

Ação de Micoflora de efluentes agroindustriais sobre diferentes corantes e substratos lignocelulósicos

Natalino Perovano Filho, Kelly Fernanda Seára da Silva e Ana Maria Queijeiro López*

Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Av. Lourival Melo Mota, s/n, 57072-970, Maceió, Alagoas, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: amql@qui.ufal.br

RESUMO. Enzimas extracelulares de fungos são importantes para sua sobrevivência em ambientes inhóspitos, sendo capazes de degradar compostos recalcitrantes. Fungos filamentosos secretam hidrolases e fenoloxidasas capazes de degradar complexos de estruturas aromáticas, como de alguns xenobióticos. O propósito deste trabalho foi testar diferentes corantes (Azul de Metileno, Azure B, Verde Malaquita e Cristal Violeta), em substituição ao composto Poly R478, no método de seleção de microrganismos degradadores de fenóis em meio sólido, além de comparar tal atividade de Micoflora isolada de efluentes de indústria sucroalcooleira com a de outros fungos adquiridos em coleção oficial. Os corantes testados revelaram-se ótimos substitutos do Poly R478. O isolado que apresentou atividade descolorante mais intenso do que a do diâmetro de seu crescimento (*Cladosporium* sp.) foi testado, então, em meio líquido frente a dois substratos naturais e um sintético (bagaço de cana, serragem de madeira e azul de metileno). Este removeu altas concentrações de glicídios redutores, proteínas e fenóis totais, além de reduzir a DQO em meio com serragem de madeira como substrato fenólico natural. Tal fungo, portanto, mostrou-se promissor para compor consórcios visando cometabolismo e biorremediação de efluentes nos quais há presença de compostos fenólicos ou outros recalcitrantes com estrutura semelhante à de lignina.

Palavras-chave: degradação biológica, fenoloxidasas, bagaço de cana, serragem de madeira, Azul de Metileno, *Cladosporium*.

ABSTRACT. Action of mycoflora from agri-industrial effluents on different dyes and lignocellulosic substrates. Extracellular enzymes of fungi are important for survival in inhospitable environments, as they are able to degrade recalcitrant compounds. Filamentous fungi secrete hydrolases and phenoloxidasas that are capable of degrading complexes of aromatic structures, such as certain xenobiotics. The purpose of this study was to test different dyes (methylene blue, Azure B, Malachite Green and Crystal Violet), replacing the compound Poly R478 in the method of selection of phenol decomposer microorganisms in solid medium, and compare this activity of the mycoflora of effluents from sugar-alcohol industry, to the ones of other fungi acquired in official collection. The tested dyes proved to be excellent substitutes for Poly R478. The isolate that showed more intense decolorant activity than the diameter of its growth (*Cladosporium* sp.) was then tested on two natural and one synthetic substrate (sugarcane bagasse, sawing wood, and methylene blue) in liquid medium. This isolate removed high concentrations of reducing sugars, proteins and total phenols, and reduced the COD in medium containing sawdust as natural substrate of phenols. This fungus, therefore, seems promising to form consortia for co-metabolism and bioremediation of effluents in which there is a presence of phenolic or other recalcitrant compounds with similar structure to lignin.

Keywords: biological degradation, phenol, sugarcane bagasse, sawing wood, methylene blue, *Cladosporium*.

Introdução

Os efluentes provenientes de atividades das agroindústrias, em especial as sucroalcooleiras, apresentam altos teores de sólidos em suspensão, matéria orgânica persistente ou não, e temperatura elevada. Tais características inviabilizam seu lançamento em corpos d'água e sua reutilização direta na indústria ou indireta na fertirrigação. Dentre as metodologias disponíveis, e que

apresentam menor razão custo/benefício, para o tratamento deste tipo de efluente está a que utiliza o potencial degradativo/biosortivo de microrganismos (fúngicos ou bacterianos) nativos ou inseridos nas lagoas para sua remediação (AKBAR; KHWAJA, 2006).

Os fungos secretam enzimas extracelulares para clivar complexos poliméricos e absorver nutrientes simples, sendo estas importantes não apenas a sua sobrevivência em ambientes extremos, mas para a

subsistência das demais comunidades do nicho trófico (GOPINATH et al., 2005). A produção desses catalisadores tem atraído um crescente interesse para o biotratamento de componentes de águas residuárias (moléculas inorgânicas, metais pesados e compostos orgânicos), seja pela remoção ou mesmo completa destruição-mineralização dessas substâncias (COULIBALY et al., 2002).

Os fungos filamentosos causadores de “podridão branca” de madeiras, por exemplo, são capazes de degradar compostos recalcitrantes, pois secretam fenoloxidasas como a Lacase (Lac), a Manganês-Peroxidase (MnP) e a Lignina-Peroxidase (LiP), todas envolvidas na oxidação de complexos de estruturas aromáticas, como alguns compostos xenobióticos (GILL et al., 2002; GLENN et al., 1983; MONDAL; PATI, 2000; TIEN; KIRK, 1983). Com isso, ensaios para a determinação da produção dessas enzimas têm sido relevantes para os estudos e estratégias de biorremediação.

O presente trabalho visou verificar a utilização de diferentes corantes como substitutos do composto Poly R478 no método de seleção de produtores de fenoloxidasas, uma vez que o corante não é mais comercializado, bem como avaliar a ação dos fungos isolados de efluentes de indústria sucroalcooleira sobre diferentes substratos, comparando com a de microrganismos causadores de “podridão branca” obtidos da coleção oficial de microrganismos.

Material e métodos

Isolamento, identificação e cultivo dos fungos

Inicialmente, isolados dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* Burds (CCT 1999) e *Geotrichum candidum* Link. & Pers. (CCT 1205) foram obtidos a partir de “slants” da coleção oficial de microrganismos da “Fundação André Tosello” (Campinas, São Paulo), sendo codificados como Gc e Pc. Em seguida, efetuou-se isolamento de novos fungos a partir de amostras de efluente (safra 2004/05) e turfa (safra 2005/06), oriundas da lagoa de decantação, da estação de tratamento de efluente (ETE) da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, localizada no município de Coruripe, no Estado de Alagoas.

Para cada amostra foram realizadas diferentes diluições em água destilada estéril. Inoculou-se uma alíquota (1 mL) dessas diluições em meio Ágar-Caldo de Cana (ACC - 25%), contido em placas de Petri, sendo a cultura incubada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. A repicagem individual das colônias dos fungos surgidos em ACC foi realizada em meio Ágar Sabouraud (AS) e Ágar-Extrato de Malte (AEM) e as novas culturas foram incubados ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro) por 15 dias. A identificação foi realizada por

meio das análises macroscópicas e microscópicas das estruturas fúngicas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Seleção de fungos produtores de fenoloxidasas em meio sólido

Utilizou-se o meio descrito por Dhoub et al. (2005), modificado de forma a apresentar a seguinte composição: 2 g de glicose (Vetec[®]); 2 g de tartarato de amônio (Vetec[®]); 2 g de extrato de malte (Acumedia[®]); 0,26 g de KH_2PO_4 (Vetec[®]); 0,26 g de Na_2HPO_4 (Vetec[®]); 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Vetec[®]); 0,01 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Vetec[®]); 0,0066 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Vetec[®]); 0,005 g de FeSO_4 (Vetec[®]); 0,005 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Vetec[®]); 0,02 mg de NaMoO_4 (Vetec[®]); 0,09 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Vetec[®]); 0,07 mg de H_3BO_3 (Vetec[®]); 0,1 g de Azul de Metileno (AM, Vetec[®]); 20 g de ágar; 1.000 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave (121°C , 1 atm, 20 min.), esse material foi vertido em placas de Petri solidificado e inoculado (em triplicata) pela disposição central de um disco de micélio crescido em AEM (7 mm de diâmetro, 15 dias) de cada isolado fúngico. O material foi incubado por sete dias a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (escuro).

A mesma composição basal do meio também foi utilizada, substituindo-se o azocorante AM por Verde Malaquita (VM, Vetec[®]), Cristal Violeta (CV, Vetec[®]) e Azure B (AB, Vetec[®]), para avaliar a ação dos fungos sobre tais substratos. A inoculação e incubação seguiram o mesmo protocolo já descrito. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e repetido três vezes.

Biomassa, concentração de glicídios redutores, proteínas, fenóis totais e DQO, e pH/conductividade em cultivos de *Cladosporium* sp. sobre diferentes substratos

Utilizou-se a composição basal do meio utilizado para a seleção de fungos produtores de fenoloxidasas, porém, isento de Ágar, e acrescentou-se ao mesmo 0,1 g de Azul de Metileno (AM) ou 1 g de bagaço de cana (BC), ou, ainda, de 1 g de serragem de madeira (coletada em marcenaria localizada no bairro Tabuleiro dos Martins, Maceió, Estado da Alagoas, em 2005). O BC foi coletado no processo de moagem da safra 2005/06 da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool. O objetivo foi avaliar a atividade de fenoloxidasas sobre esses três substratos.

Assim, a partir de uma cultura de *Cladosporium* sp. em meio sólido ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por 15 dias) obteve-se uma suspensão aquosa de conídios ($3,1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) e esta foi inoculada em 400 mL de cada meio (concentração final de $7,75 \times 10^4$ conídios mL^{-1}). As culturas em triplicata foram incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, em agitação orbital constante (100 rpm), no escuro.

A intervalos de tempo de 48h (0 - 144h), alíquotas de 50 mL dessas culturas foram retiradas e filtradas (0,45 μm). A biomassa seca presente nas membranas filtrantes foi mensurada por pesagem 12h após submetê-las a uma temperatura de 50°C, em estufa. Paralelamente, os filtrados foram estocados a 6 - 8°C para posterior determinação dos teores de glicídios redutores, proteínas e fenóis totais.

Os glicídeos redutores foram quantificados por meio do método do ácido dinitrosalicílico (DNSA, Vetec[®]) (MILLER, 1959) modificado. Assim, adicionaram-se 200 μL da solução reagente (0,25 g DNSA, 75 g tartarato de sódio e potássio, 50 mL NaOH 2M, 250 mL H₂O) a 200 μL das amostras de filtrado de culturas ou de solução padrão (D-glicose) em diferentes concentrações (0 - 2 mg D-glicose. mL⁻¹), para construção da curva-padrão. As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min. e, em seguida, diluiu-se cada uma delas para 5 mL, com água destilada. As absorvâncias foram determinadas a 570 nm.

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada de acordo com o Método do Biureto (LAYNE, 1957), no qual a coloração varia de rosa a púrpura, pelo complexo formado entre os íons de cobre e o nitrogênio das ligações peptídicas, sendo utilizado em substituição ao Método de Lowry, em virtude de interferências com os compostos fenólicos presentes nas amostras. A curva-padrão foi produzida variando-se a concentração de albumina de soro bovino (ASB, Vetec[®]) entre 0 e 7 mg mL⁻¹.

Para a determinação de fenóis totais preparou-se, previamente, uma curva-padrão de ácido gálico (Vetec[®]) variando-se a concentração com água destilada entre 0 e 500 μg mL⁻¹. Adicionaram-se, então, 150 μL da amostra dos filtrados das culturas ou das diluições de ácido gálico a 3 mL de Na₂CO₃ 2% (m v⁻¹, Vetec[®]), em agitação constante. Acrescentaram-se às misturas homogeneizadas 150 μL do reativo de Folin-Ciocalteu 2N (FOLIN; CIOCALTEU, 1927) diluído (1:1, v v⁻¹, Sigma[®]), sempre em agitação constante. Após 30 min. de repouso, efetuou-se a leitura das absorvâncias a 750 nm (BRAY; THORPE, 1954).

Além disso, o meio líquido AM também foi monitorado quanto às alterações de pH e condutividade ao longo do cultivo. Para tanto, foi distribuído (20 mL) em tubos Falcon, esterilizado e inoculado com a suspensão de *Cladosporium* sp. originando culturas com 1×10^4 conídios mL⁻¹. Estas foram incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, em agitação constante (100 rpm), no escuro, e a biomassa seca foi mensurada a diferentes intervalos de tempo (0, 24,

48, 72, 96 e 120h), conforme descrito acima. Os filtrados destes novos cultivos foram estocados a 6 - 8°C para posterior análise do decaimento da absorvância do corante, por leituras espectrofotométricas a 500 nm (espectrofotômetro Femto[™], modelo 800 XI), ao longo do tempo. Além disso, monitoraram-se o pH (pHmetro Químis[™] modelo Q-400A) e a condutividade elétrica (condutivímetro Instrutherm[™] modelo CD-840) dos filtrados das culturas.

Resultados e discussão

Seleção de fungos produtores de fenoloxidasas em meio sólido

Além dos dois isolados fúngicos obtidos de coleção oficial de microrganismos (GC e PC, respectivamente *G. candidum* e *P. chrysosporium*), oito outros fungos foram isolados de amostras de efluente das lagoas de decantação da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool (o isolado 2A, identificado como *Mucor* sp.) ou de amostras de turfa das referidas lagoas [isolados XXI (*Cladosporium* sp.), G2 (*Penicillium* sp.), BF (*Trichosporon* sp.), C1 (*Aspergillus* SP.), E1 (*Aspergillus* sp.), O1 (*Penicillium* sp.) e V1 (não identificado)].

O teste de seleção realizado foi uma modificação da metodologia descrita por Dhoub et al. (2005), na qual os autores verificaram que microrganismos produtores de fenoloxidasas alteram a coloração do corante Poly R-478 de roxo para amarelo, ou descolorem completamente o mesmo pela clivagem do anel aromático. A substituição pelo Azul de Metileno baseou-se no trabalho desenvolvido por Ferreira-Leitão et al. (2003), no qual os autores o utilizaram para determinar a atividade da lignina-peroxidase (LiP) e verificaram que o mesmo oxidava o corante, levando à descoloração do meio pela clivagem do anel aromático. Os mesmos autores ainda testaram o corante Azure B, constatando o mesmo processo. Por outro lado, Cha et al. (2001) e Bumpus e Brock (1988) utilizaram respectivamente Verde Malaquita e Cristal Violeta com o mesmo propósito, obtendo resultados positivos. Dessa forma, os quatro corantes foram incluídos no teste de seleção de fenoloxidasas.

Os resultados contrastam com estudos de Muthezhilan et al. (2008), no qual os autores isolaram espécies de 17 gêneros de fungos a partir de efluentes de indústria têxtil, e testaram sua atividade descolorante de vários corantes em meio sólido com ágar e minerais, e constataram que isolados de *Mucor racemosus* e *Cladosporium cladosporioides*, além de *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma viride* não agiram sobre qualquer dos corantes utilizados neste

trabalho, mas em meio líquido com os mesmos compostos e caldo Czapek-Dox ocorreu a redução da coloração basicamente pela adsorção ao micélio, ao invés da degradação biológica.

Claus e Filip (1998) já haviam relatado que *C. cladosporioides* isolado a partir de águas de um lago de turfa, com concentrações de 333 mM de carbono e 12 mM de nitrogênio, produzia lacase e apresentava alta atividade lignolítica, e que após adição de riverina ou substâncias húmicas, oriundas de mananciais, no meio de cultura (1 mg mL⁻¹), o fungo demonstrava capacidade de consumir 60% das mesmas. A exata quantidade de degradação, contudo, não foi elucidada pelos autores em face da adsorção de parte dessas substâncias pelo micélio fúngico. No reisolamento dos compostos húmicos, no entanto, surgiram menos moléculas com anéis aromáticos e mais moléculas com estruturas alifáticas, e a enzima bruta da cultura mostrou baixa atividade em degradar os humatos, mas esta descoloração aumentou para mais de 50% quando se utilizou uma preparação de lacase pura (proveniente de *Polyporus versicolor*), especialmente na presença de um mediador redox.

A Tabela 1 ilustra a descoloração dos corantes testados pelos fungos utilizados no presente trabalho. Com base no ensaio do crescimento em meios com 0,01% dos corantes Azul de Metileno, Verde Malaquita, Cristal Violeta ou Azure B, apenas o isolado do gênero *Cladosporium* produziu halo de descoloração dos corantes para além do tamanho de suas colônias no período de incubação. Por isso, foi selecionado para os demais testes.

Tabela 1. Descoloração pelos isolados fúngicos de micoteca oficial ou de amostras de efluentes e turfa da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05 e 2005/06), em meios de cultura com diferentes corantes (sete dias de incubação a 28 ± 2°C, escuro). Os valores entre parênteses referem-se ao tamanho médio das colônias e dos halos de descoloração (mm).

Isolados	Diâmetro da colônia; Halo de descoloração além da colônia (mm)			
	Azure B (tiazínico)	Azul de Metileno (tiazínico)	Cristal Violeta (triarilmetano)	Verde Malaquita (triarilmetano)
XXI (<i>Cladosporium</i> sp.)	+(12,0; 1,5)	+(12,0; 2,0)	+(12,0; 2,2)	+(11,5; 1,5)
2A (<i>Mucor</i> sp.)	SC	SC	SC	SC
BF (<i>Trichosporon</i> sp.)	-	-	-	-(13,2; 0)
Pc (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	SC	SC	SC	SC
Gc (<i>Geotrichum candidum</i>)	SC	SC	SC	-(35,1; 0)
O1 (<i>Penicillium</i> sp.)	*(23,3; 0)	*(23,4; 0)	SC	SC
E1 (<i>Aspergillus</i> sp.)	SC	SC	SC	SC
C1 (<i>Aspergillus</i> sp.)	SC	SC	SC	SC
G2 (<i>Penicillium</i> sp.)	SC	SC	*(22,3; 0)	*(45,6; 0)
V1 (não identificado)	SC	SC	SC	SC

+ = Descoloração sob e além do diâmetro da colônia; SC = sem crescimento; - = crescimento sem descoloração; * = Descoloração apenas sob a colônia.

A descoloração de corantes por Lignina-peroxidases e Lacases, por exemplo, é amplamente

conhecida, especialmente em fungos basidiomicetos. Em estudos de Heinfling et al. (1997), 18 fungos capazes de degradar materiais lignocelulósicos e derivados de lignina foram testados quanto à sua capacidade de descolorir os azocorantes Laranja Reativo 96, Violeta Reativo 5 e Preto Reativo 5. Dentre eles, apenas *P. chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* e *Trametes versicolor* apresentaram ação positiva. Gill et al. (2002), igualmente, testaram a ação descolorante de nove isolados de fungos da “podridão branca”, conhecidos por sua capacidade lignolítica, sobre os corantes Verde Brilhante, Vermelho de Cresol, CV, Vermelho Congo e Laranja II. Constataram que *Dichomitus squalens*, *Phlebia fascicularia* e *P. floridensis* degradaram esses compostos em meio sólido, e em meio líquido limitado em nitrogênio estes foram mais eficientes que *P. chrysosporium*. Além disso, Claus et al. (2002) verificaram que embora alguns basidiomicetos sintetizem lacases com capacidade de descolorir altas taxas de corantes derivados de antraquinonas, o azocorante Vermelho Congo é um indutor fraco das mesmas. Isso significa que apenas a capacidade genética para a síntese da enzima não é suficiente, mas sim a interação do fungo com substâncias que promovam sua expressão. Kamida et al. (2005), por exemplo, verificaram que o pico de produção de lacases e peroxidases por um basidiomiceto (*Pleurotus sajor-caju*) obtido da ETE de uma indústria têxtil em Americana, Estado de São Paulo, sobre efluente com corante índigo, deu-se no nono dia de incubação, e a descoloração total do efluente se deu no 14º dia de incubação, sugerindo que inicialmente é necessário secretar lacases para, em seguida, detectar-se seu efeito sobre o corante.

No presente trabalho, o fungo da “podridão branca” *P. chrysosporium*, obtido em micoteca oficial, sequer cresceu nos meios com os diferentes corantes testados, evidenciando que o contraste de resultados esperados para basidiomicetos pode ocorrer também com espécies não conhecidas como lignolíticas, como alguns ascomicetos e deuteromicetos, como *Trichoderma* sp. e *Cladosporium* sp., que também podem produzir enzimas descolorantes (ASSAVANIG et al., 1992; BOLLAG; LEONOWICZ, 1984; POTIN et al., 2004).

Claus e Filip (1998) relataram que um isolado de *C. cladosporioides*, proveniente de águas de um lago de turfa (concentrações de 333 mM de carbono e 12 mM de nitrogênio), produziu lacase e apresentou alta atividade lignolítica. Após adição de riverina ou substâncias húmicas oriundas de mananciais, ao meio de cultura (1 mg mL⁻¹) desse fungo, o mesmo consumiu 60% das mesmas. A exata quantidade de degradação, contudo, não foi

elucidada pelos autores em face da adsorção de parte dessas substâncias pelo micélio fúngico. No isolamento dos compostos húmicos, no entanto, surgiram menos moléculas com anéis aromáticos e mais moléculas com estruturas alifáticas, e a enzima bruta da cultura mostrou baixa atividade em converter os humatos, mas esta descoloração aumentou para mais de 50% quando se utilizou lacase pura oriunda de *Polyporus versicolor*, especialmente na presença de um mediador redox.

Testes com 17 gêneros de fungos, isolados de efluentes de indústria têxtil, e cultivados em meio sólido com minerais e vários corantes, revelaram que *C. cladosporioides*, *Penicillium oxalicum*, *Mucor racemosus* e *Trichoderma viride* não descoloriram os substratos. Por outro lado, isso ocorreu em caldo Czapek-Dox com tais compostos, e os autores do estudo atribuíram a remoção da coloração principalmente à capacidade de adsorção do micélio desses fungos (MUTHEZHILAN et al., 2008).

Potin et al. (2004) verificaram que *Cladosporium sphaerospermum* isolado de solos de uma antiga usina de gás, foi capaz de degradar em média 23% de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), inclusive de alto peso molecular, em experimento piloto com solo inoculado e incubado por quatro semanas. Em cultura líquida, tal fungo degradou rapidamente benzo (a) pireno durante o início de seu crescimento exponencial (18% após quatro dias de incubação), e entre as atividades de enzimas extracelulares ligninolíticas testadas, somente a lacase foi detectada na ausência ou na presença de benzo(a) pireno no caldo de cultivo.

Estudos de Vijaykumar et al. (2006) demonstraram que *C. cladosporioides* isolado de amostras de carvão descoloriu cinco diferentes corantes azo e trifenilmetano (Azul Ácido 193, Preto Ácido 210, CV, Preto reativo B(S) e Preto reativo BL/LPR), tanto em meio sólido quanto em meio líquido. O sobrenadante filtrado de cultivo desse fungo em caldo, por si só descoloriu o corante Azul Ácido 193, e quando o cultivo foi acrescentado reiteradas vezes do corante (de um total de 700 mg L⁻¹, após 168h, baixou para 564 mg L⁻¹), não houve diminuição significativa nessa atividade, o que demonstrou não só a resistência desse fungo a uma elevada concentração do corante, mas a ação de suas enzimas extracelulares nessa função. Os padrões físico-químicos ótimos para tal atividade foram 40°C de temperatura, pH = 5,6 e 4% de sacarose. As enzimas purificadas no meio foram manganês-peroxidase (41 U L⁻¹) e lacase (1413 U L⁻¹), enquanto a atividade de lignina peroxidase foi insignificante mesmo após oito dias de incubação.

Biomassa, concentração de glicídios redutores, proteínas, fenóis totais e DQO, e pH/conductividade em cultivos de *Cladosporium* sp. sobre diferentes substratos

Com relação à taxa de crescimento do fungo *Cladosporium* sp. nos meios avaliados (Figura 1a), o melhor desenvolvimento ocorreu no meio contendo serragem de madeira (SM), seguido pelo meio contendo bagaço de cana (BC). É provável que nesses meios o fungo possa produzir mais enzimas lignocelulolíticas, apresentando maior concentração de monômeros energéticos, porém, no meio que continha AM houve crescimento menos expressivo e as concentrações de glicídios redutores (Figura 1b) e proteínas totais (Figura 1c), além de DQO (Figura 2b), é que foram gradualmente reduzidas ao longo do tempo.

Assim, verificou-se pouco consumo de glicídios redutores pelo isolado de *Cladosporium* sp. nas primeiras 48h de incubação em meio AM (Figura 1b), possivelmente pela adaptabilidade do isolado à substância recalcitrante (Azul de Metileno) (KONONOVA; NESMEYANOVA, 2002). Após esse período, o consumo desses glicídios foi contínuo. Contudo, nas culturas em BC e SM, com crescimento mais expressivo do fungo, observou-se lenta remoção de glicídios redutores (Figura 1b) entre 0 e 48h, e depois, mais acentuada entre 96 e 144h, embora não no mesmo patamar ocorrido na cultura com AM.

É provável que, ao produzir lignocelulases nos meios com fontes naturais de lignocelulose (BC e SM), este isolado de *Cladosporium* sp. dispôs de maior concentração de monossacarídeos, apresentando uma concentração total de glicídios redutores proporcionalmente maior do que no meio AM, especialmente entre 48 e 96h de cultivo, período considerado estacionário do crescimento em AM, mas progressivo nos demais meios.

Por outro lado, a remoção de proteínas totais (Figura 1c) no meio AM foi progressiva ao longo do tempo de cultivo, indicando que o fungo possivelmente consumiu mais compostos nitrogenados do que secretou nesse período em termos de enzimas extracelulares. Porém, nas culturas com BC e SM ocorreu aumento da concentração desses compostos, especialmente entre 48 e 96h, exatamente na maior faixa de seu crescimento.

Kerem et al. (1992) relataram que, ao longo do tempo de cultivo em material lignocelulósico, os fungos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* secretaram proteínas solúveis. Alborés et al. (2006) também verificaram aumento na concentração de proteínas ao longo de 14 dias de cultivo de *Pleurotus* spp. em resíduos agroindustriais.

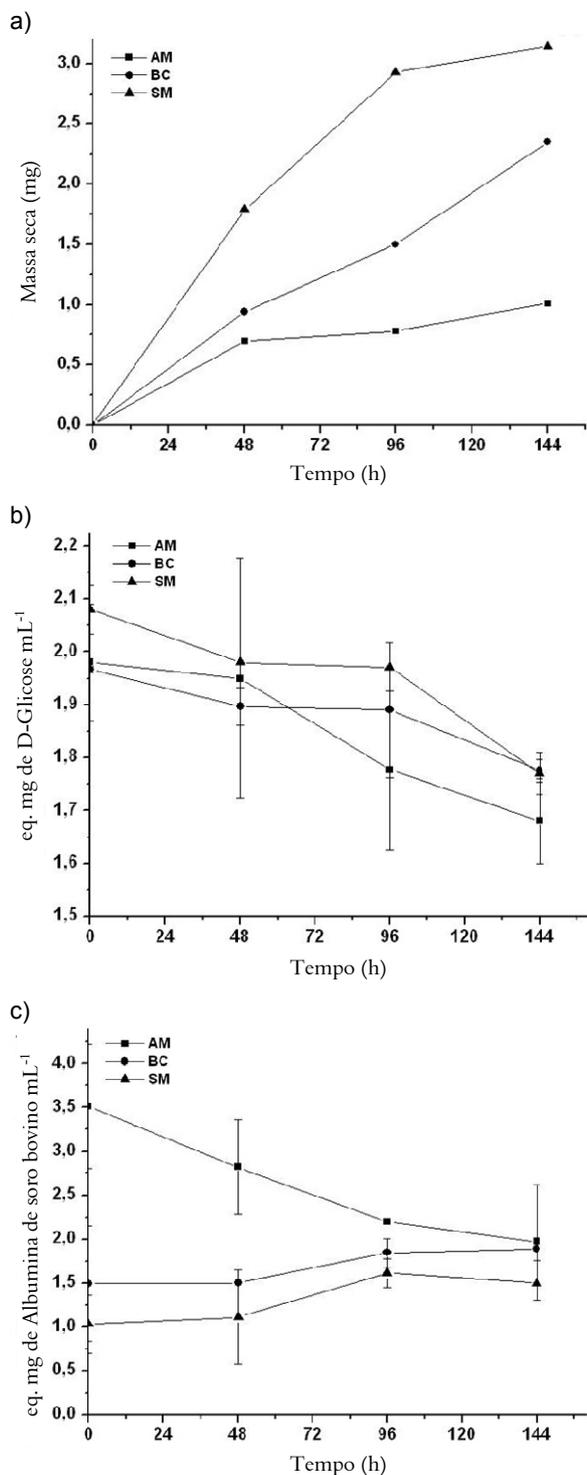


Figura 1. Cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp.), obtido de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios com diferentes fontes (Azul de Metileno-AM, bagaço de cana-BC e serragem de madeira-SM), a 100 rpm, 30 ± 2°C, no escuro. a) Massa seca; b) Consumo de glicídios redutores totais e c) Concentração de proteínas totais.

Por outro lado, as culturas de *Cladosporium* sp. sobre SM reduziram drasticamente a concentração de fenóis totais (Figura 2a) e DQO (Figura 2b) entre 96 e 144h

de incubação, o que pode indicar a produção de uma ou mais fenoloxidasas capazes de degradar resíduos de lignina. Além disso, também houve consumo de glicídios redutores e aumento de proteínas. A remoção de fenóis nas culturas com BC (Figura 2a) foi muito baixa, indicando que nesse meio não ocorreu alta taxa de degradação de compostos fenólicos durante todo o intervalo de incubação estudado. Por outro lado, a remoção da DQO (Figura 2b) nessas culturas foi maior entre 0-96h de incubação. As taxas de redução de DQO foram de 46,4; 30,8 e 21,4%, respectivamente sobre SM, AM e BC (Figura 2b).

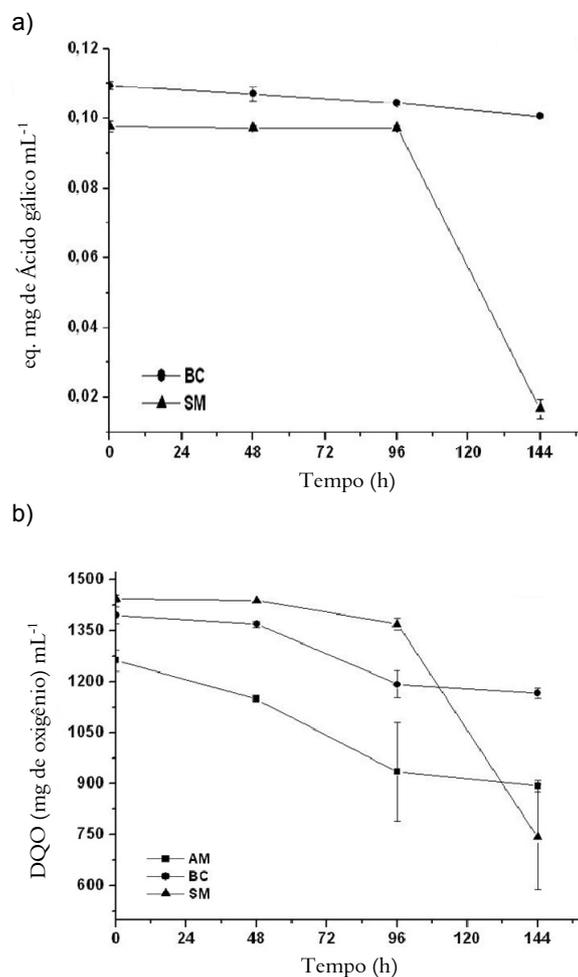


Figura 2. Cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp.), obtido de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05), em meios com diferentes fontes (Azul de Metileno-AM, bagaço de cana-BC e serragem de madeira-SM), a 100 rpm, 30 ± 2°C, no escuro. a) Concentração de fenóis totais (eq. mg ácido gálico mL⁻¹); b) Concentração de DQO.

Em escala piloto, Ragunathan e Swaminathan (2004) estudaram a habilidade dos fungos *Pleurotus sajor-caju*, *P. platypus* e *P. citrinopileatus* em reduzir a DQO de efluente de indústria papeleira, verificando

que *P. ostreatus* apresentou o melhor desempenho, isto é, removeu 61,3% da DQO em dez dias de tratamento. Wu et al. (2005) também estudaram o tratamento de efluente de indústria de papel, porém avaliaram o efeito individual de cinco fungos da “podridão branca” (*P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *Lentinus edodes*, *T. versicolor* e o isolado S22) sobre a DQO, e a máxima eficiência na redução da mesma (cerca de 48%) foi obtida pelos fungos *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*, aos dez dias de cultivo.

Comparando-se os dados de remoção obtidos pelo isolado estudado de *Cladosporium* sp. estudado com os obtidos pelos fungos acima citados, verifica-se que o primeiro apresenta bom desempenho na redução de DQO, uma vez que nos ensaios realizados consideraram-se apenas seis dias de cultivo.

Chávez-López et al. (2005) cultivaram *C. cladosporioides* em meio líquido com ou não fenantreno, verificando que o fungo produziu lacase nas duas condições, porém, na ausência de fenantreno a atividade enzimática máxima ocorreu 84h após a inoculação (1,01 U g⁻¹ de peso seco), e, nas culturas com esse composto a atividade máxima da lacase foi maior e ocorreu com 72h de incubação (3,09 U g⁻¹ de peso seco).

As Figuras 3a e 3b ilustram a biomassa, o decréscimo da cor, a condutividade elétrica e o pH dos filtrados das culturas de *Cladosporium* sp. em meio líquido AM. Observou-se que assim que ocorreu adaptação à substância recalcitrante (AM) na presença de outros nutrientes (KONONOVA; NESMEYANOVA, 2002), ocorreu descoloração das culturas (Figura 3a), especialmente a partir de 96h, quando a biomassa cresceu e atingiu seu pico. Isso indica que esse fungo tem potencial para ser utilizado no tratamento de remoção de corantes de efluentes, quando utilizado juntamente com os demais nutrientes para seu desenvolvimento (KONONOVA; NESMEYANOVA, 2002).

A condutividade elétrica (Figura 3b) das culturas de *Cladosporium* sp. em meio AM diminuiu durante as primeiras 48h de cultivo, elevando-se ligeiramente até 72h, e permanecendo constante a partir de então. Segundo Kapich et al. (1999), durante a ação de enzimas lignolíticas, espécies radiculares intermediárias são formadas, o que está relacionado com o aumento temporário de íons e, portanto, da condutividade (KAPICH et al., 1999). Da mesma forma, o pH das culturas de *Cladosporium* sp. em AM (Figura 3b) diminuiu mais expressivamente nas 48h iniciais de incubação, bem como após 96h.

Yesilada et al. (1998) também observaram decréscimo do pH nas primeiras 48h de cultivo de *Coriolus versicolor* em meio com o corante *Orange II*, seguindo-se um ligeiro aumento desse pH até 72h.

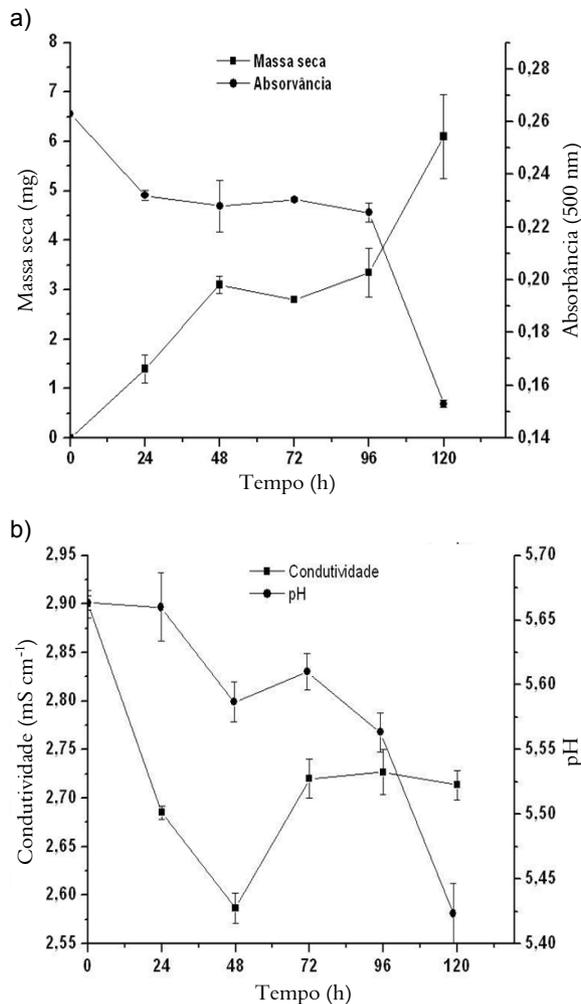


Figura 3. Cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp.) obtido de amostras de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (2004/05) em meio líquido com Azul de Metileno [em agitação (100 rpm) a 30 ± 2°C, no escuro]. a) Massa seca e absorvância (500 nm); b) Condutividade Elétrica e pH.

Conclusão

O Azul de Metileno, bem como os corantes Azure B, Cristal Violeta e Verde Malaquita, revelaram-se ótimos substitutos do corante Poly R478 na seleção de fungos produtores de fenoloxidasas, permitindo selecionar o fungo com maior potencial para descoloração.

Os testes com três substratos diferentes revelaram que o fungo *Cladosporium* sp. removeu teores de glicídios redutores, proteínas, fenóis totais e DQO, sugerindo-se que este pode ser indicado na remoção de compostos fenólicos de resíduos como efluentes agroindustriais.

O mesmo isolado mostrou-se promissor para compor consórcios visando a biorremediação de efluentes com compostos lignolíticos ou outros compostos recalcitrantes semelhantes.

Agradecimentos

Aos convênios entre a S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool e a Finep - CTHidro/CNPq e BNB-Fundeci, pelos auxílios à pesquisa financiando o projeto, e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo dos dois primeiros autores.

Referências

- AKBAR, N. M.; KHWAJA, M. A. **Study on effluents from selected sugar mills in Pakistan**: potential environmental, health, and economic consequences of an excessive pollution load. Islamabad: Sustainable Development Policy Institute, 2006.
- ALBORÉS, S.; PIANZZOLA, M. J.; SOUBES, M.; CERDEIRAS, M. P. Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus* spp for its use as ruminant feed. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 215-220, 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley and Sons, 1996.
- ASSAVANIG, A.; AMORNKITTICHARON, B.; EKPAISAL, N.; MEEVOOTISOM, V.; FLEGEL, T. W. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 198-202, 1992.
- BOLLAG, J. M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.
- BRAY, H. G.; THORPE, W. V. Analysis of Phenols Compounds of Interest in Metabolism. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 1, n. 1, p. 27-52, 1954.
- BUMPUS, J. A.; BROCK, B. J. Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1143-1150, 1988.
- CHA, C.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of Malachite Green by the Fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4358-4360, 2001.
- CHÁVEZ-LÓPEZ, R.; PETERSON, M. S.; BROWN-PETERSON, N. J. A.; MORALES-GOMEZ, A.; FRANCO-LOPEZ, J. Ecology of the Mayan cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* Gunther, in the Alvarado lagoonal system, Veracruz, México. **Gulf and Caribbean Research**, v. 16, n. 2, p. 123-132, 2005.
- CLAUS, H.; FILIP, Z. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 26, n. 3, p. 180-185, 1998.
- CLAUS, H.; FABER, G.; KOENIG, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 672-678, 2002.
- COULIBALY, L.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S. N. A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecule-

laden wastewater pretreatment under sewer conditions by *Aspergillus niger*. **Water Research**, v. 36, n. 16, p. 3941-3948, 2002.

DHOUIB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; H'MIDI, R.; LABAT, M.; SAYADI, S. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities form Tunisian biotopes. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 431-436, 2005.

FERREIRA-LEITÃO, V. S.; SILVA, J. G.; BON, E. P. S. Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II e class III peroxidases. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 42, n. 2, p. 213-221, 2003.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

GILL, P. K.; ARORA, D. S.; CHANDER, M. Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 201-203, 2002.

GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; MAYFIELD, M. B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M. H. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 114, n. 3, p. 1077-1083, 1983.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.

HEINFLING, A.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 261-266, 1997.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 461, n. 1, p. 115-119, 1999.

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1121-1127, 1992.

KONONOVA, S. V.; NESMEYANOVA, M. A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 184-195, 2002.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods of measuring proteins. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1957. p. 447-454.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

- MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 223-232, 2000.
- MUTHEZHILAN, R.; YOGANANTH, N.; VIDHYA, S.; JAYALAKSHMI, S. Dye degrading mycoflora from industrial effluents. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 204-208, 2008.
- POTIN, O.; VEIGNIE, E.; RAFIN, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from a aged PAH contaminated soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 2004.
- RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Pleurotus* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 389-393, 2004.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v. 221, n. 4611, p. 661-663, 1983.
- VIJAYKUMAR, M. H.; VEERANAGOUDA, Y.; NEELAKANTESHWAR, K.; KAREGOUDAR, T. B. Decolorization of 1:2 metal complex dye Acid blue 193 by a newly isolated fungus, *Cladosporium cladosporioides*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 157-162, 2006.
- WU, J.; XIAO, Y.; YU, H. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 12, p. 1357-1363, 2005.
- YESILADA, O.; ÖZCAN, B. Decolorization of Orange II dye with the crude culture filtrate of white rot fungus *Coriolus versicolor*. **Turkish Journal of Biology**, v. 22, n. 4, p. 463-476, 1998.

Received on January 22, 2009.

Accepted on November 6, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.