

AKSU, Z.; TEZER, S. Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 431-439, 2000.

ALMEIDA, A. R. **Fungos endofíticos e espécies de *Phoma* Associados ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2007. 84f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ANASTASI, A. et al. Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation, **Bioresource Technology**, v. 123, p. 106-111, 2012.

ANDRADE, A. L. C. **Aspectos do crescimento e influência de parâmetros físicos na atividade da lacase do fungo amazônico *Trametes lactinea***. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia)- Universidade de Estado do Amazonas, Manaus, 2011.

ANTUNES, M. L. P. et al. Estudo da utilização de serragem de madeira como adsorvente para tratamento de efluentes têxteis. **REA – Revista de estudos ambientais**, v. 12, n. 2, p. 6-14, 2010.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química nova**, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009.

ASGHER, M.; AZIM, N.; BHATTI, H. N. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* IBL-04. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 61–65, 2009.

BAIOCCO, P. et al. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 191- 197, 2003.

BAKER, S. E. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v. 44, p. 17-21, 2006.

BANAT, I.M., et al., Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review, **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S.; TIEN, M. Lignin and Mn Peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. **Biochemistry**, v. 38, p. 3205-3210, 1999.

BARBOSA, C. C. et al., Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 821-829, 2002.

BARY, A. Morphologie Physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyceten. Vol. II. Olmeister's **Hand book of Physiological Botany**, Leipzig, 1866.

BASKARALINGAM, P. et al. Adsorption of acid dye onto organobentonite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 638-639, 2005.

BAUGHMAN, G.L., WEBER, E.J., Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. **Environmental Science Technology**, v. 28, p. 267-276, 1994.

BAYMAN, P. et al. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Micological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p 143-149, 1998.

BEGON, M., C. R. TOWNSEND E J. L. HARPER. 2007. **Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas**. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.

BELTRAMI, M.; ROSSI, D.; BAUDO, R. Phytotoxicity assessment of Lake Orta sediments. **Aquatic Ecosystems Health and Management**, v. 2, p. 391-401, 1999.

BENNET, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v.66, p.101-107, 1998.

BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do Processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 477-482, 2002.

BHAT, K. L. et al. Metabolites of monomethoxy-4-aminoazobenzene dyes: a computational study. **Dyes and Pigments**, v. 50, p. 133-150, 2001.

BIZUKOJE, E. L. et al. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. **Chemosphere**, v. 58, p. 1249-1253, 2005.

BOER, C. G. et al., Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme, **Bioresource Technology**, v. 94, p. 107-112, 2004.

BOURBONNAIS, R; PAICE, M. G., Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*, **Biochemical Journal**, v. 255, p. 445-450, 1988.

BORGER, W. S. **Estudos de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformação**. 2008. 350f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BOTELLA, C. et al. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**. v. 26, p. 100-106, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUMPUS, J. A. Microbial degradation of azo dyes. **Elsevier Science**, v. 32, p. 157-177, 1995.

CAMERON, M. D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D.S. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

CAMPANELLA, L. et al. Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. **Analyst**. v. 118, p. 979-986, 1993.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

CARROLL, G.; PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia**, v. 75, p. 53-63, 1983.

CARVALHO, T.E.M.; FUNGARO, D.A.; IZIDORO, J.C. Adsorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólitas sintéticas. **Química Nova**, v. 33, p. 358, 2010.

CASA, R. et al. Reduction of the phenolic components in olive mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. **Chemosphere**, v. 50, p. 959-966, 2003.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 181-184, 1967.

CAVALLAZZI, J. R. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; KASUYA, M. C. M. Laccase production by *Lepista sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 261-263, 2004.

COLLADO, J.; PLATAS, G.; PELÁEZ. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. **Nova Hedwigia**, v. 63, p.347-360, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Avaliação da Safra Agrícola Cafeeira 2013 - Primeira Estimativa**. Brasília: Conab, 2013

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **RESOLUÇÃO Nº 357**, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União. 18 de março de 2005.

COPAM-CERH-MG (O CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL e O CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS). **Deliberação Normativa Conjunta COPAM-CERH-MG N.º 1**, de 05 de maio de 2008. Diário do Executivo de Minas Gerais. 13 de maio de 2008.

COSTA, C.R. et al. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods, **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830. 2008.

CROZIER, J. et al. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, v. 55, n.6, p. 783-791, 2006.

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIE, J. L.N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1562-1564, 2009.

DaMATA, F.M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.16, n. 1, p. 1-6, 2004.

DENG, Z. et al. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapeseed (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p.717-724, 2011.

DELLAMATRICE, P. M.; **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. 2005. 137f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization and toxicity of municipal waste by horseradish (*Cochlearia armoracia*). **Química Nova**, vol. 29, n.3, 2006.

DULLIUS, C. H. **Utilização de fungos para biodegradação de Corantes têxteis sintéticos**. 2004. 72f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2004.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2008. cap. 13, p. 304-319.

EGGERT, C. et al. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p.144-148, 1996.

EICHLEROVA, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinsum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Czech Republic, p. 759-766, 2006.

ERUM, S.; AHMED, S. Comparison of dye decolorization efficiencies of indigenous fungal isolates. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 17, p. 3399-3411, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. 638p.

FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. **ACS Symposium series - American Chemical Society**, v. 380, p. 120-128, 1988.

FERNANDEZ-ALBA, A. R. et al. Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. **Water Research**, v. 36, p. 4255-4262, 2002.

FERRÃO, J. E. M. **A aventura das plantas. E os descobrimentos portugueses.** Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, Fundação Berardo. 1992.

FONSECA, M.D.P. **Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira.** 99f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - MBT), Escola Superior de Ciências da Saúde - ESA, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2009.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms, **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 241-249, 2011.

GARCIA J. C. et al. Comparative study of the degradation of real textile effluents by photocatalytic reactions involving UV/TiO₂/H₂O₂ and UV/Fe²⁺/H₂O₂ systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 105-110, 2006.

GARCIA, T.A.; SANTIAGO, M.F.; ULHOA, C. J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine. **Biotechnology Letters**. v. 28, p. 633-636, 2006.

GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. **CBS Course of Mycology**. 4. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-46. 2005.

GERMAINE, K. et al. Bacterial endophyte-enhanced phyto-remediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **FEMS Microbiol Ecology** v. 57, p. 302-310, 2006.

GINOS, A., MANIOS, T.; MANTZAVINOS, D. Treatment of olive mill effluents by coagulation-flocculation- hydrogen peroxide oxidation and effect on phytotoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 20, p. 135 – 142, 2006.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 133-162, 1997.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 49-56, 2003.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, v. 23, n.1 2000.

GUHARAY, F.; MONTERROSO, D.; STAVER, C. El diseño y manejo de la sombra para la supresión de plagas en cafetales de América Central. **Agroforestería en las Américas**. v. 8, p. 22-29, 2001.

GUIMARÃES, D. O.; **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**, 2006. 236f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

GUO, B. H. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 44, p.136-142, 2008.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and Soil-Borne Plant Pathogenic Fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 155-162, 1996.

HALLMANN, J. et al. Bacteria endophytes in agricultural crops, *Can. Journal Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science And Technology**, Japão, v. 24, p. 23-63, 1990.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 30, p. 454-466, 2002.

HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**, 3. ed., 2009, CD-Rom version.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520-522, 1994.

IFOAM. **Basic standards for organic agriculture and processing, and guidelines for coffee, cocoa and tea**: evaluation of inputs. Tholey-Theley, Germany, 1996.

KAMIDA, H. M. et al. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quimica Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KHALAF, M. A. Biosorption of reactive dye from textile wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6631-6634, 2008.

KUWAHARA, M., et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.

KUMMENTOVÁ, M.; KMENTOVÁ, E. Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. **Chemosphere**, v. 56, p. 387-393, 2004.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quimica Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo, SP: Sarvier, 2002.

LENHARD, D. C. **Descoloração de corantes têxteis reativos por fungos ligninolíticos e por lacase**. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

LOPES, P. R.; FERRAZ, J. M. G. Caracterização do Manejo de Agroecossistemas Cafeeiros Convencional, Organo-Mineral, Orgânico e Agroflorestal em Minas Gerais. **Revista Brasileira De Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. The ecotoxicology as a tool in biomonitoring of aquatic ecosystems, **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381. 2008.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.

MAGNUSON, J; LASURE, L. Organic acid production by filamentous fungi. In: TKACZ, J.; LANGE, L. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2004. cap. 12, p. 307-340.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de Café no Brasil: Novo Manual de Recomendações**. MAPA/PROCAFÉ, Rio de Janeiro, 2002.

MARTINS DA SILVA, N. **Avaliação do Potencial Antimicrobiano, Enzimático e de Crescimento de um Isolado Amazônico do Fungo *Pycnopus sanguineus***. 2010. 180f. (Dissertação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - MBT) - Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C., Lacase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. v.60, p.551- 565, 2002.

MELO, F. M. P. **Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a**. 2005. 102f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2 ed.. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

MENEZES, J. C. S. S.; PIZZOLATO, T. M.; SCHNEIDER, A. H. Avaliação dos processos de coagulação/floculação, adsorção e reação Fenton no tratamento de efluente de uma lavanderia industrial. **Química Têxtil**, v. 79, p. 36-44, 2005.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.

MISHRA, V.S. et al. Wet Air Oxidation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 2-48, 1995.

MO, M.H.; XU, C.K.; ZHANG, K.Q. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. **Mycopathologia**, v. 159, p. 381-387, 2005.

MOELLERING JR, R. C.; Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: **Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Práctice**. Euromédice. Ed. Médicas. 2000.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. Itália, **Chemosphere**, v.60, p. 636-643, 2005.

MURRAY, F.R., LATCH, G.C.M. AND SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and General Genetics**, v. 233, p.1-9. 1992.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzima: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NAMDHARI, B.S. et al. Decolorization of Reactive Blue MR, using *Aspergillus* species Isolated from Textile Waste Water. **ISCA Journal of Biological Sciences**, v. 1, n.1, p. 24-29, 2012.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends Biotechnology**, v. 23, p. 68, 2005.

NIEBISCH, C. H. et al.; Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v.180, p. 316-322, 2010.

NILSSON, R. et al. Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 50, p. 65-70, 1993.

NOVOTYNY, C. et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1545-1551, 2004.

NYANHONGO, G. O. et al. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, Oxford, v. 46, p. 1449-1456, 2002.

ONOFRE, S. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelos fungos *Nomurarea rileyi* (Farlow) Sanson. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.3, n. 1, p. 29-33, 1999.

ORTEGA, M. C. et al. Behaviour of different Horticultural species in phytotoxicity bioassays of bark substrates. **Scientia Horticulturae**, v. 66, p. 125-132, 1996.

PALÁCIO, S.M. et al. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. **Engevista**, v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 17-24, 2005.

PANDARD, P. et al. A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes, **Science Total Environmental**. v. 363, p. 114-125, 2006.

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Modification of Malachite Green by Fomes sclerodermeus and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 231, p. 205-209, 2004.

PASZCZYNSKI, A. et al. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3598-3604, 1992.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, n.29, p. 29-76, 2002.

PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; BOER, C. G. As principais oxirredutases de uso industrial. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto - SP: Editora Legis Summa Ltda. 2004, p. 161-184.

PERES, C. S.; ABRAHÃO, A. J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis- uma primeira abordagem. **Química nova**, v. 52, p. 22-39, 1998.

PETRINI, O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York. Springer Verlag. p.179-197, 1991.

PETRINI, O.; STONE J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p.789-796, 1982.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

RAMALHO, P. A. **Degradation of dyes with microorganisms: Studies with Ascomycete yeasts**. 2005. 100 f. Tese- Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2005.

REDDY, C. A. The potential of white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 320-328, 1995.

REVANKAR, M. S.; LELE, S.S. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp., WR-1, **Bioresource Technology**, v. 98, p. 775-780, 2007.

REZENDE, M.I. et al. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter (imazaquin). **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, vol.45, n.6, p.232-240, 2005.

REYS, L. F. **Estudo da degradação de Polietileno Tereftalato (PET) por Fungos Basidiomicetes Lignofílicos**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RICCI, M. S. F. et al. Cultivo orgânico de cultivares de café a pleno sol e sombreado **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4, p.569-575, 2006.

RINGBOM, A. Über die Genauigkeit der colorimetrischen Analysenmethoden **Zeitschrift für Analytische Chemie**, v.115, p. 115: 332, 1939.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 219-226, 2006.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Fems Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.

SAIKONEN, K. et al. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Evolution Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAIKKONEN, K. et al. Model systems in ecology: dissecting the endophyte–grass literature. **Trends Plant Science**, v.11, p. 428–433, 2006.

SALGADO, B.C.B. et al. Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H₂O₂). **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.1, p. 1-8, 2009.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.

SAUER, T. P. et al. Advanced oxidation processes applied to tannery wastewater containing direct Black 38 – Elimination and degradation kinetics. **Journal Hazardous Materials**, v. 31, p. 274-279, 2005.

SAURABH, C. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, v. 347, p. 46-52. 2005.

SHELLER, H. V; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, Emeryville, California, v. 61, p.263-289, 2010.

SCHULZ, B. BOYLE, C.; The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p.661-686, 2005.

SEABRA, P.N. Biorremediação se solos contaminados por petróleo e derivados. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2008. cap. 24, p. 547-570.

SEDIYAM, G. C. et al. Zoneamento agroclimático do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para o estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.9, n.3, p.501-509, 2001.

SINGER, R. **The Agaricales in Modern Taxonomy**. 4. ed. Germany: Koeltz Cientific Books, 1986.

SILVA, A. C. 2002. 126f. **Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

SLOKAR, Y. M.; LE MARECHAL, A. M. Methods of decolorization of textile wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, n. 4, p. 335-356, 1997.

SOBRERO, M. S.; RONCO, A. “**Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga**”. IN: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Ed., Chile. cap 4. 2004.

SOLEIMANI, M. et al. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. **Chemosphere**, v. 81, p.1084-1090, 2010.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2397-2401, 1992.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.4, p. 382-385. 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216. 1993.

STONE M. J.; WILLIAMS, D. H. On the evolution of functional secondary metabolites. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 29-34, 1992.

SVOBODOVÁ, K. et al. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 463-471, 2008.

STROBEL, G. A. et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**. v. 17, p. 417-423. 1999.

STROBEL, G.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews***, v.67, p. 491-502, 2003.

SVENSSON, B.M. et al. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. ***Environmental Monitoring and Assessment***, v. 102, n. 1-3, p. 309-321. 2005.

TAGHAVI, S. et al. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. ***PLoS Genetics***, v. 6, n. 1000943, 2010.

TAMBOLI, D. P. et al. Exploring the ability of *Sphingobacterium* sp. ATM to degrade textile dye Direct Blue GLL, mixture of dyes and textile effluent and production of polyhydroxyhexadecanoic acid using waste biomass generated after dye degradation. ***Journal of Hazardous Materials***, v. 182, p. 169-176, 2010.

TAN, Y. Q.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. ***Natural products Reports***, v. 18, p. 448-459, 2001.

TIEN, M., KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. ***Methods Enzymology***, v. 161, p. 238-249, 1988.

TORTORA G.J. et al. ***Microbiologia***. 8 ed. ArtMed. 200 ArtMed. 2005

TRUPKIN, S. et al. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, v. 30, p. 682-690, 2003.

TSVETNENKO, Y.; EVANS, L. Improved approaches to ecotoxicity testing of petroleum products. ***Marine Pollution Bulletin***, v. 45, p. 148-156, 2002.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. ***Bioresource Technology***, vol. 72, p. 169-183, 2000.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. ***Journal Biotechnology***, v. 41, p. 1-17, 1995.

VALERIANO, V.S. et al. Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 - xylidine and ethanol. ***Brazilian Journal of Microbiology***. v. 40, p. 790-794, 2009.

VANDERMEULEN, J. H.; FODA, A.; STUTTARD, C. Toxicity vs mutagenicity of some crude oils, distillates and their water soluble fractions. **Water Research**, v. 19, p. 1283-1289, 1985.

VAZOLLER, R. F. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável – Microbiologia e saneamento ambiental. In: **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Microbiologia ambiental. São Paulo: CETESB, 2001. 168 p.

VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUICHE, Y. S.; NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v. 21, p.217-233, 2010.

VERSTEEG, D. J. et al., Ceriodaphnia and daphnia: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, p. 869-892, 1997.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**, v.24, p. 305-311. 1992.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos resíduos têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, n. 17, p. 61-64, 2001.

ZEE, F. P. **Anaerobic azo dye reduction**. Tese de Doutorado. 2002. 142 f., Wageningen University Research Center, Wageningen, Holanda. 2002.

ZUCCARI, M.L. **A digestão pelo "calor de diluição" e a determinação da demanda química de oxigênio(DQO) em águas e efluentes**. Botucatu, 1996, 89p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 1996.

WANG, J. et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS-Microbiology Letters**, v. 193, p. 249-253. 2000.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.

WONG, Y.; YU, J. Laccase-catalyzed decoloration of synthetic dyes. **Water Research**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.

YESILADA, G.; CING, S.; ASMA, D. Decolourization of textile dye Astrazon Red FBL by *Funallia trogii* pellets. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 155-157, 2002.