MARINA BIANCHINI DE SALVI

OTIMIZAÇÃO DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM ORGANOCLORADOS UTILIZANDO BASIDIOMICETOS EM BIORREATORES

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2013

MARINA BIANCHINI DE SALVI

OTIMIZAÇÃO DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM ORGANOCLORADOS UTILIZANDO BASIDIOMICETOS EM BIORREATORES

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. DÁCIO ROBERTO MATHEUS

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Salvi, Marina Bianchini
S184o Otimização de biorremediação de solo contaminado com organoclorados utilizando basidiomicetos em biorreatores / Marina Bianchini Salvi -- São Paulo, 2013.
189 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013.
Bibliografia.

1. Biorremediação. 2. Aeração. 3. Lentinus crinitus. I. Título

CDU: 579

Aos meus pais Claulino e Neusa,

Ao meu amado e companheiro Marco Antônio,

Aos meus queridos sobrinhos Enzo e Henrique.

DEDICO

"Nunca considere os seus estudos uma obrigação, mas sim uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual o seu futuro trabalho pertence".

(A. Einstein)

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus pela oportunidade de vivenciar experiências inesquecíveis!!!

Aos principais responsáveis por tudo na minha vida, meus pais, Claulino e Neusa, que nunca deixaram que desistisse dos meus objetivos, sempre me apoiando, incentivando, e insistindo na minha caminhada. AMO VOCÊS!!!

Ao meu companheiro, amigo, incentivador e AMOR Marco Antônio (Marcão).

Às minhas irmãs, Camila e Lara e ao meu cunhado Roberto que apesar das brigas e discussões, sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram. Muito Obrigada e Amo vocês!!!!

Ao meu "pequeno" e precioso amor Enzo e ao mais novo membro da família que está a caminho Henrique!!!

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus, pelos ensinamentos, convívio, exemplo de pessoa e profissional e por ter acreditado em mim durante estes 10 anos de aprendizado. Muito Obrigada!!

À Dra. Vera Maria Valle Vitali, pela preciosa ajuda e ensinamentos durante todo o desenvolvimento do trabalho. Muito Obrigada!!!

Aos meus queridos amigos científicos e companheiros de projeto que mesmo longe fizeram parte da minha jornada científica: Dra. Kátia Maria Gomes Machado, Nara Ballaminut, Ricardo Ribeiro da Silva, Glauciane Danusa Coelho, Sérgio Luiz Moreira Neto, e William Seiti Okada,

À Luciana Jandelli Gimenes e Thiara Bento Siqueira que estiveram presentes durante toda a realização deste projeto, incentivando, colaborando, ajudando e pelas conversas na hora do almoço e cafezinho.

Ao querido amigo Leandro Gonçalves pela imensa e preciosa ajuda na montagem do sistema de aeração dos biorreatores e na montagem dos experimentos.

Aos meus avós maternos, Dionísio (*in memorian*) e Dilce, pelo exemplo de vida e por sempre me acolherem carinhosamente em sua casa para minhas tardes de estudo. Amo vocês!!!

Aos meus queridos primos e companheiros de bagunça: Ricardo, Gustavo, Fernando, Guilherme, Marília, Vladimir, Luiz Paulo, Luiz Henrique, Heloisa e Gabriela.

Aos agregados, mas que já fazem parte da família: Gislaine, Monique, Aline, Rafael (Minhoca), Rafael (Índio) e minha querida amiga desde a faculdade Giuliana.

Aos novos integrantes da família que são responsáveis por grandes momentos de alegria: Vitor, Gabriel e Pietro.

A todos da minha família que de alguma forma contribuíram para meu aperfeiçoamento. MUITO OBRIGADA!!!

Aos amigos e colegas que fiz durante esses anos no Núcleo de Pesquisa em Micologia: Alexandra Lenk Gomes, Carolina G. Moreira, Fernanda Karstedt, Priscila da Silva, Maíra Cortellini Abrahão, Cristiane Nascimento e Nelson Menolli Júnior.

Aos pesquisadores e professores da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de SP, Dra. Adriana de Mello Gugliotta, Dra. Carmem Lídia Amorim Pires-Zottarelli, Dra. Iracema Helena Schoenlin-Crusius, Dra. Marina Capelari, Dr. José Ivanildo de Souza, Ms. Michel Navarro Benatti e Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela utilização de suas instalações e equipamentos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado pelo programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

À Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG, através de convênio com Rhodia do Brasil Ltda, pelo apoio financeiro para a execução dos trabalhos.

A Dra Elen Aquino Perpétuo e Marcela dos Passos Galluzzi Baltazar do Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA/USP), pela colaboração nas análises cromatográficas.

ÍNDICE

RESUMO..... vi

ABSTRACT..... viii

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1. Resíduos organoclorados..... 5

1.1.1. Hexaclorobenzeno..... 7

1.2 Fungos de podridão branca e sua aplicação em biorremediação de organoclorados..... 10

1.3. Enzimas ligninolíticas..... 14

1.3.1. Lignina Peroxidase (LiP)..... 15

1.3.2. Manganês Peroxidase (MnP)..... 16

1.3.3. Lacase 18

1.4. Efeitos da adição de óleos vegetais e surfactantes na biorremediação..... 19

1.5. Biorreatores..... 21

1.6. Biorremediação: aspectos gerais e fatores que afetam o processo..... 23

1.6.1. Aeração 24

1.6.2. Nutrientes 25

1.6.3. Umidade do solo 26

1.6.4. Potencial hidrogeniônico 27

1.6.5. Temperatura do solo 28

2. JUSTIFICATIVA..... 29

3. OBJETIVOS..... 30

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 31

4.1. Solo..... 31

4.2. Capacidade máxima de retenção de água (CMRA)..... 32

4.3. Biorreatores..... 33

4.4. Material biológico..... 34

4.5. Preparo do inóculo fúngico..... 35

4.5.1. Pré inoculo..... 35

4.5.2. Susbstrato sólido..... 36

4.6. Preparo do solo contaminado para tratamento biológico..... 37

4.7. Condições de cultivo e biodegradação dos organoclorados..... 37

4.7.1. Processos de aeração na biorremediação *ex-situ* de solos contaminados com organoclorados..... 37

4.7.2. Influência dos ácidos graxos insaturados e da concentração dos organoclorados do solo na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611..... 38

4.7.3. Efeito da emulsão de óleo vegetal e surfactante na biodisponibilidade dos organoclorados no solo..... 39

4.8. Amostragens e análises do solo..... 40

4.8.1. Crescimento fúngico..... 41

4.8.2. Determinação do ergosterol..... 42

4.8.3. Isolamento dos basidiomicetos..... 42

4.8.4. Potencial hidrogeniônico do solo..... 42

4.8.5. Determinação da umidade do solo..... 43

4.8.6. Atividades enzimáticas..... 43

4.8.6.1. Obtenção do extrato enzimático..... 43

4.8.6.2. Atividades enzimáticas no extrato obtido de substrato sólido..... 43

4.8.6.2.1. Oxidação total do ABTS..... 43

4.8.6.2.2. Lacase..... 44

4.8.6.2.3. Peroxidase..... 44

4.8.6.2.4. Peroxidase dependente do manganês (MnP)..... 44

4.8.7. Monitoramento do teor de oxigênio do solo..... 45

4.8.8. Monitoramento da temperatura do solo..... 45

4.8.9. Determinação da microbiota do solo (contagem de UFC de fungos e bactérias)..... 45

4.8.10. Quantificação dos organoclorados..... 46

4.9. Análise estatística..... 47

ARTIGO I

Processos de aeração na biorremediação *ex-situ* de solos contaminados com organoclorados

Resumo..... 49

Abstract..... 50

Introdução..... 51

Material e métodos..... 54

Resultados e discussão..... 59

Referências bibliográficas..... 79

ARTIGO II

Influência dos ácidos graxos insaturados e da concentração dos organoclorados do solo na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611

Resumo..... 90

Abstract..... 91

Introdução..... 92

Material e métodos..... 95

Resultados e discussão..... 100

Referências bibliográficas..... 119

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 130

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 134

ANEXOS..... 158

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação de compostos organoclorados em solo, principalmente o hexaclorobenzeno (HCB), em biorreatores com capacidade de 10 Kg e a eficiência da aeração pressurizada, os efeitos de ácidos graxos insaturados e da concentração dos compostos organoclorados do solo na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611. O solo contaminado (10643,81 mg HCB Kg^{-1} solo e 1550,24 mg PeCB Kg^{-1} solo) com organoclorados foi esterilizado com benomyl (10mg Kg^{-1} solo). Lotes de 9 Kg de solo (seco) foram transferidos para biorreatores onde foram incorporados 2,5% de gesso comercial (peso seco) e 900 mg de *L. crinitus* (peso seco), crescido em bagaço de cana misturado com farinha de soja e fécula de mandioca nas proporções de 20 e 30% (peso seco). Foram realizados 2 experimentos, sendo que as condições de cultivos analisadas no primeiro experimento foram: 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) com injeção de ar pressurizado (0,2 Bar) e 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) com revolvimento semanal do solo, e no segundo experimento as condições de cultivo foram: 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p), utilizado como controle, 2 reatores com 8% de uma emulsão de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) e 2 reatores com solo contaminado diluído com solo branco (1:10 p/p) para diminuição da concentração inicial dos organoclorados. E em todos os reatores foi injetado ar pressurizado (0,2 Bar). Foi instalado um sensor de temperatura nos biorreatores e uma sonda para medida do teor de oxigênio. A incubação dos biorreatores foi feita durante 56 dias, a 28ºC. Aos 0, 7, 14, 28 e 56 dias de incubação foram determinadas atividades enzimáticas, pH, crescimento fúngico e umidade do solo. A temperatura do solo e % de oxigênio do solo foram acompanhadas diariamente.

No primeiro experimento foram observadas atividades enzimáticas durante todo período de crescimento de *L. crinitus* em todos os tratamentos avaliados e um efeito significativo do óleo vegetal e da oxigenação sob pressão. O pH variou de 4,0 a 3,8 ao final de tempo de incubação. O teor de oxigênio nos reatores com revolvimento do solo variou entre 19 e 21% e nos reatores pressurizados a porcentagem foi superior, variando entre 23 e 25%. A temperatura do solo nos biorreatores pressurizados foi inferior à observada nos biorreatores com revolvimento do solo. O crescimento de *L. crinitus* foi semelhante em todas as condições analisadas até 56 dias de incubação, com influência do óleo vegetal e do ar pressurizado. *L. crinitus* foi capaz de degradar 36,3% de HCB, 35,4% de pentaclorobenzeno (PeCB) e 22,9% dos tetraclorobenzenos totais (TCBs) nos reatores pressurizados. No segundo experimento também foram observadas atividades enzimáticas durante todo período de crescimento de *L. crinitus* e um efeito significativo do aumento da concentração do óleo vegetal no sistema de cultivo. Não houve alteração do pH do solo. O teor de oxigênio nos reatores variou entre 21 e 25%. A temperatura do solo nos biorreatores variou entre 16 e 28ºC. Houve crescimento significativo de *L. crinitus* em todas as situações analisadas e um efeito significativo da concentração do óleo vegetal no aumento da biomassa fúngica. *L. crinitus* foi capaz de degradar 43,7% de HCB, 50,4% de PeCB e 41,7% dos TCBs totais nos reatores pressurizados.

Palavras chaves: aeração, biorremediação, basidiomiceto, biorreator, *Lentinus crinitus*

Abstract

This study aimed to evaluate the biodegradation of organochlorine compounds in soil, especially hexachlorobenzene (HCB), in bioreactors with 10 kg capacity and also the efficiency of pressurized aeration, the effects of unsaturated fatty acids and concentration of soiled organochlorines compounds on the biodegradation by *Lentinus crinitus* CCIBt 2611. The contaminated soil (10643,81 mg kg^{-1} soil HCB and PeCB 1550,24 mg kg^{-1} soil) was sterilized with benomyl (10,0 mg kg^{-1} soil). Batches of 9 kg of soil (dried) were transferred to bioreactors incorporated with 2,5% of commercial gypsum (dry weight) and 900,0 mg of *L. crinitus* (dry weight) grown on sugar cane bagasse mixed with soy flour (20%) and cassava flour (30%). Two experiments were performed, and the culture conditions analyzed in the first experiment were: two reactors with 5% of emulsion of commercial vegetable oil (trade name Lisa) and Tween 20 at the ratio of 9:1 (w/w) with pressurized air (0,2 bar) and two reactors with a 5% of emulsion of commercial vegetable oil (trade name Lisa) and Tween 20 at the ratio of 9:1 (w/w) with weekly tilling soil, and in the second experiment the culture conditions were: two reactors with 5% of emulsion of commercial vegetable oil (trade name Lisa) and Tween 20 at the ratio of 9:1 (w/w) used for controlling purposes, two reactors with 8% of emulsion of vegetable oil and Tween 20 at the ratio of 9:1 (w/w) and two reactors with contaminated soil diluted with uncontaminated soil (1:10 w/w) in order to decrease the initial concentration of organochlorine. And in all reactors was injected pressurized air (0.2 bar). It was installed a heating sensor in the bioreactors and a probe to measure oxygen content. Incubation period of bioreactors was 56 days at 28 ºC. At 0, 7, 14, 28 and 56 days of incubation were determined enzyme activities, pH, fungal growth and moisture soil. Soil temperature and the % of oxygen soil were monitored daily. In the first experiment were noticed enzymes activities throughout the growth period of *L. crinitus* in all treatments and a significant effect of vegetable oil and pressurized aeration. The pH ranged from 4.0 to 3.8 at the end of the incubation period. The oxygen content in the tilling soil reactors ranged between 19 and 21% and in

the pressurized reactors the percentage ranged from 23 to 25%. Soil temperature in pressurized bioreactor was lower than in the bioreactors with tilling soil. The growth of *L. crinitus* was similar under all conditions studied up to 56 days of incubation, influenced by vegetable oil and pressurized air. *L. crinitus* was able to degrade 36,3% of HCB, 35,4% of pentachlorobenzene (PeCB) and 22,9% of tetrachlorobenzenes (TCBs) in pressurized reactors. In the second experiment were also observed enzyme activities during all the growth period of *L. crinitus* and a significant growth of vegetable oil concentration in the cultivation system. There was no change in the soil pH. The oxygen content reactors ranged between 21 and 25%. Soil temperature in the bioreactors ranged between 16 and 28 ºC. There was significant growth of *L. crinitus* in all cases analyzed, and a significant effect of vegetable oil concentration to increase the fungal biomass. *L. crinitus* was able to degrade 43,7% HCB, 50,4% PeCB and 22.9% TCBs in pressurized reactors.

Keywords: aeration, bioremediation, basidiomycete, bioreactor, *Lentinus crinitus*

1. INTRODUÇÃO

Com a evolução dos processos industriais e o consequente surgimento de inúmeros produtos que rapidamente tornaram-se de primeira necessidade, a atividade industrial adquiriu um caráter essencial na sociedade contemporânea. Embora a sua importância seja indiscutível, a atividade industrial costuma ser responsabilizada, e muitas vezes com justa razão, pelo fenômeno de contaminação ambiental, principalmente graças a dois fatores de extrema importância: a) o acúmulo de matérias primas e insumos, que envolve sérios riscos de contaminação por transporte e disposição inadequada; e b) ineficiência dos processos de conversão, o que necessariamente implica a geração de resíduos (Freire *et al.* 2000, Harms *et al.* 2011)

A partir do século passado, vários compostos foram sintetizados e introduzidos no mercado pelas indústrias, sem avaliação prévia do seu impacto ambiental, acumulando-se no ambiente. Esse acúmulo foi devido à ausência de decompositores naturais, além de consequente não participação dos compostos sintéticos nos ciclos biogeoquímicos. Considerando ainda a estabilidade desses compostos, sob condições aeróbias e anaeróbias, existe ainda a possibilidade da persistência e da recalcitrância de tais compostos no ambiente. O resultado foi, em muitos casos, a poluição do meio por contaminantes tóxicos, colocando em risco a saúde humana e a integridade dos ecossistemas (Leisinger 1983, Häggblom 1992, Boopathy 2000, Pointing 2001, Semple *et al.* 2001, Rabinovich *et al.* 2004).

Os compostos organoclorados são considerados como os grandes responsáveis pelos problemas de contaminação ambiental, principalmente porque estes compostos são, em geral, altamente tóxicos, de difícil degradação natural e tendem a se bioacumular no meio ambiente (Freire *et al.* 2000, Guzzella *et al.* 2005)

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos organoclorados que foram intensamente produzidos a partir da década de 40, sendo considerados produtos sintetizados pelo

homem que maior impacto causam no meio ambiente, devido basicamente a sua alta persistência no ambiente, resistência à degradação, capacidade de transporte a longas distâncias pela atmosfera e correntes marinhas, potencial de bioacumulação e biomagnificação. Os organoclorados possuem elevada solubilidade em lipídios e esta característica determina sua capacidade de biomagnificação, atingindo o topo da cadeia alimentar, o homem (Fernícola & Oliveira 2002).

Em 1995, o Conselho de Administração do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente - PNUMA - classificou 12 compostos orgânicos como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). São compostos orgânicos representados por compostos aromáticos e alicíclicos clorados. Foram reconhecidos pela comunidade internacional como POPs os seguintes compostos: Aldrin, Clordano, diclorodifeniltricloroetano (DDT), Dieltrin, Dioxinas, Endrin, Furanos, Heptacloro, Mirex, Bifenilas Policloradas (PCBs), Toxafeno e o hexaclorobenzeno (HCB) (Fernícola & Oliveira 2002, Breivik *et al.* 2004, Goerk *et al.* 2004, Guerzoni *et al.* 2007, Bais *et al.* 2008).

O hexaclorobenzeno (HCB) foi considerado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um dos 12 poluentes orgânicos mais persistentes que devem ser banidos do planeta, devido aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente (Toledo 2002).

O HCB é o principal composto presente nos solos contaminados por organoclorados da Baixada Santista, São Paulo. Foi oriundo do processo industrial de produção do tetracloreto de carbono, um desengraxante bastante utilizado na indústria metalúrgica. Os resíduos da fabricação de tetracloreto de carbono constituem-se de uma mistura de compostos organoclorados, sendo o HCB o componente principal, muito embora o pentaclorofenol (PCF) possa estar presente em concentrações relativamente elevadas, além de outros organoclorados em menores concentrações (Matheus 2003).

Diversas propostas de degradação de organoclorados foram sugeridas, como opções de tratamento que incluem a disposição do material contaminado em aterros sanitários, sua incineração ou ainda a biorremediação desse material. Essa última opção é uma tecnologia alternativa que, por utilizar metabolismos degradativos do próprio ambiente em questão, ser realizada em temperatura e pressão ambiente, além de assemelhar-se a um manejo na área comprometida, tem baixo custo e é segura do ponto de vista ambiental. Além disso, os sistemas biológicos de tratamento podem promover a transformação do composto poluente, desde a simples retirada de um átomo até a mineralização, com a oxidação completa, obtendo produtos finais inócuos. Estes sistemas não geram resíduos sólidos, quando conduzidos *in situ*, sendo assim, menos impactantes. Além do mais, esse tipo de tratamento pode ser projetado para tratar sólidos, lodos, água e gases contaminados (Atlas 1993, Shannon & Unterman 1993, Häggblom & Valo 1995, Matheus & Machado 2002, Eerd *et al.* 2003, Sutherland *et al.* 2004).

Alguns dos agentes primários da decomposição da matéria orgânica utilizados em biorremediação, são os fungos, que são capazes de crescer sob as condições de estresse que limitam o crescimento bacteriano. Além disso, o modo de crescimento dos fungos, induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono, por meio do alongamento e ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, aumentando o contato superficial com o contaminante, melhorando os níveis de biodegradação. Se a contaminação é relativamente resistente à biodegradação, geralmente utilizam-se fungos basidiomicetos inoculados para iniciar o ataque metabólico (Dupont *et al.* 1998, Matheus & Machado 2002, Rabinovich *et al.* 2004).

Alguns basidiomicetos nativos do Estado de São Paulo foram selecionados para aplicação em tratamentos ambientais de solos contaminados, por sua capacidade de degradar compostos organoclorados. *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 (CCB274), *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 (CCB444) e *Trametes villosa* CCIBt 2513 (CCB176) são alguns dos fungos

selecionados e estão sendo estudados em escala de laboratório e de campo (Matheus & Okino 1998, Matheus *et al.* 2000; Matheus *et al.* 2001; Matheus & Bononi 2002; Matheus 2003; Matheus *et al.* 2003; Machado *et al.* 2005a; Moreira-Neto 2006; Ballaminut 2007, Salvi 2008, Silva 2009, Okada 2010).

1.1. Resíduos organoclorados

Os compostos organoclorados são um grupo de diversos produtos químicos sintéticos orgânicos que constituem um dos mais importantes grupos de poluentes ambientais como resultado do seu uso indiscriminado como herbicidas, inseticidas, fungicidas, solventes e principalmente como subprodutos de processos industriais. Devido a sua toxicidade, bioconcentração e persistência tendem a se bioacumular no ambiente (Camachó-Perez *et al.* 2012, Barber *et al.* 2005, Freire *et al.* 2000).

A produção global desses resíduos excedeu 100.000 toneladas e, provavelmente, emissões primárias na atmosfera ocorreram principalmente durante a década de 70. A partir deste período, ocorreu uma tendência de declínio de emissões no ambiente devido às restrições em alguns países (Barber *at al.* 2005).

Dioxinas e furanos clorados, por exemplo, podem ser liberados no meio ambiente em processos de combustão incompleta. Existem evidências sobre a alta toxicidade e persistência destes tipos de compostos, destacando entre outros o 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), de potente ação carcinogênica (Scheter & Oslon 1997, Olivieri & Cooper 1997, Stringer & Johnston 2002, Chovancová *et al.* 2012). Grande parte da ação tóxica destes compostos pode ser constatada em micro-organismos aquáticos, nos quais é comum o aparecimento de anormalidades no sistema reprodutivo e imunológico (Olivieri & Cooper 1997, Loganathan *et al.* 2001).

Embora atualmente controlada, a utilização de pesticidas organoclorados tem sido uma das principais fontes de contaminação nas últimas décadas. As grandes plantações, particularmente as monoculturas, favorecem o aumento de espécies consideradas pragas. Para combater as pragas foram desenvolvidos inseticidas, herbicidas, fungicidas, etc., produtos que, quando utilizados de maneira indiscriminada, contaminam grandes regiões. O mais clássico

deles, o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), foi o primeiro pesticida organo-halogenado desenvolvido. Nos primeiros anos de uso, o DDT foi elogiado devido a grande contribuição à saúde da humanidade, e o seu uso foi incentivado indiscriminadamente. Os efeitos da acumulação do DDT no organismo humano não foram percebidos imediatamente, somente após 20 anos é que apareceram os primeiros sintomas patogênicos. Hoje sabe-se que o DDT é resistente à degradação, possui propriedades cancerígenas, mutagênicas e teratogênicas, além de outros efeitos como malformação uterina (Pontin & Massaro 2001).

A indústria de papel e celulose é uma das que mais contribuiu e ainda contribui ao processo de contaminação do meio ambiente por compostos organoclorados, principalmente com uma grande gama de compostos originados nos processos de branqueamento da polpa. Nestes processos, normalmente realizados com cloro, é produzido um grande número de compostos organoclorados, muitos dos quais são considerados altamente tóxicos, como dioxinas, clorofenóis, clorocatecóis e cloroguaiacóis (Odendahl 1994). Embora muitos esforços tenham sido dedicados à substituição do cloro como insumo de branqueamento, com o objetivo de minimizar o teor de compostos organoclorados nos efluentes, o seu impacto ambiental continua sendo bastante preocupante (Freire *et al.* 2000).

O fenômeno de contaminação por organoclorados tem-se difundido de uma maneira tão generalizada, que pode ser observado até em regiões bastante isoladas do planeta. Na última década, por exemplo, tem-se registrado a presença de compostos organoclorados na região ártica (Goerk *et al.* 2004). Dentre outros, destaca-se a presença de compostos semi-voláteis como o hexaclorobenzeno, DDT e os seus metabólitos, bifenilas policloradas, espécies persistentes em amostras de ar, água e sedimentos.

1.1.1. Hexaclorobenzeno

O hexaclorobenzeno (HCB) é um composto aromático halogenado que apresenta o núcleo benzênico completamente clorado. À temperatura ambiente é um sólido cristalino branco, praticamente insolúvel em água, levemente solúvel em álcool frio, mas solúvel em éter, benzeno, hexano e clorofórmio. O HCB grau analítico contém, aproximadamente, 98% de HCB, 1,8% de pentaclorobenzeno e 0,2% de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, e é conhecido por ter uma variedade de impurezas, incluindo hepta- e octaclorodibenzofurano, octaclorodibenzo-p-dioxina e decaclorobifenil (Toledo 2002, Matheus 2003, Barber *et al.* 2005).

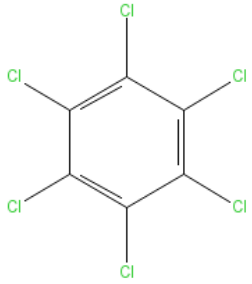
Foi sintetizado pela primeira vez por Michael Faraday, químico inglês que descobriu o benzeno, em 1824. Historicamente, o HCB teve muitos usos na indústria e na agricultura. O HCB foi introduzido pela primeira vez em 1945 como fungicida para as sementes de cebola, sorgo e culturas como trigo, cevada, aveia e centeio. As restrições ao uso do HCB foram iniciadas na década de 1970 e causaram uma grande queda na produção do HCB. Nos últimos anos, sua produção tem sido como um sub-produto não intencional na síntese de solventes clorados, aromáticos, e pesticidas. A principal fonte de exposição ao HCB é a comida. No entanto, a exposição ao HCB também pode ocorrer a partir de ar contaminado, água, ou no solo (Zitko 2003, Barber *et al.* 2005)

O HCB é extremamente persistente no ambiente devido à sua baixa solubilidade, baixa reatividade e seu alto teor de cloro. Está distribuído no meio ambiente em virtude de sua mobilidade e sua resistência a degradação. O transporte de longa distância tem uma importância significativa na redistribuição do HCB no meio ambiente. Geralmente presente em baixas concentrações, está largamente disperso no ambiente, tendo sido detectado em ar, água, sedimento, solo, biota e sítios remotos, refletindo a persistência e o longo alcance dessa substância (Matheus *et al*. 2000,Toledo 2002, Ezendam *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2007).

Devido a esta resistência natural à degradação biológica e química, à sua persistência no ambiente e à sua capacidade de se transportar para lugares distantes de sua fonte emissora, pelo ar e pelas águas, o HCB se configura num grupo de substâncias químicas de particular interesse, em nível global, para a agricultura, a indústria, a saúde pública e o meio ambiente: os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (Matheus *et al*. 2000,Toledo 2002, Hirano *et al.* 2007).

As características físico-químicas do HCB estão descritas no Quadro 1

Quadro 1: Características físico-químicas do hexaclorobenzeno (Barber *et al.* 2005)

Estrutura química	
Outros nomes:.....	Amatin; Bunt-cure; Bunt-no-more; Co-op Hexa; HCB; Carbono clorado de Julin; No Bunt 40; No Bunt 80; Pentaclorofenil clorado; Perclorobenzeno; Snieciotox; 1,2,3,4,5,6-Hexaclorobenzeno; Benzeno hexaclorado; Hexaclorobenzol; Fenil percloril; Rcra waste number U127; Sanocid; UN 2729
Fórmula	C_6Cl_6
Peso molecular (g mol^{-1}).....	284,78
Número de registro CAS.....	118-74-1
Solubilidade em água (mg L^{-1}, 25°C)....	0,0079
Ponto de fusão (ºC).....	226
Ponto de Ebulição (ºC).....	323-326
Pressão de vapor (mPa).....	1,45
Volatilidade.....	baixa
log Kow (pH 4,7).....	6,18
Mobilidade no solo.....	baixa
Persistência.....	elevada
Limite aceitável em água para proteção da vida humana..(EPA/USA)..	zero

Segundo Toledo (2002) o HCB é altamente tóxico para a vida aquática, plantas, animais terrestres e seres humanos. O HCB pode causar danos para o feto em desenvolvimento, fígado, sistema imunológico (aumentando o risco de infecção), tireóide e rins. Uma exposição elevada ou repetida pode causar danos para o sistema nervoso e causar irritabilidade, dificuldade de locomoção e de coordenação, fraqueza muscular, tremor e/ou uma sensação de formigamento na pele. Exposição repetida pode levar a alterações permanentes na pele, tais como mudanças na pigmentação, pele esticada e grossa, enrugamento fácil, cicatrizes, pele quebradiça e aumento no crescimento de pêlos, especialmente na face e antebraços.

O HCB tem sido relacionado com alguns casos de "porfiria cutânea tardia" (PCT), alterações no metabolismo de porfirina (excreção de porfirinas e precursores de porfirina foram aumentadas). Ezendam (2004) em estudos realizados com ratos comprovou que o gene responsável pelo metabolismo das porfirinas foi induzido quando os ratos foram expostos a uma dieta que continha HCB.

Existe a suspeita de que a exposição a compostos organoclorados, incluindo pesticidas organoclorados, aumente o risco de câncer de mama em mulheres (Stone 1994). Esta preocupação surge a partir da constatação de que estes poluentes ambientais interferem na atividade hormonal e induzem enzimas com funções múltiplas, as quais estão também intimamente ligadas ao metabolismo de hormônios esteróides.

1.2. Fungos de podridão branca e sua aplicação em biorremediação de organoclorados

Os basidiomicetos causadores de podridão branca são micro-organismos que possuem a capacidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose em moléculas menores até CO_2 e água. A

lignina, suporte estrutural para as plantas, é um biopolímero tridimensional com uma estrutura composta por unidades moleculares que não se repetem regularmente, originárias da oxidação de três precursores monoméricos: álcool cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. A polimerização aleatória destas subunidades, através de ligações C-C e C-O-C dão origem a uma forma altamente complexa, tridimensional, estável e insolúvel em água. Assim, a lignina confere rigidez à madeira, diminuição da permeabilidade das paredes das células do xilema à água e proteção aos tecidos vegetais contra o ataque microbiano (Matheus & Okino 1998, Kirk & Farrel 1987, Levin *et al.* 2007).

Apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ainda serem investigados, a degradação da lignina por fungos basidiomicetos pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoredutases (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (Figura 1) (Kirk 1993, Leonowicz *et al.* 1999, Moreira-Neto 2006). As enzimas extracelulares, por meio da abstração de elétrons do substrato, produzem espécies radicais de alta atividade que vão atuar na despolimerização da lignina e outros compostos tóxicos de alta complexidade (Fabbrini *et al.* 2002). Após o ataque inicial à parede celular, há uma maior acessibilidade das enzimas extracelulares à estrutura lignocelulósica, resultando na degradação da mesma (Gutierrez 1995). Essas enzimas vêm sendo extensivamente estudadas e mostram participação na transformação não só da lignina, mas também de compostos poluentes recalcitrantes não poliméricos, como nitrotoluenos, hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), corantes orgânicos e sintéticos, e também pentaclorofenol (Kirk & Farrell 1987, Ullah *et al.* 2000a, , Ullah *et al.* 2000b , Pointing 2001, Matheus *et al.* 2003, Higuchi 2004, Novotný *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005a).

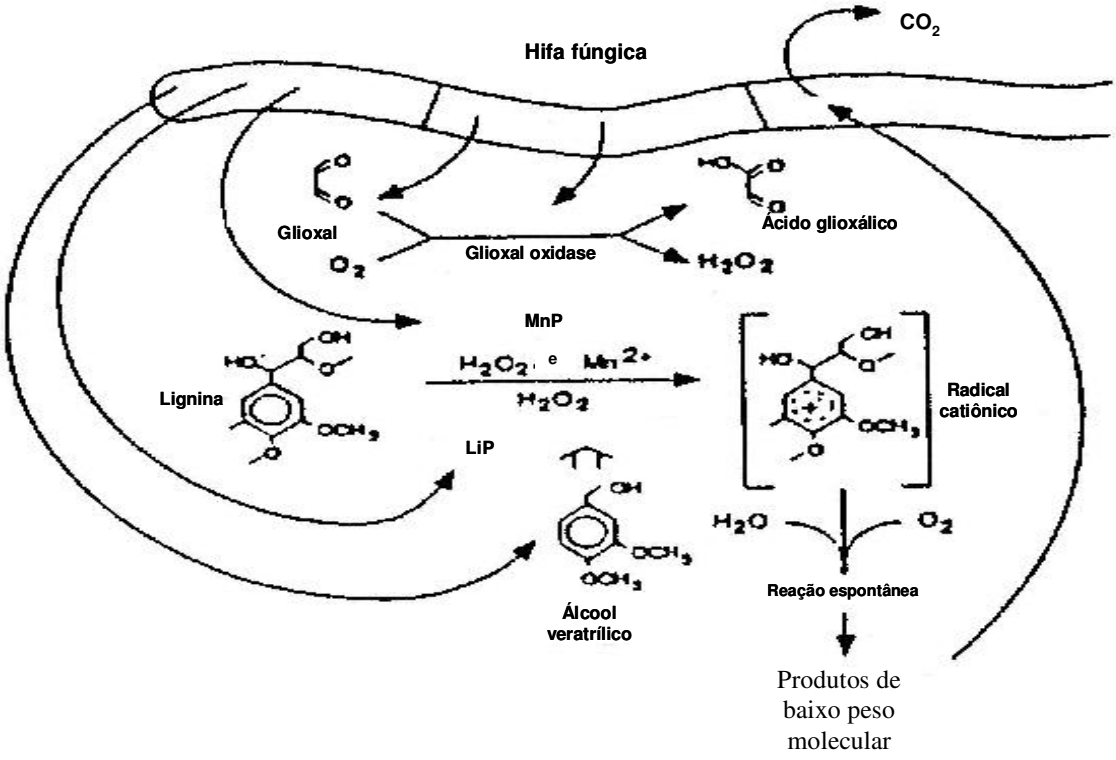
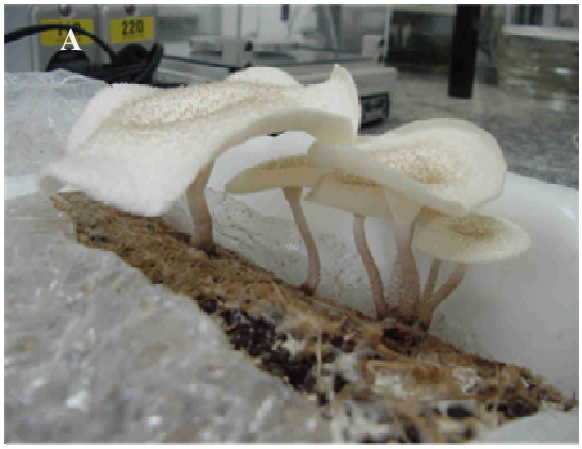


Figura 1: Esquema geral do processo de degradação da lignina por *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk 1993).

Os primeiro estudos realizados de degradação de xenobiíticos por fungos de podridão branca foram realizados com *Phanerochaete chrysosporium*. Em meados da década de 80 foram apresentadas as primeiras evidências de que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* tinha a capacidade de mineralizar dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD), benzo(a)pireno, lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) e algumas bifenilas policloradas (PCBs), bem como o pentaclorofenol (Bumpus & Aust 1987, Barr & Aust 1994, Reddy *et al.* 1998, Reddy & Gold 2000, Pointing *et al.* 2001, Shim & Kawamoto 2002, Krishna 2005, Tortella *et al.* 2005).

Os basidiomicetos tem sido utilizados em estudos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (POPs), tais como pesticidas clorados (DDT), dioxinas (2,3,7,8–tetraclorodibenzeno-p-dioxina), bifenilas policloradas, hexaclorobenzeno, além de hidrocarbonetos aromáticos (benzo-α-pireno), pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Tais

linhagens de fungos envolvidas na degradação destas moléculas incluem as espécies (Figura 2): *Higrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophora cinerea*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Psilocybe castanella*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Gugliotta 2001, Matheus *et al.* 2003, Machado *et al.* 2005a, Machado *et al.* 2006, Vitali 2004, Matheus & Bononi 2002, Ballaminut 2007, Salvi 2008, Silva 2009, Okada 2010).



Lentinus crinitus CCIBt 2611

Psilocybe castanella CCIBt 2718

Trametes villosa CCIBt 2513

Figura 2: Fungos basidiomicetos aplicados em processo de biorremediação de solo contaminado com organoclorados

Fotos: A) Marina Capelari 2002, B) Deconica pages 2010, C) Adriana de Mello Gugliotta 1997

Machado *et al.* (2005a) selecionaram 32 linhagens das 125 estudadas para aplicação em estudos de biodegradação de PCF em solo, dentre as 32 linhagens apenas 6 foram capazes de crescer em solo com 4600 mg PCF kg^{-1} solo. No mesmo estudo Machado *et al.* (2005a) também observou que *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 e *Trametes villosa* CCIBt 2513 foram capazes de degradar até 80% do PCF presente no solo. Em estudo realizado por Salvi (2008) *Trametes villosa* CCIBt 2513 também foi capaz de mineralizar 12% de tetraclorodietozibenzeno em solo (4200 mg TCDB g^{-1}solo), produto originado da oxidação química do HCB, sendo mais tóxico que o HCB.

Matheus *et al.* (2000) observaram redução de até 25% de HCB durante crescimento de *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 e *Lentinus* crinitus CCIBt 2611 em solo contendo 1.327 mg de HCB kg^{-1}, sem suplementação, com taxas de mineralização inferiores a 1%.

De acordo com Ballaminut (2007) *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 foi capaz de degradar 100% de pentaclorofenol em solo contaminado com 100 mg PCF Kg^{-1} em apenas 5 dias de incubação.

1.3. Enzimas ligninolíticas

Os basidiomicetos são capazes de sintetizar e secretar uma ou mais das três principais enzimas envolvidas na modificação e degradacão da lignina, ou seja, lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), Manganês peroxidase (MnP, CE 1.11.1.13) e fenoloxidase (lacase) (ALC, EC 1.10.3.2) (Kulikova *et al.* 2011).

Atualmente, a denominação comum utilizada para estas enzimas é ligninases (Dashtban *et al.* 2009, Ruiz-Duenas & Martinez 2009), embora alguns autores atribuem este termo a lignina peroxidase. As ligninases podem ser divididas em dois grupos: fenoloxidases que compreendem as Lacases (LAC, EC 1.10.3.2) e peroxidases que contém um grupo heme, que compreende a lignina peroxidase (LP, 1.11.1.14 CE), manganês peroxidase (MnP, 1.11.1.13 CE) e uma peroxidase multifuncional (Peroxidase versátil) (VP, EC 1.11.1.16) (Wong 2009, Ruiz-Duenas & Martinez 2009). Estes dois grupos de enzimas têm receptores de elétrons diferentes: oxigênio molecular para a lacase e peróxido de hidrogênio para as peroxidases que contém um grupo heme (Kulikova *et al.* 2011)

A fisiologia da LiP, MnP e LAC tem sido estudada extensivamente (Hatakka 1994; Thurston 1994, Arora & Sharna 2010, Kulikova *et al.* 2011). Estas enzimas envolvidas na degradação da ligina são altamente inespecíficas no que diz respeito ao seu substrato, o que é

surpreendente, considerando seus modos de ação através da geração de radicais. Resultados promissores destas enzimas ligninolíticas têm sido demonstrados, como a transformação *in vitro* ou mineralização de uma vasta gama de organopoluentes altamente recalcitrantes, com similaridades estruturais com a lignina. Isto é particularmente notável, uma vez que, muitos xenobióticos nunca foram encontrados na natureza, e em muitos casos (por exemplo, HAP, com mais de quatro anéis de benzeno) os fungos causadores de podridão-branca são os únicos organismos capazes de degradá-los (Novotný *et al.* 2004).

1.3.1. Lignina Peroxidase (LiP)

A Lignina peroxidase (LiP) foi detectada pela primeira vez em *Phanerochaete chrysosporium* em 1983 (Tien & Kirk 1984). Mais tarde, a presença de LiP foi estabelecida em vários cepas de *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor* (Johanson *et al.* 1993). Posteriormente uma seleção de basidiomicetos revelou a presença de genes LiP em *Panus* sp., *P. coccineus*, *P. sanguineus* e *Perenniporia medula-panis* (Pointing *et al.* 2005).

A LiP é uma enzima não específica quanto aos substratos, oxida uma grande quantidade de substratos aromáticos de natureza fenólica e componentes não fenólicos da lignina com um potencial redox inferior a 1,4 V na presença de peróxido de hidrogênio.

Uma característica única da LiP, que a distingue de outras peroxidases, é a capacidade de oxidar subestruturas metoxi da lignina com alto potencial redox. Para substratos fenólicos, a taxa de oxidação é maior do que para os substratos não fenólicos, como resultado da oxidação, os radicais fenoxil são formados. Na presença de oxigênio, os radicais fenoxil podem interagir com vários compostos presentes no meio, e causarem a ruptura do anel aromático e / ou sua polimerização (Kulikova *et al.* 2011).

No processo de degradação da lignina, a LiP é inicialmente oxidada pelo H_2O_2 e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H_2O) e com oxigênio molecular, gerando uma "combustão enzimática" onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Esta enzima é uma glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético e é dependente de H_2O_2 para sua atividade (Kirk *et al.* 1978).

1.3.2. Manganês Peroxidase (MnP)

A peroxidase dependente de manganês ou manganês peroxidase (MnP) é produzida pela maioria dos fungos de podridão branca pertencentes às famílias Polyporaceae, Meruliaceae e Coriolaceae. Hoje são conhecidos cerca de 56 espécies que produzem esta enzima (Hofrichter 2002) e até agora, não se evidenciou qualquer bactéria, levedura e basidiomiceto micorrízico capaz de produzi-la (Kulikova *et al.* 2011).

A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostéico. O peso molecular do MnP varia de 38 a 62,5 kDa, sendo que na maioria das enzimas purificadas o peso molecular é de aproximadamente 45 kDa (Hatakka 1994). Os basidiomicetos produzem um grande número de isoformas de MnP, sendo que 11 isoformas foram descritos para *Ceriporiopsis subvermispora*. Essas isoformas diferiram principalmente nos pontos isoelétricos (p*I*), que estiveram na faixa ácida (pH 3-4) embora isoformas na faixa neutra e menos ácida foram encontradas em determinados fungos (Lobos *et al.* 1994).

A MnP catalisa a oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+} na presença de peróxido de hidrogênio. O ciclo catalítico de MnP na presença de um agente quelante (oxalato, malonato, malato, tartarato e lactato) conduz a formação de um complexo quelante Mn^{3+} altamente reativo, que pode oxidar

substratos fenólicos pelo mecanismo de um elétron, incluindo compostos fenólicos com a formação de radicais fenoxil da lignina .

Além da atuação direta destes íons Mn^{3+} na transformação da lignina, outros sistemas têm sido esclarecidos para atuação da MnP na degradação da lignina e de poluentes orgânicos. Um destes sistemas é baseado na mediação por ácidos graxos insaturados e seus derivados (lipídeos) e tem sido relacionado com a degradação de estruturas não fenólicas de lignina por MnP. Este sistema atua pela geração de radicais intermediários reativos (radicais peroxil) a partir de estruturas de ácidos graxos insaturados, processo conhecido como peroxidação lipídica. Como resultado, este sistema MnP-lipídeo é forte o bastante para quebrar ligações Cα-Cβ e β-aril éter de modelos nãofenólicos de lignina (Figura 3). Os ácidos graxos insaturados necessários para a peroxidação lipídica estão presentes em microambientes naturais de fungos ligninolíticos e há evidências que tais substâncias estão naturalmente presentes na madeira (Watanabe *et al.* 2000, Hofrichter 2002, Kulikova *et al.* 2011).

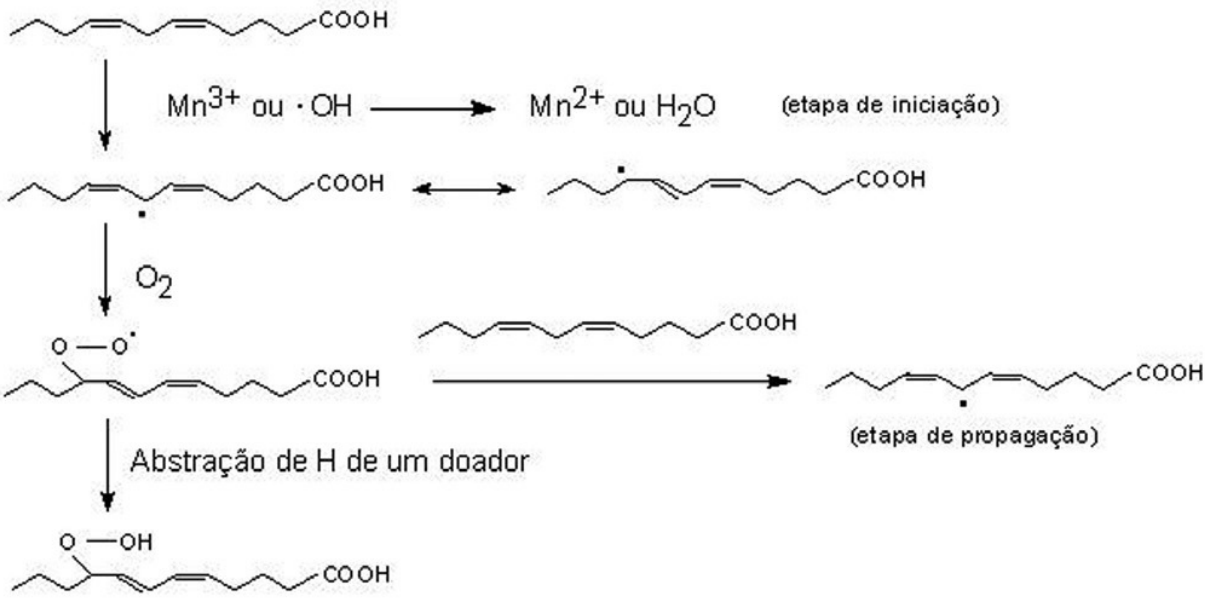


Figura 3: Peroxidação de ácido graxo di-insaturado iniciado por Mn^{+3} ou radical hidroxila (Aguiar & Ferraz 2011)

1.3.3. Lacase

Lacases (benzenodiol : oxygen oxiredutases ou *p*-diphenol oxidase : oxygen oxidoreductase) representam uma família de polifenoloxidases que contém cobre e usualmente são chamadas de oxidases multi-cobre. As lacases são encontrados em fungos, bactérias e em insetos (Baldrian 2006). Hoje, a principal fonte dessas enzima, incluindo as enzimas utilizadas para fins industriais são os fungos. Um grande número de fungos que produzem esta enzima são conhecidos, os maiores produtores de lacases são: *Podospora anserina*, *Agaricus bisporus*, *Rhizoctonia practicola*, *Pholiota aegerita*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (Youn *et al.* 1995), *Coriolus hirsutus* (Gindilis *et al.* 1988, Koroljova *et al.* 1998) e *Neurospora crassa* (Lerch *et al.* 1978, German *et al.* 1988). Lacases fúngicas têm um peso molecular (PM) de 0 a70 kDa e ponto isoelétrico (p*I*) em pH de 3-5 (Thurnston 1994, Hofrichter 2002, Baldrian 2006).

Além de serem capazes de degradar lignina, estas enzimas mostraram-se capazes de degradar uma ampla gama de compostos xenobióticos alifáticos e aromáticos por apresentar baixa especificidade por substratos. Apesar de apresentar baixo potencial redox (Kersten *et al.* 1985), essas enzimas mostraram-se capazes de oxidar compostos modelos não-fenólicos de lignina através de um sistema lacase-mediador, que utiliza determinadas substâncias mediadoras redox da lacase para promover a transferência de elétrons da enzima para compostos não fenólicos, substratos estes não acessíveis diretamente às enzimas (Johannes *et al.* 1996). Substâncias como 2,2-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) e radicais fenoxi podem atuar como mediadores para lacase (Bourbonnais & Paice 1990, Eggert *et al.* 1996, Johannes *et al.* 1996).

1.4. Efeitos da adição de óleos vegetais e surfactantes na biorremediação

O uso do óleo vegetal na biorremediação aumenta a desorção do composto contaminante, consequentemente aumenta a superfície de contato entre o solo e o contaminante devido a biodisponibilidade deles. O revestimento das partículas de solo com o óleo vegetal pode também ajudar no movimento difuso dos compostos especialmente PAHs, onde os ácidos graxos são capazes de se difundir nos pequenos microporos que são inacessíveis às células microbianas (Yap *et al.* 2010). Considerando que a difusão é um processo dinâmico, estes ácidos graxos podem transportar os compostos dos microporos, tornando-os disponíveis para ataque microbiano (Banat *et al.* 2000, Singh *et al.* 2007).

Embora as interações substrato-sufactante, tais como emulsificação, pseudo solubilização e particionamento de hidrocarbonetos entre as fases sejam esperados para aumentar a acessibilidade microbiana ao contaminante, tanto resultados positivos quanto negativos no processo de biorremediação tem sido observados. Grande parte das pesquisas tem avaliado apenas a eficácia da utilização de óleos e surfactantes nos processos de biorremediação ao invés de tentar estabelecer os mecanismos de ação envolvidos no processo, pois sabe-se que estes mecanismos não são muito bem elucidados nos sistemas de biorremediação porque múltiplas variáveis estão envolvidas (Singh *et al.* 2007)

Muitas são as evidências de que os mecanismos que atuam na regulação do sistema ligninolítico dos basidiomicetos são os mesmos que atuam na degradação dos xenobióticos, e, portanto podem ser também estimulados pela variação das condições de cultivo dos fungos (Boyle 1995, Wu *et al.* 1996; Sandermann *et al.* 1998; Bakshi *et al.* 1999; Kadhim *et al.* 1999, Ullah *et al.* 2000a).

Segundo Hofrichter (2002) nos processos de degradação da lignina e de poluentes orgânicos persistentes, certos co-oxidantes, tais como compostos sulfúricos orgânicos (L-cisteína) e ácidos graxos insaturados e seus derivados (ácido linoleico, Tween 80, por exemplo), são oxidados pelo sistema da peroxidase dependente do manganês (MnP) para formar radicais tióis e peroxilas, respectivamente, que são altamente reativos. Na presença de oxigênio, estes radicais podem atacar estruturas recalcitrantes da lignina, as quais não são normalmente abertas diretamente pelo sistema da MnP. Estes radicais também podem ser fontes de H_2O_2.

Os óleos vegetais e os surfactantes, como tween 20, podem servir como fontes de carbono para *Phanerochaete chrysosporium* e estimular a atividade ligninolítica (^{14}C-lignina $\rightarrow$ $^{14}CO_2$). Além disso, os óleos vegetais e os surfactantes podem alterar a composição fosfolipídica e a permeabilidade das membranas celulares, facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente a ação das enzimas produzidas (Asther *et al.* 1998, Leštan *et al.* 1990; 1993).

Matheus & Bononi (2002) e Salvi (2008) otimizaram as condições de cultivo *Psilocybe castanella* CCBIBt 2781, *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 e *Trametes villosa* CCIBt 2513, com a adição de ácidos graxos insaturados ao solo e observou aumento das taxas de mineralização de ^{14}C-HCB em solo superiores a 20% após 56 dias de incubação. Dessa forma, os ácidos graxos insaturados, presentes no óleo de soja, podem ter intermediado a ação de peroxidases produzidas por *P. castanella* e *L. crinitus* na mineralização do ^{14}C-HCB, através do sistema de peroxidação dos lipídios descrito por Hofrichter (2002). Sendo o HCB um composto muito estável quimicamente, é provável que o estímulo para tais reações oxidativas tenha sido o principal papel desempenhado pelos ácidos graxos presentes no óleo de soja.

Assim, o efeito da emulsão de óleo de soja em tween 20 sobre a mineralização de ^{14}C-HCB pode sugerir a ação conjunta destes compostos, promovendo maior crescimento fúngico,

maior permeabilidade da membrana, maior difusão de oxigênio e produção de radicais altamente reativos capazes de quebrar o anel benzênico e transformá-lo até $^{14}CO_2$.

1.5. Biorreatores

A utilização de biorreatores em processo de biorremediação de grandes quantidades de solos contaminados surge como uma alternativa interessante quando comparado com as demais técnicas, apresentando como principais vantagens: a possibilidade de monitoramento contínuo do desempenho do sistema, o controle das condições ideais do processo, imprescindíveis à manutenção da vida microbiana, e o reduzido tempo de remediação (Alef & Nannipieri 1995).

Nos métodos clássicos de tratamento biológico de solos contaminados, o problema relacionado à manutenção adequada da homogeneização do solo durante o tratamento é sempre encontrado. As primeiras dificuldades incluem a introdução e a concentração localizada de poluentes em algumas regiões do sistema. Esses problemas podem ser significativamente reduzidos através do uso de biorreatores, onde o material é misturado de forma mais efetiva. Isto permite uma amostragem mais significativa e uma medida mais realista do sucesso do processo de descontaminação (Alef & Nannipieri 1995). Além disto, no interior do biorreator, as condições ambientais de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são controladas para otimizar o crescimento microbiano, sendo possível também a inoculação de micro-organismos comprovadamente degradadores dos contaminantes (Jacques *et al.* 2007).

Em geral, as taxas e a extensão da biodegradação nesta técnica são muito altas, em vista do controle sobre fatores abióticos, e até bióticos, no interior do biorreator, o que resulta no tratamento do solo num curto período de tempo. Concomitantemente a isso, algumas desvantagens estão relacionadas a está técnica, como a limitação da quantidade de solo tratado devido ao tamanho dos biorreatores e a necessidade, em alguns casos, de pré-tratamento do solo

para a remoção de compostos tóxicos aos micro-organismos (como metais pesados) e para a redução do tamanho dos agregados do solo. Porém, o fator que normalmente limita a utilização desta técnica é o elevado custo de remediação do solo, em vista da alta tecnologia utilizada nos biorreatores. Assim, o uso dessa técnica restringe-se aos casos em que o solo está contaminado com altas concentrações do poluente e há necessidade de se realizar a biorremediação em curto período de tempo. Sob essas exigências, a utilização de outras técnicas de biorremediação provavelmente não traria resultados satisfatórios (Doelman & Breedvelk 1999).

A seleção da configuração mais indicada de biorreator a ser adotada, bem como da técnica de biorremediação associada (bioestímulo, bioaumento, incorporação de material estruturante, dosagem de biosurfactante e etc) devem ser realizadas levando-se em consideração as características do solo a ser tratado, a natureza do contaminante, a composição da mistura a ser tratada, os micro-organismos envolvidos, o grau de importância da aeração, o nível de necessidade de agitação, entre outros.

Allef & Nannipieri (1995) descreveram que o uso de biorreatores apresenta algumas vantagens quando comparados com outras técnicas clássicas de biorremediação, tais como:

- Controle de emissões atmosféricas e da geração de águas no processo;
- Controle e manutenção das condições operacionais (pH, temperatura, teor de umidade e etc,);
- Manutenção do grau de mistura adequado (agitação contínua ou descontínua);
- Controle da degradação dos poluentes através de um monitoramento mais efetivo;
- Possibilidade de incorporação de aditivos diretamente no reator (água, micro-organismos, surfactante, nutrientes, corretivos de pH, co-substratos e etc.);
- Sistema de aeração facilitado;
- Reduzida área requerida para instalação do sistema;

- Possibilidade de tratamento de solos com teor expressivo de partículas finas;
- Não há contato direto entre o conteúdo do reator (poluente) e o ambiente durante o processo de tratamento, o que apresenta vantagem do ponto de vista ambiental e de segurança;

1.6. Biorremediação: aspectos gerais e fatores que afetam o processo

A biorremediação é uso de organismos vivos para tratamento de ambiente contaminado a fim de reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental (Litchfield 2005).

Embora vários contaminantes possam ser metabolizados por micro-organismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. No caso dos organoclorados, por exemplo, muitas áreas contaminadas possuem uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias, certamente, não é metabolizada na mesma velocidade. Em vez disso, as taxas de degradação dos diversos compostos que são metabolizados são diferentes e dependentes de vários fatores. Em especial, a velocidade de degradação é comumente depende da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas *on site* pelos micro-organismos. Nesse contexto, a quantidade de catalisador presente, de certa forma, representa o número de micro-organismos hábeis em metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula. Então, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de micro-organismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante (Andrade *et al.* 2010).

Provident *et al.* (1993) afirmam que as condições ambientais podem afetar o processo de biodegradação em dois níveis: influenciando o crescimento e atividade microbiana e influenciando também as propriedades físicas e químicas do poluente.

A seguir são apresentados alguns dos principais fatores que afetam o processo de biodegradação de solos contaminados:

1.6.1. Aeração

A aeração do solo é de fundamental importância para o crescimento de micro-organismos empregados em sistemas de tratamento e também para a natureza das reações de degradação dos compostos poluentes (Dupont *et al*. 1998), sendo um parâmetro operacional crítico em processos de fermentação em substrato sólido (Germain & Stephenson 2005, Hwang *et al.* 2006). Além de promover a oxigenação do solo, o sistema de aeração nos biorreatores contribui para manter a temperatura do solo próxima à temperatura ótima de crescimento do microrganismo utilizado, já que a variação da temperatura é um dos fatores que afetam diretamente no crescimento fúngico em substrato sólido, necessitando de controle durante o processo (Gowthaman *et al.* 2001). Troquet *et al.* (2003) em estudo de biorremediação observaram que as melhores taxas de biodegradação foram obtidas nos tratamentos onde a oxigenação foi constante. Rhykerd *et al.* (1999) em estudo de biorremediação de solos contaminados por compostos oleosos ressalta que a aeração adequada é essencial para a atividade de micro-organismos degradadores de óleos. Em seus estudos esses autores mostraram a necessidade de melhorar a porosidade do solo para favorecer a aeração, utilizando técnicas como a adição de agentes que possam criar espaços de ar no solo, chamados de *bulking agents*.

1.6.2. Nutrientes

Para sobreviver os micro-organismos, de uma forma geral, necessitam de fontes de nutrientes e um aceptor final de elétrons. Organismos aeróbios envolvidos no processo de biorremediação utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons e o carbono orgânico como fonte de carbono. Nitrogênio, fósforo e potássio são, por sua vez, os principais nutrientes inorgânicos adicionados, se necessário, durante o processo de biodegradação para prevenir limitações nutricionais durante o tratamento biológico (Provident *et al.* 1993).

Um dos principais fatores que influenciam o crescimento fúngico e a degradação de poluentes por basidiomicetos são as quantidades de nutrientes presentes no meio. Alguns autores, como Leys *et al.* (2005) e Graham *et al.* (1999) comentam a importância da adição de carbono, nitrogênio e fósforo em sistemas de biodegradação. Esses últimos autores ressaltam ainda que a adição de fósforo e nitrogênio tenha sido efetiva para acelerar as taxas de degradação de hidrocarbonetos em solos, já que a biodegradação requer uma "dieta" nutricional que favoreça o crescimento microbiano. Além disso, estudos mostram que o mecanismo dos basidiomicetos que degrada a lignina é desencadeado pela limitação de carbono e nitrogênio (Reddy *et al.* 1998, Reddy & Gold 2000). Assim sendo, a relação carbono:nitrogênio (C:N) do substrato utilizado como suporte para o inóculo e o tempo de incubação têm papel significante na degradação de poluentes por fungos basidiomicetos (Lamar & White 2001; Ballaminut 2007).

De acordo com Matheus (2003) a relação C:N do substrato influenciou na degradação de hexaclorobenzeno (HCB) por fungos basidiomicetos. Visto que o melhor crescimento dos fungos ocorreu na relação C:N 30, entretanto foi na relação de C:N 80 que foi observada maior redução de HCB por *P. castanella*. Estudos com esta mesma espécie mostram que as relações C:N do substrato não são mantidas no decorrer do tratamento (Ballaminut & Matheus 2007),

podendo interferir no processo de degradação. Dessa forma, a reposição de nutrientes durante o processo, mantendo a relação C:N inicial, poderia favorecer a produção enzimática e a degradação dos organoclorados.

1.6.3. Umidade do solo

A umidade do solo afeta vários processos que contribuem para a dissipação, perda de pesticida em um certo volume de solo, sob condições de campo. Tem efeito direto e profundo na proliferação dos micro-organismos e suas atividades, uma vez que compete pelos sítios de adsorção com o pesticida, determinando a quantidade de pesticida disponível ao ataque microbiano (Silva & Fay 1997).

No microambiente do solo, a atividade da água e sua disponibilidade dependem das interações entre o conteúdo da água, a temperatura e a natureza do ambiente coloidal. A distribuição do tamanho dos poros, a estabilidade do agregado e a composição mineralógica influenciam a retenção da água contra a perda gravitacional e a captação pelos micro-organismos e raízes de plantas. Os solos argilosos retêm água mais fortemente que os arenosos. A adsorção e a absorção pelas argilas e materiais orgânicos aumentam a viscosidade da água e limitam sua disponibilidade aos micro-organismos.

O baixo conteúdo de umidade afeta a degradação do pesticida através da redução da biomassa microbiana e de sua atividade e por reduzir o pesticida na solução do solo (Moorman 1994). Shelton & Parkin (1991) concluíram que o principal efeito do baixo conteúdo de umidade é sobre a atividade microbiana e não sobre a biodisponibilidade do pesticida. A umidade é um dos fatores que mais afetam a atividade microbiana, pois a água, por ser um componente do protoplasma celular, é elemento indispensável. Por outro lado, a umidade auxilia as trocas gasosas, dissolve e transporta os diferentes nutrientes (Alexander 1999)

Durante o processo de biorremediação de solos contaminados o teor de umidade deve ser mantido entre 50-80% da capacidade de campo do solo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas (Deuel & Holliday 1997). Woo & Park (1999) descrevem que para o caso específico de tratamento em biorreatores, na prática, o teor de umidade necessário à operação ótima do sistema vai variar de acordo com a textura do solo contaminado.

Sabe-se que reduzidos teores de umidade afetam negativamente o metabolismo microbiano, a movimentação dos micro-organismos no solo, assim como o transporte de nutrientes através deste. Por outro lado teores excessivos de umidade limitam o transporte de oxigênio no solo (Provident *et al.* 1993). A definição do teor de umidade adequado a ser adotado no tratamento biológico de solos contaminados, seja em biorreatores, seja em biopilhas ou landfarming, constitui-se portanto, uma etapa fundamental da otimização do processo de biorremediação.

1.6.4. Potencial hidrogeniônico (pH)

A degradação de alguns pesticidas, principalmente os organofosforados e carbamatos, é afetada pelo pH do solo, enquanto a persistência dos pesticidas organoclorados raras vezes é afetada por esse parâmetro. A medida do pH é um critério importante como indicativo das reações microbianas nos solos (Silva & Fay 1997).

Os valores de pH para um determinado microambiente devem estar relacionados ao tamanho dos organismos e à multiplicidade de enzimas, as quais são em sua maioria pH dependentes e estão relacionadas aos componentes celulares, como por exemplo as membranas. O pH ótimo das enzimas é afetado pelo fenômeno da adsorção. Os efeitos da modificação do pH na adsorção de compostos orgânicos são comumente utilizados para determinar os mecanismos de ligação dos compostos ácidos ou básicos. Os compostos orgânicos fracamente ácidos

apresentam-se tanto na forma de ânions como na forma de moléculas não dissociadas, diminuindo o pH do solo, podendo aumentar a adsorção, devido à grande adsorção do conjugado ácido-base (Pierzynski *et al.* 1994)

Segundo a literatura a faixa ideal de pH para que os micro-organismos tenham atividade máxima é entre 6,5 e 8,5. Vidali (2001) também sugere que o valor do pH do meio reacional deva ser mantido próximo da neutralidade, no qual há o predomínio de bactérias e de fungos no local contaminado. Por outro lado, quando há diminuição do valor do pH, por exemplo, em função dos subprodutos ácidos gerados durante a biorremediação, sugere-se que se faça imediatamente a correção do pH do solo, caso contrário, a eficiência do processo poderá ser diminuída consideravelmente.

1.6.5. Temperatura do solo

A temperatura é uma variável microambiental importante, devido ao seu efeito termodinâmico direto no metabolismo celular e na maioria das propriedades físicas e químicas do microambiente, incluindo potencial redox e o movimento de difusão dos líquidos e gases dentro do solo (Stotzky 1972). No solo, ela afeta muitos processos que contribuem para a dissipação dos xenobióticos como a atividade microbiana, a volatilização e os processos de transportes. Dentro da faixa de temperatura normalmente encontrada nos solos agricultu̇ráveis (0 a 35ºC), a velocidade de degradação geralmente aumenta com a temperatura e umidade. As altas temperaturas existentes nos trópicos poderiam favorecer a perda do xenobiótico, através da volatilização e do aumento da atividade microbiana (Silva & Fay 1997). Estudos realizados por Iqbal *et al.* (2007) mostram efeito positivo na biorremediação com a otimização da temperatura em sistemas de tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos poliaromáticos e compostos fenólicos.

2. Justificativa

Foram realizados inúmeros estudos de aperfeiçoamento das condições ideais de cultivo de fungos basidiomicetos para otimizar sua aplicação em processos de biorremediação de solo no projeto "Avaliação de fungos para a biorremediação de solos contaminados com resíduos organoclorados", desenvolvido mediante convênio entre o Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e a Rhodia do Brasil Ltda.

Dentre os inúmeros fungos avaliados, *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, família Polyporaceae, isolado de basidioma encontrado em madeira de mata de restinga no município de São Vicente, região da Baixada Santista, SP (Okino *et al.* 2000) mostrou características interessantes para ser empregado em sistemas de biorremediação, como remoção e mineralização de poluentes organoclorados (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Bononi 2002, Ballaminut 2007). Matheus & Bononi (2002) em estudo com este fungo, em escala de laboratório, puderam observar que *L. crinitus* mineralizou até 25% de ^{14}C-hexaclorobenzeno. Mesmo com resultados significativos observados por Matheus & Bononi (2002) de biodegradação de HCB por *L. crinitus* "*in vivo*", os dados não foram reprodutíveis quando aplicados em grande escala. Silva (2009) em estudo de degradação de organolcorados em solo por *L. crinitus,* em biorreator com 400 Kg de solo não observou redução de HCB e PeCB, principais contaminantes do solo. Portanto fazem-se necessários mais estudos que permitam estabelecer padrões para manutenção desses fungos em sistemas fechados de biorremediação.

3. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar sistemas de tratamento de solo contaminado com organoclorados, com controle de diferentes fatores que influenciam na degradação dos poluentes, condicionados em reatores com capacidade de 10,0 kg utilizando a espécie de basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a eficiência da aeração sob pressão nos reatores e do revolvimento do solo durante o processo de biorremediação;
- Avaliar a influência dos ácidos graxos insaturados e da concentração dos organoclorados do solo na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611;
- Avaliar o efeito da emulsão de óleo vegetal e surfactante na biodisponibilidade dos organoclorados em solo;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Solo

O solo contaminado com organoclorados, principalmente HCB, foi oriundo de áreas contaminadas na região de restinga do Distrito de Samaritá, São Vicente, SP. Encontra-se armazenado numa "Estação de Espera" às margens da rodovia Padre Manoel da Nóbrega km 67, em "mag-sacks" com capacidade de uma tonelada, controlada pela empresa Rhodia, sob supervisão da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB). O solo foi coletado com auxílio de trado, pelos técnicos credenciados para tal, com acompanhamento da equipe de pesquisa. A tabela 1 apresenta as características físico-químicas do solo estudado, que foram analisadas pelo laboratório "Lagro – Laboratório Agronômico" S/C de Campinas, SP. As concentrações dos compostos organoclorados contaminantes do solo foram determinadas por cromatografia gasosa, nos laboratórios do Centro de Pesquisa da empresa Rhodia, localizado em Paulínia, SP (CPP/Rhodia) e estão discriminadas na tabela 2.

Tabela 1: Características físico-químicas do solo

Parâmetros analisados	Valores
pH	5,07
Capacidade de troca iônica (mEq. 100 mL^{-1})	5,50
Saturação de bases (V%)	5,60
Matéria orgânica (%)	0,13
Acidez total [H^+] (mEq. 100 mL^{-1})	5,07
Alumínio (mEq. 100 mL^{-1})	0,13
Cálcio (mEq. 100 mL^{-1})	0,20
Magnésio (mEq. 100 mL^{-1})	0,10

Nitrogênio total (%)	0,06
Fósforo (μg g^{-1})	1,00
Potássio (mEq. 100 mL^{-1})	0,01
Enxofre (μg g^{-1})	13,47
Sódio (μg g^{-1})	3,67
Ferro (μg g^{-1})	25,53
Manganês (μg g^{-1})	0,10
Cobre (μg g^{-1})	0,10
Zinco (μg g^{-1})	0,37
Boro (μg g^{-1})	0,10

Tabela 2: Análise quantitativa dos organoclorados do solo

Organoclorados	**Concentração (mg kg^{-1})**
Pentaclorobenzeno	1.650,0
Hexaclorobenzeno	12.000,0

4.2. Capacidade máxima de retenção de água do solo (CMRA)

A CMRA do solo foi determinada colocando-se 100,0 g dos sistemas de cultivo do fungo (solo + gesso) em um funil revestido com papel de filtro, previamente umidecido com água destilada, e encaixada sobre uma proveta. Lentamente, foram adicionados aos sistemas 100,0 mL de água destilada. Esperou-se que toda água em excesso escoasse para a proveta, e determinou-se a CMRA pela diferença entre o volume de água adicionado e o coletado na proveta (Vitali 2004).

4.3. Biorreatores

Os biorreatores (Figuras 6 e 7) foram construídos em polipropileno, com 0,40 m de diâmetro e 0,40 m de altura, dotados de sistema de coleta de lixiviado. Possuem sistema de injeção de ar forçada e saída do ar direcionado para colunas de carvão ativado as quais retém possíveis resíduos voláteis de organoclorados. São fechados com tampas construídas em polipropileno, vedadas por junta de borracha.

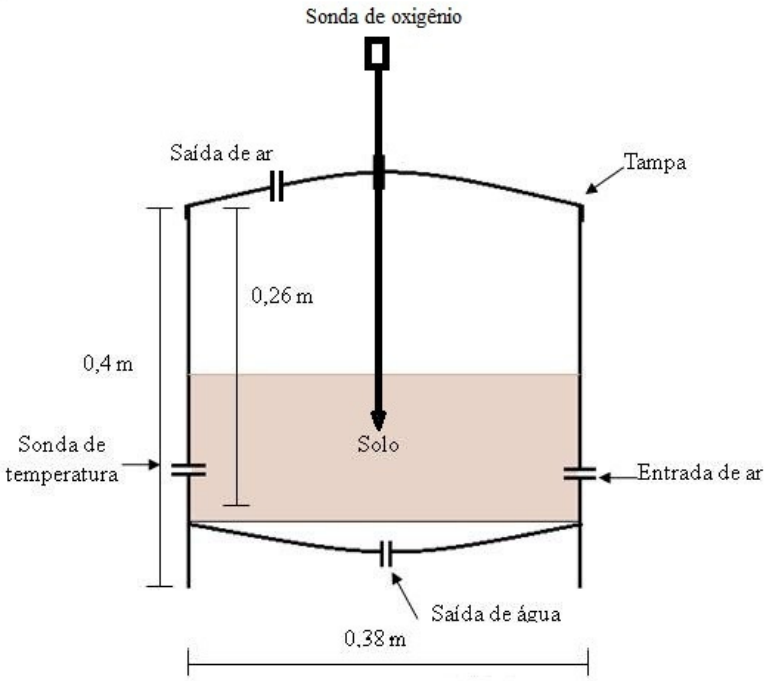


FIGURA 6: Esquema simplificado do biorreator utilizado nos experimentos de biorremediação de solo contaminado com organoclorados.

FIGURA 7: Foto dos biorreatores utilizados nos experimentos.

(Foto: Marina Bianchini de Salvi, 2011)

4.4. Material Biológico

Foi utilizado o basidiomiceto *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCIBt 2611 (CCB274) pertencente à Coleção de Cultura de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt) (Figura 8). Este fungo foi isolado de basidioma encontrado em madeira de mata de restinga no município de São Vicente, região da Baixada Santista, SP (Okino *et al.* 2000) e foi selecionado por degradar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em solo contaminado (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005a). Essa linhagem foi estudada por diversos autores em sistemas de biorremediação (Matheus & Bononi 2002, Matheus 2003, Ballaminut 2007, Silva 2009). A cultura foi mantida a 4º C em ágar extrato malte (MEA 2%), constituído de: extrato de malte 2 %, peptona 0,1 % e ágar 1,5 %.

FIGURA 8: *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 (CCB 274) cultivado e frutificado em bagaço de cana-de-açúcar (suplementado C/N 180), laboratório de Micologia Aplicada, Instituto de Botânica de São Paulo.

(Foto: Marina Capelari, 2002)

4.5. Preparo do inóculo fúngico

4.5.1. Pré inoculo

O fungo foi previamente crescido em placas de Petri contendo MEA 2 %, a 28 ºC, (Matheus 2003), até que o micélio ocupasse 3/4 da superfície da placa. Discos de 5 mm de diâmetro de crescimento micelial foram retirados da placa e inoculados no substrato sólido (item 4.5.2.) previamente esterilizado e resfriado à temperatura ambiente (Ballaminut & Matheus 2007), na proporção de 1 disco por 10,0 g de substrato úmido, sob condições assépticas.

4.5.2. Substrato sólido

O substrato foi constituído de bagaço de cana-de-açúcar picado misturado com farinha de soja e fécula de mandioca nas proporções de 20 e 30% (peso seco), respectivamente e a umidade ajustada para 70 % com água destilada (Okada, 2010). Alíquotas de 120 g de substrato sólido foram colocadas no fundo do saco plástico de polipropileno (20,0 x 40,0 cm) e modeladas na forma cilíndrica de modo a produzir inóculos nos formatos e dimensões propostas por Okada (2010) (Figura 9). Em seguida foram autoclavados por 90 min a 121 ºC (Ballaminut & Matheus 2007). Após resfriamento, discos de crescimento micelial do fungo foram inoculados nos sacos em condições assépticas na proporção 1:10 (disco : g de substrato úmido). Os inóculos foram incubados em estufa incubadora (ELETROLAB / 101 STD) sob controle de temperatura de 28 ± 2°C, durante 14 dias.

FIGURA 9: Bagaço de cana de açúcar picado misturado com farinha de soja e fécula de mandioca nas proporções de 20% e 30% (peso seco), autoclavado e modelado no fundo de saco de polipropileno para posterior inoculação de *L. crinitus*.

(Foto: Marina Bianchini de Salvi, 2011)

4.6. Preparo do solo contaminado para tratamento biológico

Ao solo contaminado foi adicionado 2,5 % (peso seco) de gesso comercial e uma solução de benomyl (10mg Kg^{-1} de solo) diluído em acetona P.A. para controle fúngico do solo (Machado *et al.* 2006). O solo foi dividido em sacos de polipropileno com 3,0 kg cada e homogeneização foi feita manualmente.

4.7. Condições de cultivo e biodegradação dos organoclorados

4.7.1. Processos de aeração na biorremediação *ex-situ* de solos contaminados com organoclorados

Após a incorporação do benomyl, 9,0 Kg de solo (seco) foram colocados dentro dos reatores e a umidade foi ajustada com água destilada esterilizada para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) do solo, de acordo com Matheus (2003). Em cada reator, foram incorporados 900,0 g (peso seco) de inóculo fúngico peletizado (dimensões aproximadas de 3,0 x 4,5cm) segundo Okada (2010) (Figura 10). As condições de cultivos analisadas foram: 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) com sistema de injeção de ar pressurizado e 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) sem injeção de ar, para revolvimento semanal do solo. Nos reatores, os solos foram homogeneizados manualmente com auxílio de uma colher de madeira esterilizada, em 3 etapas de 3,0 Kg de solo cada, durante 5 min.

Com os biorreatores cheios de solo, foi instalado um sensor de temperatura na região central da coluna de solo de cada reator, as tampas foram fechadas e vedadas e em 2 reatores foi injetado um fluxo de ar não esterilizado na parte inferior mantido sob baixa pressão (0,2 bar) por

válvulas e medidores nas saídas de ar. Todo o ar efluente dos reatores foi filtrado em carvão ativado, eliminando todos os resíduos organoclorados, e enviado para atmosfera externa da sala.

Os biorreatores foram incubados durante 56 dias em sala com temperatura controlada a 28 ± 2 ºC, no escuro.

4.7.2. Influência dos ácidos graxos insaturados e da concentração dos organoclorados na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611

Após a incorporação do benomyl, 9,0 Kg de solo (seco) foram colocados dentro dos reatores e a umidade foi ajustada com água destilada esterilizada para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) do solo, de acordo com Matheus (2003). Em cada reator, foram incorporados 900,0 g (peso seco) de inóculo fúngico peletizado (dimensões aproximadas de 3,0 x 4,5cm) segundo Okada (2010) (Figura 10). As condições de cultivos analisadas foram: 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p), utilizados como controle neste experimento, 2 reatores com 8% de uma emulsão de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) e 2 reatores com solo diluído para 10% da concentração inicial de organoclorados. A diluição do solo foi feita com a mistura manual do solo contaminado com solo não contaminado da mesma região, na proporção de (1:9 p/p) em saco de polipropileno. Nos reatores, os solos foram homogeneizados manualmente com auxílio de uma colher de madeira esterilizada, em 3 etapas de 3,0 Kg de solo cada, durante 5 min.

Com os biorreatoes cheios de solo, foi instalado um sensor de temperatura na região central da coluna de solo de cada reator, as tampas foram fechadas e vedadas e foi injetado um fluxo de ar não esterilizado na parte inferior mantido sob baixa pressão (0,2 bar) por válvulas e medidores nas saídas de ar. Todo o ar efluente dos reatores foi filtrado em carvão ativado,

eliminando todos os resíduos organoclorados, e enviado para atmosfera externa da sala. Os biorreatores foram incubados durante 56 dias em sala com temperatura controlada a 28 ± 2 ºC, no escuro.

FIGURA 10: inóculo de *L. crinitus* crescido em substrato peletizado, durante 14 dias a 28 ± 2° C, quebrado nas dimensões recomendadas por Okada (2010) para incorporação ao solo nos biorreatores.

(Foto: Marina Bianchini de Salvi, 2011)

4.7.3. Efeito da emulsão de óleo vegetal e surfactante na biodisponibilidade dos organoclorados no solo

O teste foi realizado em potes de tampa hermética com capacidade de 250,0 mL e fechados com gaze esterilizada na boca, para permitir trocas gasosas, onde foram colocados: 60,0 g de solo contaminado (base seca) após a incorporação do benomyl (10,0 mg Kg^{-1} de solo), água destilada esterilizada para ajustar a umidade para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) de acordo com Matheus (2003) e 5 % de emulsão de óleo vegetal e Tween 20 (9 : 1, p.p.), em triplicata (Figura 11). Como controle, avaliou-se o mesmo solo sem adição da

emulsão de óleo vegetal : tween 20, em triplicata. Os frascos foram incubados por 14 dias em sala com temperatura controlada a 28 ± 2 ºC, no escuro. A umidade do solo foi corrigida semanalmente, feita pela adição de água destilada esterilizada, de acordo com a perda de peso dos frascos (Matheus 2003).

A concentração dos compostos organoclorados do solo (item 4.8.10) foi determinada nos tempos 0, 7 e 14 dias de incubação.

Figura 11: Solo contaminado com diferentes concentrações de uma emulsão de óleo vegetal e tween 20.

(Foto: Marina Bianchini de Salvi)

4.8. Amostragem e análises do solo

Foram retiradas de cada reator amostras de 200,0 g de solo imediatamente após a inoculação do fungo e posteriormente aos 7, 14, 28 e 56 dias de incubação, com o auxílio de um trado esterilizado a cada coleta. As amostras foram acondicionadas em saco plástico de polipropileno e refrigeradas até o momento das seguintes análises:

4.8.1. Crescimento fúngico

O crescimento fúngico foi determinado pelo aumento da biomassa estimada pela quantidade de ergosterol extraído do inóculo, de acordo com o descrito por Silva *et al.* (2009).

Foram congeladas alíquotas de 2,0 g de cada amostra e posteriormente liofilizados por 24 hs (THERMO SAVANT – Mod. Modulyod). As amostras foram transferidas para frascos tipo Scoth, onde foram adicionados 26,0 mL de solução de saponificação, composta de 20,0 mL de álcool metílico P.A., 5,0 mL de álcool etílico P.A. e 2,0 g de hidróxido de potássio.

As amostras foram agitadas em mesa agitadora a 220 rpm (TECNAL / TE - 140), por 20 min e levadas a banho-maria (QUIMIS – Q 344B1) para saponificação, durante 40 min a 70 °C. Após resfriamento até temperatura ambiente foram adicionados 5,0 mL de água destilada esterilizada às amostras.

Todas as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas por 10 min a 10000 rpm (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R), à temperatura ambiente. Volume conhecido do sobrenadante foi transferido para um funil de separação onde foi adicionado igual volume de n-hexano P.A. Cada funil foi agitado manualmente por 3 min e mantido em repouso por mais 10 min. A fase n-hexano foi recuperada e o volume anotado.

Cada amostra foi evaporada em rota-evaporador (QUIMIS mod 344B1) a 40 °C, sob pressão. Após evaporação, cada amostra foi ressuspendida em 2,0 mL de metanol CLAE (MERCK) e armazenada em tubos eppendorf de 2,0 mL de capacidade para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, VARIAN – Varian ProStar 215).

4.8.2. Determinação do ergosterol

Alíquotas do extrato contendo ergosterol foram injetadas manualmente no CLAE. Para a separação do ergosterol foi utilizada uma coluna de fase reversa C - 18 (VARIAN 1215-9012) e metanol para CLAE isocrático como eluente, com taxa de fluxo de 2,0 mL min^{-1}. O tempo de retenção do ergosterol na coluna cromatográfica foi entre 4,4 e 4,5 min da injeção da amostra. As quantidades de ergosterol dos extratos foram estimadas com base em uma curva padrão estabelecida, construída com concentrações conhecidas de ergosterol cristalizado (SIGMA E-6510) diluído em metanol CLAE (Anexo 4).

4.8.3. Isolamento dos basidiomicetos

Foram retirados três amostras de solo contendo fragmentos do inóculo fúngico, os quais foram inoculados em extrato malte Ágar (2%), contendo o corante Azul de Remazol Brilhante Blue R (0,02%). Após cinco dias de incubação a 28 ºC foi avaliada a capacidade de crescimento e descoloração do corante e confirmação de crescimento dos basidiomicetos pela observação em microscópio ótico da presença de ansas na hifa fúngica, conforme descrito por Silva (2009).

4.8.4. Potencial hidrogeniônico do solo

O pH do solo foi determinado em 3 alíquotas de 10,0 g de solo cada, onde foi adicionado às amostras 90,0 mL de água deionizada (Milli-Q) e agitadas a 120 rpm, durante 30 min e repousadas durante 1h, de acordo com Matheus *et al.* (2003). A medida do pH foi feita em pHmetro digital, equipado com eletrodo combinado.

4.8.5. Determinação da umidade do solo dos reatores

Foi avaliada por gravimetria das amostras liofilizadas para quantificação de ergosterol.

4.8.6. Atividades enzimáticas

4.8.6.1. Obtenção do extrato enzimático do solo

O extrato enzimático bruto proveniente do cultivo em solo foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 na proporção de 1 : 3 (p/v). A homogeneização foi feita manualmente por 3 min, seguida de agitação em mesa agitadora a 120 rpm (TECNAL / TE - 140) durante 1 hora (Moreira-Neto 2006 modificado). O extrato obtido foi filtrado em membrana de filtração de 0,45µm de diâmetro

4.8.6.2 Atividades enzimáticas no extrato obtido de substrato sólido

4.8.6.2.1. Oxidação total do ABTS

Foi determinada pela oxidação do ABTS (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)), medida pela variação de absorbância a 420 nm (ε = 36000 M^{-1} cm^{-1}) durante 10 min, em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC – GENESYS 10S UV-Vis), segundo método descrito por Machado & Matheus (2006). A mistura de reação em 1,0 mL continha: 250,0 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50,0 µL de solução de peróxido de hidrogênio 2 mM; 100,0 µL de solução de ABTS 5 mM e 600,0 µL de extrato enzimático. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 µMol de ABTS por minuto.

4.8.6.2.2. Lacase

Foi determinada pela oxidação do ABTS (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)), medida pela variação de absorbância a 420 nm (ε = 36000 M^{-1} cm^{-1}) durante 10 min, em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC – GENESYS 10S UV-Vis), segundo método descrito por Machado & Matheus (2006). A mistura de reação para determinação da atividade de lacase continha em 1,0 mL: 250,0 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50,0 µL de água MilliQ; 100,0 µL de solução de ABTS 5 mM e 600,0 µL de extrato enzimático (Machado & Matheus 2006). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 µMol de ABTS por minuto.

4.8.6.2.3. Peroxidases

A determinação das peroxidases totais foi dada pela diferença entre a oxidação total do ABTS e a atividade de lacase (Eggert *et al.* 1996).

4.8.6.2.4. Peroxidase dependente do manganês (MnP)

Foi determinada de acordo como descrito por Kuwahara *et al.* (1984). A reação (em 1,0 mL) constituiu de: 300,0 µL de solução A (tampão succinato de sódio 0,2 M pH 4,5, lactato de sódio 0,1 M e albumina bovina 0,5 %), 50,0 µL de solução de sulfato de manganês 2 mM, 100,0 µL de solução de vermelho de fenol 0,1 %, 50,0 µL de solução de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500,0 µL de extrato enzimático. A reação teve início pela adição do peróxido de hidrogênio e foi feito acompanhamento da variação da absorbância em a 610 nm, em intervalos de 2 min durante 10 min, interrompendo a reação com adição de 50,0 µL de solução de hidróxido de sódio

2N. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 μMol de substrato por minuto. Foram construídos gráficos com as absorbâncias lidas nesses intervalos para determinação do coeficiente angular da reta, que foram considerados sempre que os coeficientes de correlação linear (r^2) foram maiores que 0,90.

4.8.7. Monitoramento do teor de oxigênio do solo

A medida do teor de oxigênio do solo foi feita diariamente por uma sonda detectora de oxigênio (EIJKELKAMP) inserido no meio da coluna de solo do reator, com variação de 0 a 25%.

4.8.8. Monitoramento da temperatura do solo

A temperatura do solo foi monitorada diariamente às 15:00 h, acoplando-se um termômetro de solo (mod. SalvTerm 700 - Gulton) à sonda instalada na região central da pilha de solo no biorreator.

4.8.9. Determinação da microbiota do solo (contagem de UFC de fungos e bactérias)

Foi determinada no tempo 0 e 56 dias de cultivo pelo método de "pour-plate" a partir da inoculação de 1,0 mL da suspensão de solo (10,0 g de solo em 90,0 mL de solução salina a 0,85% agitados em mesa agitadora durante 30 min a 120 rpm) em meio de cultura nutriente Ágar (18,0 g de Ágar, 5,0 g de peptona bacteriológica e 3,0 g de extrato de carne) para isolamento de bactérias (24 e 48 h de incubação) e em meio de Martin (até 7 dias de incubação) para fungos.

4.8.10. Quantificação dos organoclorados

A extração dos organoclorados no solo foi feita por microondas, de acordo com método descrito por Andrea *et al.* (2001) modificado. Três alíquotas de 3,0 g cada foram transferidas para frascos de 30,0 mL com tampa de rosca teflon. Em seguida, foram adicionados 10,0 mL de solução acetona : n-hexano (25:75, v/v.). Os frascos foram colocados dentro do microondas de forma simétrica e aquecidos por 16 ciclos de 41 segundos a 240 watts de potência. A cada ciclo os frascos foram resfriados em banho de gelo para evitar fervura e perda da amostra por volatilização. Após resfriamento, a fase n-hexano foi removida com uma pipeta pasteur, o volume recuperado foi medido e transferido para outro frasco de 30,0 mL. Os extratos foram congelados para posterior análise em CG/MS.

As análises quantitativas e qualitativas dos organoclorados foram realizadas em cromatógrafo a gás (Varian CP-3800) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian Saturn 2200), equipado com detector FID, injetor split/splitless e coluna VF-5ms (VARIAN) composta por 5% Difenil e 95% Dimetil Polisiloxano (30 m x 0.25 mm x 0,25 μm). O gás de arraste foi hélio com um fluxo de 1,0 mL min^{-1}, com modo split de 50 vezes. A temperatura de operação foi de 260 ºC no injetor. O programa de temperatura da coluna foi 100 ºC durante 1:00 min, aumentou 4 ºC min^{-1} até 230 ºC, permanecendo por 34:30 min nessa temperatura e por fim aumentou 35 ºC min^{-1} até 280 ºC permanecendo por 4 min. As amostras analisadas foram originárias dos extratos dos ^{14}C-compostos solúveis, diluídas 10 vezes em n-hexano (UV-análise de resíduo da Merk) e filtradas em filtro millex HV 13 mm (ns f-slip da Millipore). A identificação individual dos compostos foi baseada no tempo de retenção relativo a uma mistura de padrões que incluía: HCB, pentaclorobenzeno (PeCB) e tetraclorobenzeno (TCB) (Anexos 1, 2 e 3). A quantificação dos organoclorados nas amostras de solo foi calculada sobre

concentrações definidas que formam a curva padrão de cada composto. Para a identificação dos compostos utilizou-se a biblioteca de dados NIST.

4.9. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico MiniTab versão Release 15. As médias foram comparadas pelo teste de Tuckey sempre protegida por análise de variância (ANOVA) ($\alpha \leq 0,05$). Os dados percentuais foram transformados de acordo com a fórmula abaixo (Vieira & Hoffmann 1989).

$$\text{Valor transformado} = \text{arcsen}\sqrt{valorem\%/100}$$

Onde:

Arcsen = arcoseno

valor % = valor percentual dos compostos recuperados

ARTIGO I

Processos de aeração na biorremediação *ex-situ* de solos contaminados com organoclorados

Marina Bianchini de Salvi[1, 2*], Dácio Roberto Matheus[1,3]

[1]Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

[2]Pós-graduanda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo;

[3]Professor Titular da Universidade Federal do ABC;

[*] Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 5067-6067. E-mail: ma_bianchini@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de *L. crinitus* em solo contaminado acondicionado em biorreator com capacidade para 10,0 Kg de solo e a eficiência do sistema de aeração. Solo contaminado com organoclorados (hexaclorobenzeno e pentaclorobenzeno) foi esterilizado com benomyl. Lotes de 9,0 Kg de solo foram transferidos para biorreatores. Ao solo foram incorporados: 5% de emulsão de óleo vegetal e tween 20 (9:1), 2,5% de gesso comercial e 900,0 mg de *L. crinitus*, crescido em bagaço de cana misturado com farinha de soja e fécula de mandioca (20 e 30%). Foi instalado um sensor de temperatura nos biorreatores, e injetado um fluxo de ar não esterilizado para atingir pressão de 0,2 Bar. Como controles foram utilizados biorreatores sem pressão com revolvimento semanal do solo. Incubação dos biorreatores foi feita durante 56 dias, a 28ºC. Foram observadas atividades enzimáticas durante todo período de crescimento de *L. crinitus* e um efeito significativo da aeração pressurizada, sendo que pH variou de 4,0 a 3,8 ao final do tempo de incubação. O teor de oxigênio nos reatores com revolvimento do solo variou entre 19 e 21% e nos reatores pressurizados a porcentagem variou entre 23 e 25%. Crescimento de *L. crinitus* foi semelhante em todas as condições analisadas até 14 dias de incubação, a partir daí observou-se um aumento da biomassa nos reatores pressurizados. *L. crinitus* foi capaz de degradar 36,3% de HCB, 35,4% de PeCB e 22,9% dos TCB totais nos reatores pressurizados, não sendo observada degradação destes compostos nos reatores não pressurizados.

Palavras-chaves: biorreatores, aeração, biodegradação, organoclorados, *Lentinus crinitus*

Abstract

The goal of this study was to evaluate the growth of *L. crinitus* in contaminated soil packed in bioreactor with 10 kg capacity as well as the efficiency of the aeration system. Contaminated soil with organochlorine compounds (hexachlorobenzene and pentachlorobenzene) was sterilized with benomyl. Batches of 9,0 kg of soil were transferred to bioreactors. It was incorporated to the soil: 5% of emulsion of vegetable oil and tween 20 (9:1), 2,5% of commercial gypsum and 900,0 mg of *L. crinitus* grown in sugarcane bagasse mixed with soy flour and cassava flour (20% and 30%). It was installed a heating sensor in the bioreactor, and injected a non-sterile air flow to achieve pressure of 0,2 bar. For controlling purposes were used unpressurized bioreactors with weekly tilling soil. Incubation of bioreactors was performed for 56 days at 28 ºC. Enzymatic activities were observed during all the growth period of *L. crinitus* and a significant effect of pressurized aeration, pH ranged from 4.0 to 3.8 at the end of the incubation time. Oxygen content in the reactors with tilling soil varied between 19% and 21% and in the reactors with pressurized air the percentage ranged from 23 to 25%. Growth of *L. crinitus* was similar under all conditions studied up to 14 days of incubation, thereafter noticing an increase in biomass in pressurized reactors. *L. crinitus* was able to degrade 36,3% of HCB, 35,4% of PeCB and 22,9% of total TCB in pressurized reactors, and it wasn't observed degradation of these compounds in the unpressurized reactors.

Key words: bioreactors, aeration, biodegradation, organochlorine, *Lentinus crinitus*

Introdução

O crescimento industrial e urbano aumentou a complexidade dos resíduos lançados no meio ambiente, provocando sérios problemas de ordem ecológica e toxicológica. A partir do século passado, vários compostos foram sintetizados e introduzidos no mercado pelas indústrias, sem avaliação prévia do seu impacto ambiental, acumulando-se no ambiente. Esse acúmulo foi devido à ausência de decompositores naturais, além de consequente não participação dos compostos sintéticos nos ciclos biogeoquímicos. Considerando ainda a estabilidade desses compostos, sob condições aeróbias e anaeróbias, existe ainda a possibilidade da persistência e da recalcitrância de tais compostos no ambiente. O resultado foi, em muitos casos, a poluição do meio por contaminantes tóxicos, colocando em risco a saúde humana e a integridade dos ecossistemas (Leisinger 1983, Häggblom 1992, Boopathy 2000, Pointing 2001, Semple *et al.* 2001, Rabinovich *et al.* 2004, Jiang *et al.* 2006).

Propostas de tratamento para os problemas ambientais foram sugeridas, com opções de tratamento que incluem a disposição do material contaminado em aterros sanitários, sua incineração ou ainda a biorremediação desse material. Essa última opção é uma tecnologia alternativa que, por utilizar metabolismos degradativos do próprio ambiente em questão, ser realizada em temperatura e pressão ambiente, além de assemelhar-se a um manejo na área comprometida, tem baixo custo e pode ser mais segura do ponto de vista ambiental. Além disso, os sistemas biológicos de tratamento podem promover a transformação do composto poluente, desde a simples retirada de um átomo até a mineralização, com a oxidação completa, obtendo produtos finais inócuos. Estes sistemas não geram resíduos sólidos, quando conduzidos *in situ*, sendo assim, menos impactantes. Além do mais, esse tipo de tratamento pode ser projetado para tratar sólidos, lodos, água e gases contaminados (Atlas 1993, Shannon & Unterman 1993, Häggblom & Valo 1995, Matheus & Machado 2002, Eerd

et al. 2003, Sutherland *et al.* 2004, Rizzo *et al.* 2006, Field & Sierra-Alvarez 2008, Harms *et al.* 2011, Kulikova *et al.* 2011).

Alguns dos agentes primários da decomposição da matéria orgânica, muito utilizados em biorremediação, são os fungos, que são capazes de crescer sob as condições de estresse que limitam o crescimento bacteriano. Além disso, o modo de crescimento dos fungos, induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono, por meio do alongamento e ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, aumentando o contato superficial com o contaminante, melhorando os níveis de biodegradação. Se a contaminação é relativamente resistente a biodegradação, geralmente utilizam-se fungos basidiomicetos inoculados para iniciar o ataque metabólico (Matheus & Machado2002; Rabinovich *et al.* 2004).

Fungos basidiomicetos possuem a capacidade de degradar uma série de compostos orgânicos recalcitrantes, como a lignina e diversas classes de poluentes, tais como: clorofenóis, nitrofenóis, hidrocarbonetos poliaromáticos e outros. O metabolismo dos compostos poluentes por esses fungos está relacionado ao mecanismo usado por estes organismos para degradar a lignina (Matheus & Okino 1998, Tuomela *et al.* 2000, Pointing 2001, Tortella *et al.* 2005, Harms *et al.* 2011).

Alguns basidiomicetos nativos do Estado de São Paulo foram selecionados para aplicação em tratamentos ambientais de solos contaminados, por sua capacidade de degradar compostos organoclorados. *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 (CCB274) e *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 (CCB444) são dois desses fungos selecionados e estão sendo estudados em escala de laboratório com taxas de degradação de até 40,0% de hexaclorobenzeno (HCB) e 99,9% de pentaclorofenol (PCF), apesar de não apresentar resultados tão significativos em escala de campo (Matheus *et al.* 2000, Okino *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Bononi 2002, Matheus *et al.* 2003, Machado *et al.* 2005, Machado *et al.* 2006, Ballaminut 2007, Salvi 2008, Silva 2009, Okada 2010).

A aeração do solo é de fundamental importância para o crescimento de fungos empregados em sistemas de tratamento e também para a natureza das reações de degradação dos compostos poluentes (Dupont *et al*. 1998), sendo um parâmetro operacional crítico em processos de fermentação em substrato sólido (Hwang *et al.* 2006). Além de promover a oxigenação do solo, o sistema de aeração nos biorreatores contribui para manter a temperatura do solo próxima à temperatura ótima de crescimento do micro-organismo utilizado, já que a variação da temperatura é um dos fatores que afetam diretamente no crescimento fúngico em substrato sólido, necessitando de controle durante o processo (Gowthaman *et al.* 2001). Iqbal *et al.* (2007) mostram efeito positivo na biorremediação com a otimização da temperatura em sistemas de tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos poliaromáticos e compostos fenólicos. Troquet *et al.* (2003) em estudo de biorremediação observaram que as melhores taxas de biodegradação foram obtidas nos tratamentos onde a oxigenação foi constante. Rhykerd *et al.* (1999) em estudo de biorremediação de solos contaminados por compostos oleosos ressalta que a aeração adequada é essencial para a atividade de microrganismos degradadores de óleos.

Silva (2009) não observou biodegradação de HCB por *Lentinus crinitus* (CCIBt 2611) em reatores de 400 kg de solo sob aeração, sugerindo que a formação de caminhos preferenciais de circulação do ar pode ter gerado zonas mortas no interior dos reatores, inibindo a biodegradação do composto.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência e eficiência da aeração sob pressão e o revolvimento do solo em reatores durante o processo de biorremediação de solo contaminado com organoclorados.

Material e Métodos

Solo: contendo organoclorados, principalmente hexaclorobenzeno (HCB), pentaclorobenzeno (PeCB) e isômeros de tetraclorobenzeno (TCBs), oriundo de áreas contaminadas na região de restinga do Distrito de Samaritá, São Vicente, SP. O solo apresenta 98% areia, pH 5,07, capacidade de troca iônica de 5,50 mEq. 100 mL^{-1}, 0,13% de matéria orgânica, 0,06% nitrogênio, 1,00 $\mu g\ g^{-1}$ fósforo e 0,01 mEq. 100 mL^{-1} potássio, determinadas pelo laboratório "Lagro – Laboratório Agronômico" S/C de Campinas.

Material Biológico: foi utilizado o basidiomiceto *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCIBt 2611 (antes identificado por CCB274) pertencente à Coleção de Cultura de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt). Este fungo foi isolado de basidioma encontrado em madeira de mata de restinga no município de São Vicente, região da Baixada Santista, SP (Okino *et al.* 2000) e foi selecionado por degradar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em solo contaminado (Machado *et al.* 2005, Matheus *et al.* 2000). A cultura foi mantida a 4 ºC em ágar extrato malte (MEA 2%), constituído de: extrato de malte 2 %, peptona 0,1 % e ágar 1,5 %.

Inóculo fúngico: o substrato foi constituído de bagaço de cana-de-açúcar picado misturado com farinha de soja e fécula de mandioca nas proporções de 20 e 30% (peso seco), respectivamente e a umidade ajustada para 70 % com água destilada (Okada 2010). Alíquotas de 120,0 g de substrato sólido foram colocadas no fundo do saco plástico de polipropileno (20,0 x 40,0 cm) e modeladas na forma cilíndrica de modo a produzir inóculos na forma de peletes nas dimensões aproximadas de 3,0 x 4,5 cm, propostas por Okada (2010). Foram autoclavados por 90 min a 121 ºC (Ballaminut & Matheus 2007). Após resfriamento, discos de crescimento micelial do fungo em MEA 2% foram inoculados nos sacos em condições

assépticas na proporção 1:10 (disco : g de substrato úmido). Os inóculos foram incubados em estufa incubadora (ELETROLAB / 101 STD) sob controle de temperatura de 28 ± 2 °C, durante 14 dias.

Condições de cultivo: ao solo contaminado foram adicionados 2,5% (peso seco) de gesso comercial e uma solução de benomyl (10,0 mg K g^{-1} de solo), para controle fúngico do solo (Machado *et al.* 2006). Após a incorporação do benomyl, 9,0 Kg de solo (seco) foram colocados dentro de cada reator, com 5% de emulsão de óleo de soja comercial e tween 20, (9:1, p/p) e a umidade ajustada com água destilada esterilizada para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) do solo, de acordo com Matheus (2003). Em cada reator, foram incorporados 900,0 g (peso seco) do inóculo fúngico. As condições de cultivos analisadas foram: 2 reatores com sistema de injeção de ar sob pressão e 2 reatores sem injeção de ar, com revolvimento semanal do solo. Os solos foram homogeneizados manualmente com auxílio de uma colher de madeira esterilizada, em 3 etapas de 3,0 Kg de solo cada, durante 5 min. Em cada biorreator foi instalado um sensor de temperatura na região central da coluna de solo, a tampa foi fechada e vedada. Em 2 reatores foi injetado um fluxo de ar não esterilizado na parte inferior mantido sob baixa pressão (0,2 bar) por válvulas e medidores nas saídas de ar. Todo o ar efluente dos reatores foi filtrado em carvão ativado, eliminando os resíduos organoclorados, e enviado para atmosfera externa da sala. Pela tampa de cada reator foi inserida uma sonda medidora de oxigênio (EIJKELKAMP) até a parte central da coluna de solo. Os biorreatores foram incubados durante 56 dias em sala com temperatura controlada a 28 ± 3 ºC, no escuro.

Amostragem e análise do solo: de cada reator foram retiradas amostras de 200,0 g de solo imediatamente após a inoculação do fungo e posteriormente aos 7, 14, 28 e 56 dias de

incubação, com o auxílio de um trado amostrador de solo (50,0 x 2,5cm) esterilizado a cada coleta para as seguintes análises:

- **Crescimento fúngico:** foi determinado pela quantificação de ergosterol, extraído a partir de amostra de 3,0 g de solo por saponificação alcoólica e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Silva *et al.* (2009).

- **Isolamento de basidiomicetos:** foram retirados três amostras de solo contendo fragmentos do inóculo fúngico, os quais foram inoculados em extrato malte ágar (2%), contendo o corante Azul de Remazol Brilhante Blue R (RBBR 0,02%). Após cinco dias de incubação a 28º C foi avaliada a capacidade de crescimento e descoloração do corante e confirmação de crescimento dos basidiomicetos pela observação em microscópio ótico da presença de ansas na hifa fúngica, conforme descrito por Silva (2009).

- **pH:** suspensão de 10,0 g solo em 90,0 mL de água deionizada (em triplicata), foi agitada por 30 min e repousada por 60 mim. A medida do pH foi feita em pHmetro digital, equipado com eletrodo combinado.

- **Umidade do solo:** avaliada por gravimetria das amostras liofilizadas para quantificação de ergosterol.

- **Contagem de unidades formadoras de fungos e bactérias:** foi determinada pelo método de "pour-plate" a partir da inoculação de 1,0 mL da suspensão de solo (10 g de solo em 90 mL de solução salina a 0,85%) em meio de cultura nutriente ágar (NA)

para isolamento de bactérias (24 e 48 h de incubação) e em meio de Martin para fungos (até 7 dias de incubação).

- **Monitoramento do teor de oxigênio do solo:** feito diariamente por uma sonda detectora de oxigênio (EIJKELKAMP) inserido no meio da coluna de solo dos reatores, com variação de 0 a 25%.

- **Monitoramento da temperatura do solo:** feito diariamente às 15:00 h, acoplando-se um termômetro de solo (mod. SalvTerm 700 - Gulton) à sonda instalada na região central da pilha de solo nos biorreatores.

- **Atividades enzimáticas:** o extrato enzimático bruto do solo foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 na proporção de 1:3 (p/v), de acordo com Machado *et al.* (2006). As atividades de oxidação total do ABTS e Lacase foram determinadas pela oxidação do ABTS (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)), medida pela variação de absorbância a 420 nm (ε = 36000 M^{-1} cm^{-1}) durante 10 min, em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC – GENESYS 10S UV-Vis), na presença e ausência de peróxido de hidrogênio (Machado & Matheus 2006). Peroxidase foi quantificada pela diferença entre a oxidação total do ABTS e a atividade de lacase (Eggert *et al.* 1996). Peroxidase dependente de manganês (MnP) foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol (Kuwahara *et al.* 1984). Para todas as enzimas uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol do substrato por minuto.

- **Quantificação dos organoclorados:** a extração dos organoclorados no solo foi feita por micro-ondas, de acordo com método descrito por Andrea *et al.* (2001) modificado.

As quantificações foram realizadas em cromatógrafo a gás (Varian CP-3800) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian Saturn 2200), equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor split/splitless e coluna VF-5ms (VARIAN) composta por 5% Difenil e 95% Dimetil Polisiloxano (30 m x 0.25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste foi hélio com um fluxo de 1,0 mL min^{-1}, com modo split de 50 vezes. A temperatura de operação foi de 260 ºC no injetor. O programa de temperatura da coluna foi 100 ºC durante 1:00 min, aumentou 4 ºC min^{-1} até 230ºC, permanecendo por 34:30 min nessa temperatura e por fim aumentou 35 ºC min^{-1} até 28 0ºC permanecendo por 4 min. As amostras analisadas foram diluídas 10 vezes em n-hexano (UV-análise de resíduo da Merk) e filtradas em filtro millex HV 13 mm (ns f-slip da Millipore). A identificação individual dos compostos foi baseada no tempo de retenção relativo a uma mistura de padrões que incluía: HCB, pentaclorobenzeno (PeCB), pentacloroanisol (PCA), pentaclorofenol (PCF) e isômeros de tetraclorobenzeno (TCB). A quantificação dos organoclorados nas amostras de solo foi feita usando a curva padrão construída para cada composto.

Teste do efeito da emulsão de óleo vegetal e surfactante na biodisponibilidade dos organoclorados no solo: O teste foi realizado em potes de tampa hermética com capacidade de 250,0 mL e fechados com gaze esterilizada na boca, para permitir trocas gasosas, onde foram colocados: 60,0 g de solo contaminado (base seca) após a incorporação do benomyl (10,0 mg Kg^{-1} de solo), água destilada esterilizada para ajustar a umidade para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) de acordo com Matheus (2003) e 5 % de emulsão de óleo vegetal e Tween 20 (9 : 1, p.p.), em triplicata. Como controle avaliou-se o mesmo solo sem adição da emulsão de óleo vegetal : tween 20, em tripilicata. Os frascos foram incubados por 14 dias em estufa incubadora com temperatura controlada a 28 ± 2 ºC, no escuro. A umidade do solo foi corrigida semanalmente por gravimetria (Matheus 2003). A

concentração dos compostos organoclorados do solo foi determinada nos tempos 0, 7 e 14 dias de incubação.

Análise estatística: Os dados foram analisados pelo programa estatístico MiniTab versão Release 15. As médias foram comparadas pelo teste de Tuckey sempre protegida por análise de variância (ANOVA) ($\alpha \leq 0,05$).

Resultados e discussão

Crescimento microbiano e oxigenação do solo

O crescimento de *L. crinitus* foi semelhante em todas as condições analisadas até 14 dias de incubação, onde a partir daí observou-se um aumento significativo da biomassa de *L. crinitus* nos reatores com injeção de ar sob pressão. A quantidade de ergosterol nos reatores pressurizados variou de 879,59 ± 271,38 $\mu g\ g^{-1}$ a 33884,10 ± 246,26 $\mu g\ g^{-1}$ ao final de 56 dias (Figura 1). Nos reatores com revolvimento de solo, a quantidade de biomassa de *L. crinitus* manteve-se estável até o final do período de incubação (56 dias).

Embora não tenha sido observado um aumento da biomassa de *L. crinitus* nos biorreatores com revolvimento do solo, foi possível isolá-lo do solo em todas as amostras até o final do período de incubação, o que pode ser evidenciado pelas análises de descoloração do RBBR (Tabela 1), atividade enzimática e degradação dos organoclorados.

O crescimento de *L. crinitus* nos biorreatores com injeção de ar sob pressão foi altamente significativo a partir dos 14 dias de incubação, quando foram determinadas as maiores quantidades de ergosterol. Alguns autores afirmam que a idade fisiológica, as características do meio de cultivo e a concentração de organoclorados podem influenciar o metabolismo do ergosterol nas células de algumas espécies fúngicas (Davis & Lamar 1992,

Srinivasan & Glaser 1999, Barajas-Aceves *et al*. 2002, Silva *et al.* 2009). Silva *et al.* (2009) estudando as taxas de ergosterol em *L. crinitus* constatou que não há interferência da concentração de HCB na taxa de ergosterol desta espécie fúngica, corroborando aos dados apresentados, onde constata-se que o ergosterol evidencia o significativo crescimento do fungo no solo.

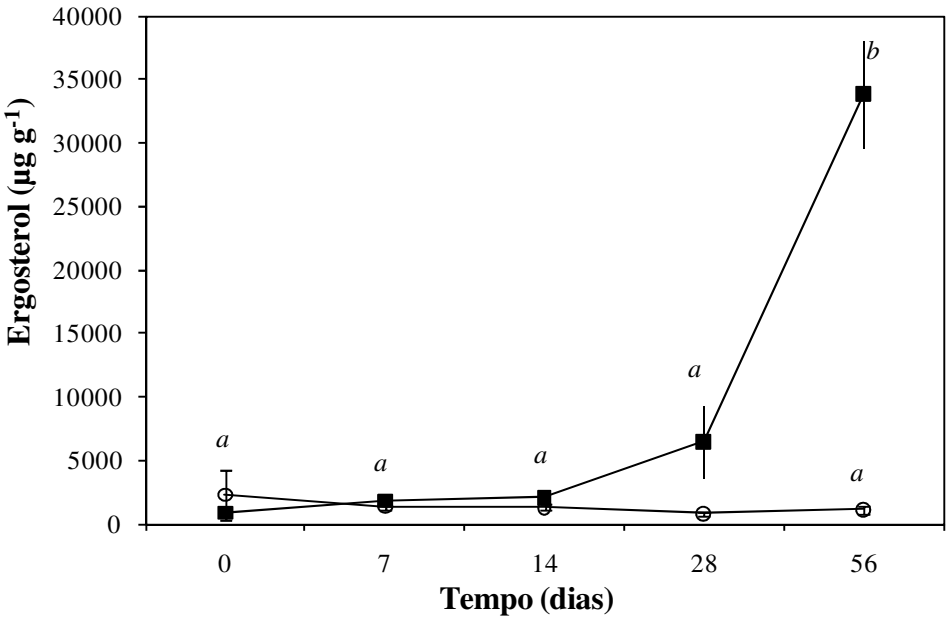


Figura 1: Crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ■ reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo, durante 56 dias de incubação a 28 ± 3 ºC (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, P<0,05)

Silva (2009) em estudo de biodegradação de compostos organoclorados, principalmente HCB, em solo utilizando também o basidiomiceto *Lentinus crinitus* acondicionado em biorreator com capacidade para 400 Kg de solo e com sistema de injeção de ar (1,5 m^3 h^{-1}), porém sem pressão, também observou crescimento de *L. crinitus* pela estimativa de ergosterol, porém as quantidades de ergosterol observadas pelo autor foram muito inferiores (cerca de 13 µg ergosterol Kg^{-1} solo) às obtidas neste estudo (34000 µg ergosterol Kg^{-1} solo). O autor afirma que apesar de a oxigenação do solo ser necessária para o

desenvolvimento dos fungos e para as reações de oxidação dos compostos organoclorados, ela pode ser comprometida pela formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar através do solo, originando setores com menor oxigenação, o que também foi observado por outros autores (Dupont *et al.* 1998, Heerenklage *et al*. 1998). Silva (2009) ressalta ainda que a retirada de amostras de solo dos biorreatores pode ter originado setores com menor densidade, podendo também formar caminhos preferenciais do fluxo de ar. Heerenklage *et al*., (1998) sugere que a formação de pressão nos sistemas de biorremediação de solo pode impedir a formação de caminhos preferências no solo, embora ele não tenha obtido dados que atestem tal afirmação. Tal hipótese foi confirmada, conforme pode ser observado com os resultados significativos de crescimento fúngico, atividade enzimática e degradação dos organoclorados obtidos. Em que pese saber em estudos em microcosmos, com pequenas quantidades de solo, a oxigenação do solo não é um fator limitante. Moreira-Neto (2006) observou crescimento de *Psilocybe castanella* em solo contaminado com HCB (1104 mg HCB Kg^{-1} solo) em microcosmos com taxas bem semelhantes as observadas neste estudo, onde também foi registrado um aumento significativo da biomassa fúngica ao final de 50 dias de incubação. Novotný *et al.* (1999) em estudo em microcosmos, observaram a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (50 mg Kg^{-1} solo) em solo por 3 basidiomicetos (*Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*) em biorreator com aeração sem pressão e observou crescimento significativo dos fungos até 21 dias de incubação, porém com taxas muito inferiores (cerca de 10,96 µg ergosterol g^{-1} solo).

Foi possível isolar *L. crinitus* metabolicamente ativo até o final do período de incubação em todas as condições avaliadas (Tabela 1), através da análise de descoloração do RBBR, corante derivado do antraceno muito utilizado para indicar atividade ligninolítica (Soares *et al.* 2001, Trupkin *et al.* 2003, Bôer *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005, Machado & Matheus 2006, Vitali *et al.* 2006, Silva 2009). Trabalhos demonstram que a descoloração do

corante RBBR está relacionada, pelo menos parcialmente, com a ação de enzimas ligninolíticas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (Deveci *et al.* 2004, Palmieri *et al.* 2005).

Tabela 1: Isolamento de *L. crinitus* nas amostras simples de coluna de solo, em triplicata

Biorreatores	**Tempo de incubação (dias)**				
	0	**7**	**14**	**28**	**56**
Aeração sob pressão	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**
Revolvimento do solo	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**

+ indica crescimento de *L.crinitus* confirmado pela descoloração de RBBR e observação microscópica, em cada réplica da amostra.
- indica ausência de crescimento de *L.crinitus* na réplica analisada.

Além da descoloração do corante RBBR observou-se a presença de ansa no micélio fúngico, evidenciando tratar-se do basidiomiceto. Esses dados obtidos corroboram com a análise de crescimento fúngico pela estimativa de ergosterol, onde foi possível quantificar ergosterol até 56 dias de incubação de *L. crinitus*. Em seus estudos Silva (2009) também observou *L. crinitus* metabolicamente ativo, através da descoloração do RBBR por até 56 dias de incubação nos biorreatores. Valentín *et al.* (2007) em estudo de biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em biorreator, também isolou o fungo *Bjerkandera adusta* metabolicamente ativo após 21 dias de incubação, pela análise de descoloração do corante Poly R-478 em placa.

Na primeira amostragem não foram isoladas colônias bacterianas em nenhuma das condições avaliadas. Poucas colônias fúngicas (contaminantes) foram observadas nos reatores pressurizados, evidenciando assim eficiência do controle de fungos do solo pelo uso do benomyl (Tabela 2).

Tabela 2: Contagem de UFCs bacterianas e de fungos contaminantes no solo aos 0 e 56 dias de incubação nos biorreatores

Biorreatores	Bactérias (UFC g^{-1} solo) x 10^3		Fungos (UFC g^{-1} solo) x 10^3	
	0 dias	56 dias	0 dias	56 dias
Aeração sob pressão	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	0,594 (±0,39)	23,94 (±18,00)
Revolvimento do solo	0,00 (±0,00)	317,7 (±209,70)	0,00 (±0,00)	175,5 (±81,90)

UFCs = unidades formadoras de colônia

A injeção de ar não esterilizado nos biorreatores permitiu a entrada de outros microrganismos durante o período de incubação (Tabela 2), o que é de se esperar em tratamentos em larga escala de solo, uma vez que seja inviável do ponto de vista operacional e financeiro o procedimento de esterilização de grandes volumes de solo e de ar (Alexander 1999, Dupont *et al*. 1998, Holroyd & Caunt 1995). Se por um lado a competição com outros microrganismos pode interferir na colonização inicial de basidiomicetos (Holroyd & Caunt 1995), por outro lado, o crescimento de microrganismos oportunistas pode ser eficiente para a degradação de poluentes, como foi observado por Field & Sierra-Alvarez (2008) na degradação de clorofenóis. A introdução de bagaço de cana de açúcar no solo também pode ter favorecido o crescimento de bactérias e fungos no solo, como observado por Nakagawa e Andrea (2006), que também demonstraram que a utilização de bagaço de cana-de-açúcar favoreceu a proliferação de fungos e bactérias autóctones de solo contaminado por HCB.

Observa-se portanto, que a aeração dos reatores sob pressão promoveu uma situação otimizada para o crescimento dos basidiomicetos nos reatores quando comparadas aquelas observadas por Silva (2009), trabalhando sem a pressurização do ar e com os estudos em microcosmos, onde a oxigenação do solo não é fator limitante. Estes dados são evidenciados pelas condições de oxigenação observadas nos reatores. O teor de oxigênio nos reatores com revolvimento do solo foi inferior, variando entre 19 e 21% (porcentagem de oxigênio sob

pressão atmosférica) e nos reatores com injeção de ar sob pressão a porcentagem foi significativamente superior, variando entre 23 e 25% (0,2 bar) (Figura 2).

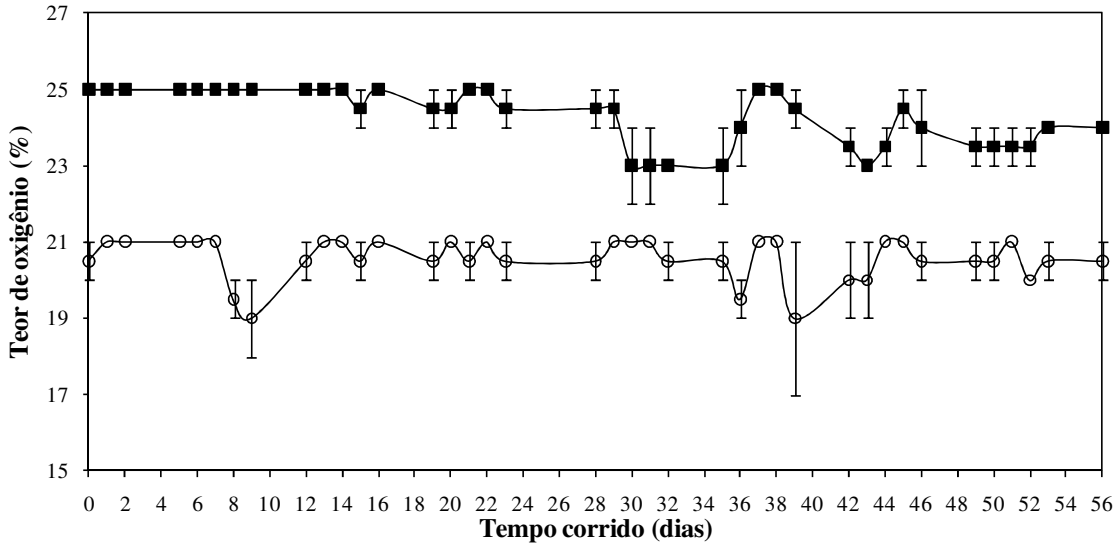


Figura 2: Teor de oxigênio do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados (■ reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo), durante 56 dias de incubação a 28 ± 3 ºC (Barras de erro ± desvio médio).

Umidade, pH e temperatura

Houve uma diminuição da umidade do solo nos biorreatores a partir da umidade determinada inicialmente em todas as condições avaliadas até 14 dias de incubação (figura 3). A umidade inicial foi de 16,55% nos reatores com injeção de ar sob pressão e 18,75% nos reatores com revolvimento semanal do solo, essa umidade diminui consideravelmente aos 14 dias de incubação, 7,88% nos reatores com injeção de ar sob pressão e 14,13% nos reatores com revolvimento semanal do solo, quando houve a necessidade de se ajustar a umidade dos solos com água destilada esterilizada. A umidade manteve-se estável até o final do período de incubação nos reatores com revolvimento semanal do solo. Nos reatores com injeção de ar

sob pressão observou-se uma diminuição significativa da umidade do solo aos 56 dias de incubação de *L. crinitus*.

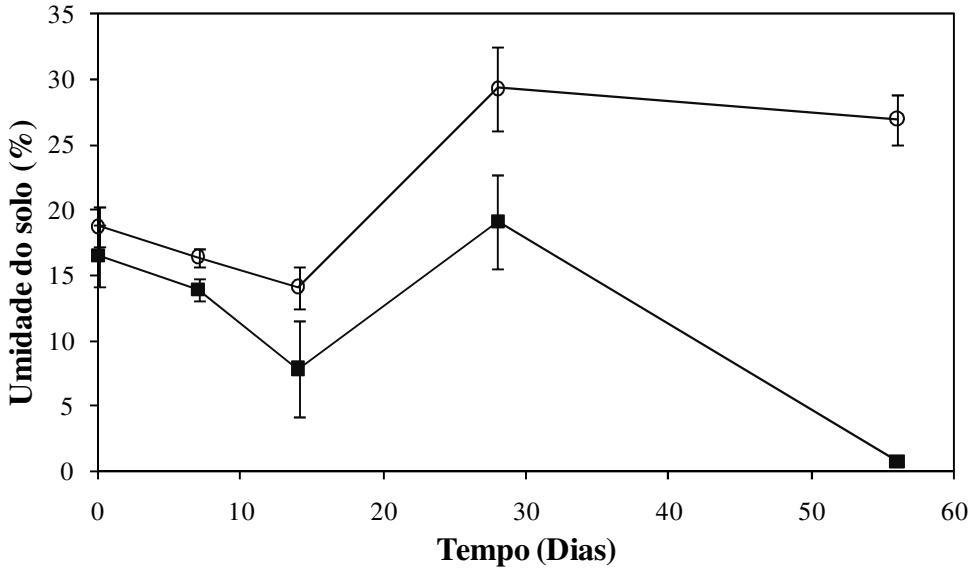
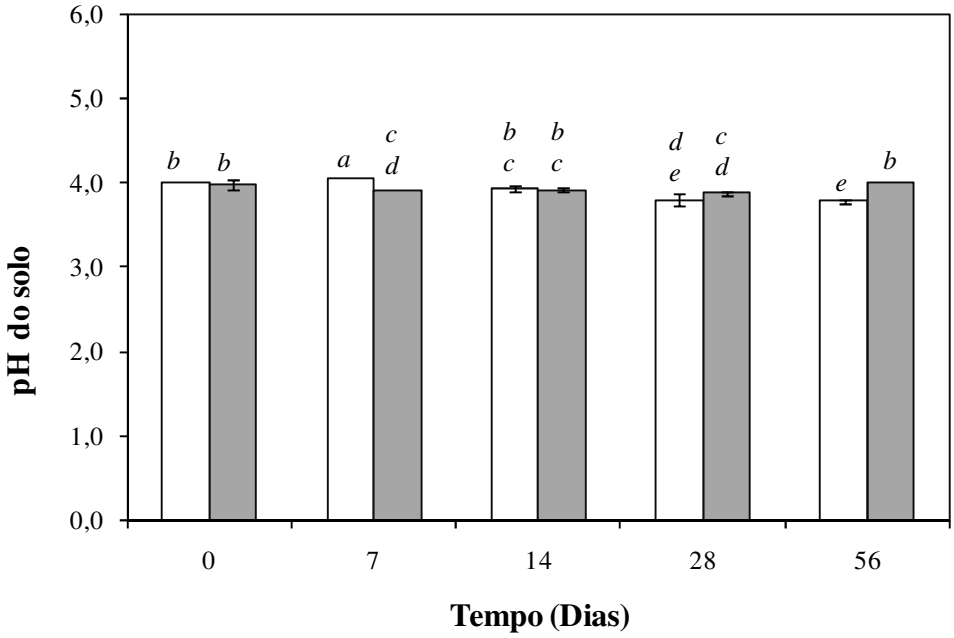


Figura 3: Monitoramento da umidade do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ■ reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC (Barras de erro ± desvio médio).

O aumento da umidade do solo é esperado quando ocorre degradação de matéria orgânica (Alexander 1999, Dupont *et al*. 1998, Kiehl 1985). Silva (2009) afirma que o aumento da umidade do solo indica atividade biológica intensa dos fungos no solo, o que foi observado pelo autor. Embora tal efeito não tenha sido observado neste estudo, isso não indica que o fungo não está ativo, pois pelas análises de atividade enzimática e isolamento de microrganismo, evidencia-se a ação do fungo. Liu *et al.* (2007) em estudo de fermentação sólida em biorreator com injeção de ar sob pressão com o fungo *Trichoderma koningi,* para produção de carboximetilcelulase observou que a evaporação de água do sistema foi maior nos reatores com pressão de ar, comparado com o controle sem pressão, no intervalo de 24 h.

Durante todo o período de incubação de *L crinitus* em solo houve uma pequena diminuição do pH do solo em todos os tratamentos avaliados (figura 4). O pH do solo nos reatores com injeção de ar sob pressão diminuiu de 4,0 para 3,8 e nos reatores com

revolvimento semanal do solo o pH diminuiu de 4,0 para 3,9, o que se mostra pouco significativo.



Fifura 4: pH do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, □ reatores com injeção de ar e pressão, ■ reatores com revolvimento semanal do solo, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, $P<0,05$)

Redução do pH do solo durante processos de crescimento de fungos são comumente relatadas na literatura (Okeke *et al*. 1997, Itoh *et al*. 2000) e também foi observada por Matheus *et al*. (2003) após 56 dias de cultivo de *L. crinitus* CCIBt 2611 (CCB 274) e de *P. castanella* CCIBt 2718 (CCB 444) em biorreator, nas mesmas condições experimentais aqui descritas, com solos não contaminados. Silva (2009) também observou redução do pH do solo após 224 dias de incubação de *L. crinitus* em solo contaminado.

A temperatura do solo em biorreatores pode ser influenciada tanto pelo metabolismo dos fungos quanto pela temperatura do ar injetado (Alexander 1999, Dupont *et al*. 1998). A temperatura do solo nos biorreatores com injeção de ar sob pressão foi inferior à observada nos biorreatores com revolvimento do solo durante todo período de incubação, variando entre

20 a 31 ºC, devido ao fato de o ar injetado ser retirado da atmosfera externa da sala, referindo-se à temperatura do ambiente externo, pois a temperatura da sala de incubação era controlada a 28 ± 3 ºC (figura 5). Além de promover a oxigenação necessária para o desenvolvimento dos fungos e as reações de oxidação dos compostos organoclorados, a injeção de ar no solo dos biorreatores também permite a manutenção da temperatura do solo para a faixa ótima de crescimento dos fungos (Dupont *et al*. 1998, Heerenklage *et al*. 1998, Lamar & Scholze 1992), o que aconteceu na maior parte do tempo de incubação.

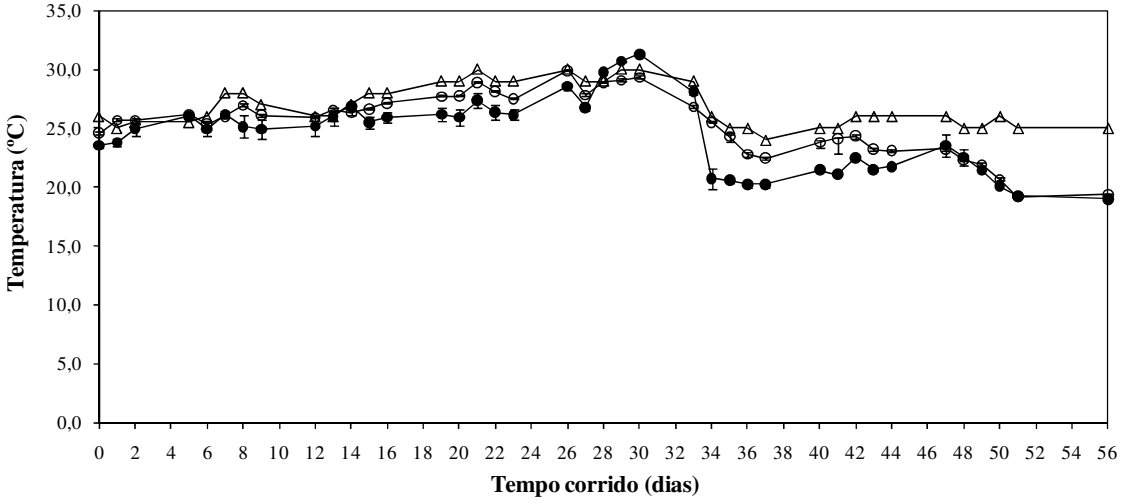


Figura 5: Monitoramento diário da temperatura do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ● reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo, ∆ temperatura da sala de incubação, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC.

Em estudo de fermentação sólida para produção de carboximetilcelulase em biorreator, Sheu & Liou (1999), observaram que nos biorreatores sob pressão a temperatura foi sempre menor que nos reatores não pressurizados, chegando a variar em até 12ºC. No experimento a pequena variação da temperatura se deve a pequena diferença de pressão entre os tratamentos (~0,2 bar).

Atividade enzimática

A atividade das enzimas secretadas por fungos lignocelulolíticos é fundamental na degradação de poluentes químicos em solo (Robles-Hernández *et al*. 2008). Foram observadas atividades enzimáticas durante todo período de crescimento de *L. crinitus* em solo contaminado. Foi possível observar um efeito altamente significativo da aeração pressurizada nas atividades de oxidação total do ABTS nos biorreatores (figura 6). O pico de maior atividade desta enzima foi observado aos 7 dias de cultivo, com 167,03 ± 6,69 UL^{-1} nos reatores com injeção de ar sob pressão e 89,81 ± 35,93 UL^{-1} nos reatores com revolvimento semanal do solo.

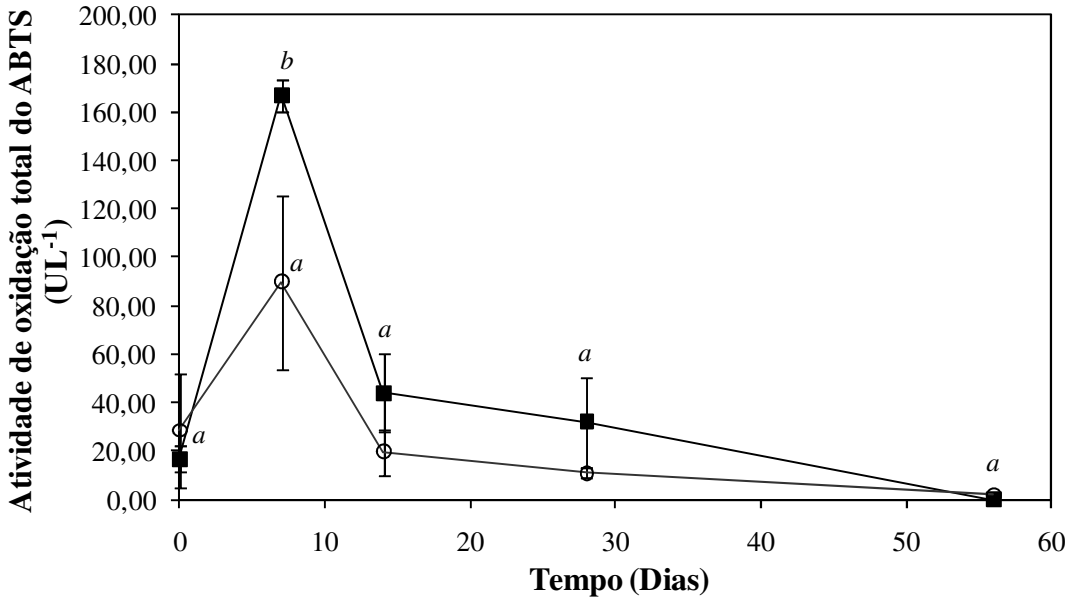


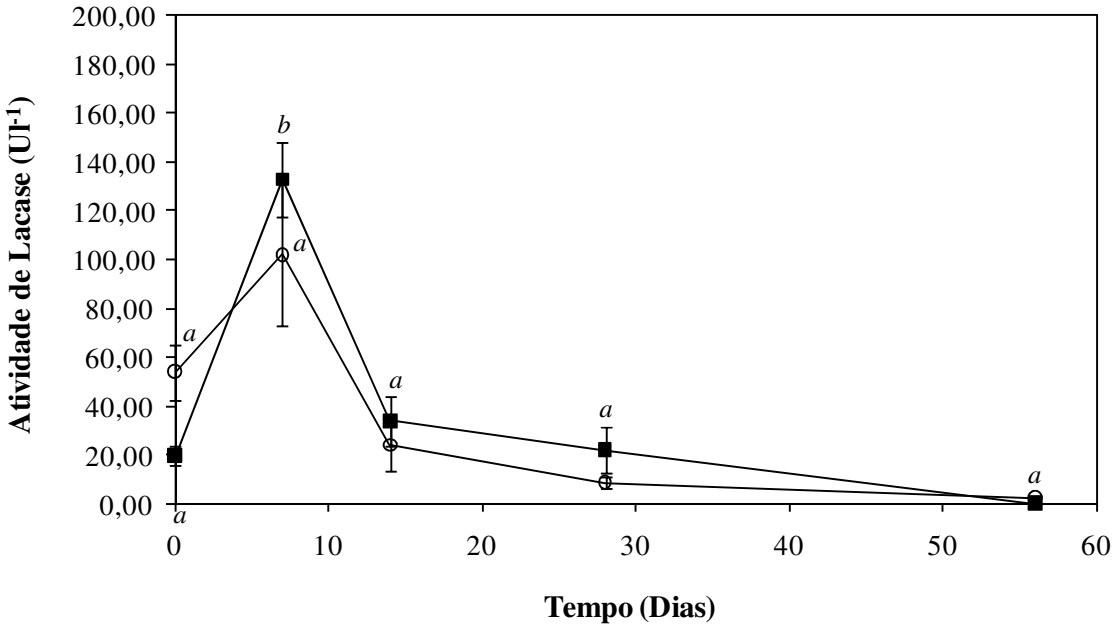
Figura 6: atividade de oxidação total do ABTS pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, durante crescimento em solo contaminado com organoclorados, ■ reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo, durante 56 dias de incubação a 28 ± 3ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, P<0,05)

As atividades de lacase e peroxidadase estão apresentadas na figura 7, onde também foi possível observar atividade destas enzimas até o final do período de incubação de *L. crinitus,* onde o pico de maior atividade foi aos 7 dias de cultivo com atividade de 138,83 ± 15,48 UL^{-1} de lacase e 34,21 ± 5,47 UL^{-1} de peroxidase nos reatores com injeção de ar sob pressão, e 102,05 ± 29,44 UL^{-1} de lacase e 28,01 ± 7,87 UL^{-1} de peroxidase nos reatores com revolvimento semanal do solo. Para a atividade de lacase também foi observado efeito altamente significativo da aeração pressurizada.

De acordo com Kirk & Shimada (1985) níveis de O_2 próximos das hifas podem influenciar na atividade enzimática de *Phanerochaete chrysosporium* aumentando a degradação da lignina*,* ainda segundo os autores, o oxigênio estimula o sistema gerador de H_2O_2, sendo seu próprio precursor, além de aumentar a biossíntese de álcool veratrílico, os autores ainda afirmam que variações no desenho do sistema de cultivo, visando promover maior aeração, podem influenciar a atividade ligninolítica de *P. chrysosporium*.

A



B

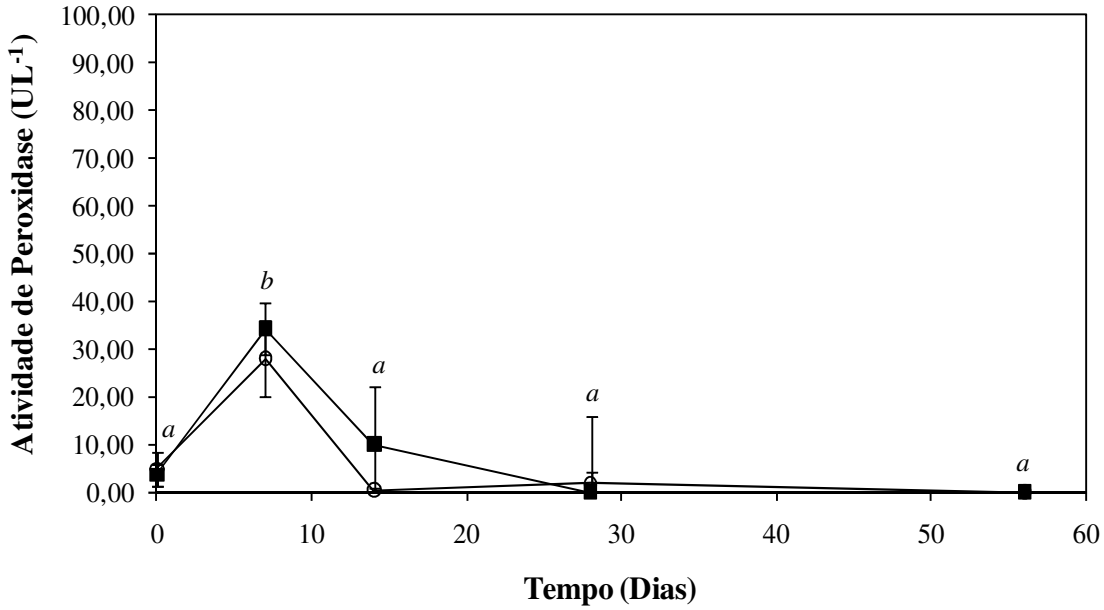


Figura 7: atividade de lacase (A) e peroxidase (B) pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, durante crescimento em solo contaminado com organoclorados, ■ reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, P<0,05)

Em seu estudo de biodegradação de organoclorados Silva (2009) também observou atividade de oxidação total do ABTS e lacase, porém em quantidades bem inferiores às obtidas neste estudo, com seu pico de maior atividade sendo aos 14 dias de incubação de *L. crinitus*, com cerca de 7,08 U L^{-1} de fenoloxidade e 4,11 U L^{-1} de lacase. O autor também relata que aos 28 dias de incubação a atividade dessas enzimas diminuiu consideravelmente nos biorreatores, não tendo sido mais detectadas a partir dos 56 dias.

Ballaminut (2007) em estudo de biodegradação de pentaclorofenol em solo (200 mg PCF Kg^{-1} de solo) por *L. crinutus* em microcosmos observou atividade de peroxidase e lacase durante todo período de cultivo (60 dias). Verificou-se atividade máxima de lacase entre o 15º e 35º dia de cultivo, cerca de 0,53 de atividade específica. A atividade de peroxidase não apresentou diferença significativa entre os tempos de cultivo, registrando cerca de 0,06 U mg^{-1} de proteína.

Embora Ballaminut (2007) tenha demonstrado a capacidade de *L. crinitus* produzir MnP, não foi observada atividade de peroxidase dependente de manganês (MnP) até 56 dias de incubação de *L. crinitus* em quaisquer das situações avaliadas. Silva (2009) também não registrou atividade de MnP por *L. crinitus* em bioreator durante todo período de incubação do fungo. Moreira-Neto (2006) também não obteve atividade de MnP no cultivo de *Psilocybe castanella* CCIBt 2718 (CCB444) em solo contaminado com hexaclorobenzeno (2000 mg HCB Kg^{-1} de solo) em microcosmos, sugerindo que as condições de cultivo tenham provocado essa inibição

A produção e atividade MnP está intimamente relacionada com o bom desenvolvimento dos fungos, mas também com a presença de mediadores bioquímicos no sistema de cultivo, embora muitos desses mediadores possam ser produzidas pelo metabolismo do próprio fungo (Asgher *et al*. 2008, Hofrichter 2002, Jarosz-Wilkolazka & Graz 2006 Moreira-Neto 2006). Mohammadi & Nasernejad (2009) observaram que a imobilização de células de *Phanerochaete chrysosporium* em bagaço de cana-de-açúcar favoreceu a produção e atividade de MnP (76 Ul^{-1}) em comparação com células sem imobilização (aproximadamente 50 Ul^{-1}), em 7 dias de incubação.

Raros são os trabalhos que utilizam a técnica de aeração sob pressão, seja para tratamentos de solo, fermentação de substratos ou mesmo tratamento de efluentes, a maioria utiliza apenas a injeção de ar para oxigenação do meio. Com os resultados apresentados, mais uma vez observa-se, portanto que, a aeração dos reatores sob pressão promoveu uma situação bastante melhorada para a produção das enzimas ligninolíticas de *L. crinitus*, se comparado aquelas observadas por Silva (2009) trabalhando sem a pressurização do ar. Em estudo de fermentação sólida para produção de carboximetilcelulose em biorreator por *Trichoderma koningii*, Liu *et al.* (2007) também observaram que a atividade desta enzima nos reatores pressurizados foi 4 vezes maior (20,85 Ul^{-1} g matéria seca) que nos reatores sem

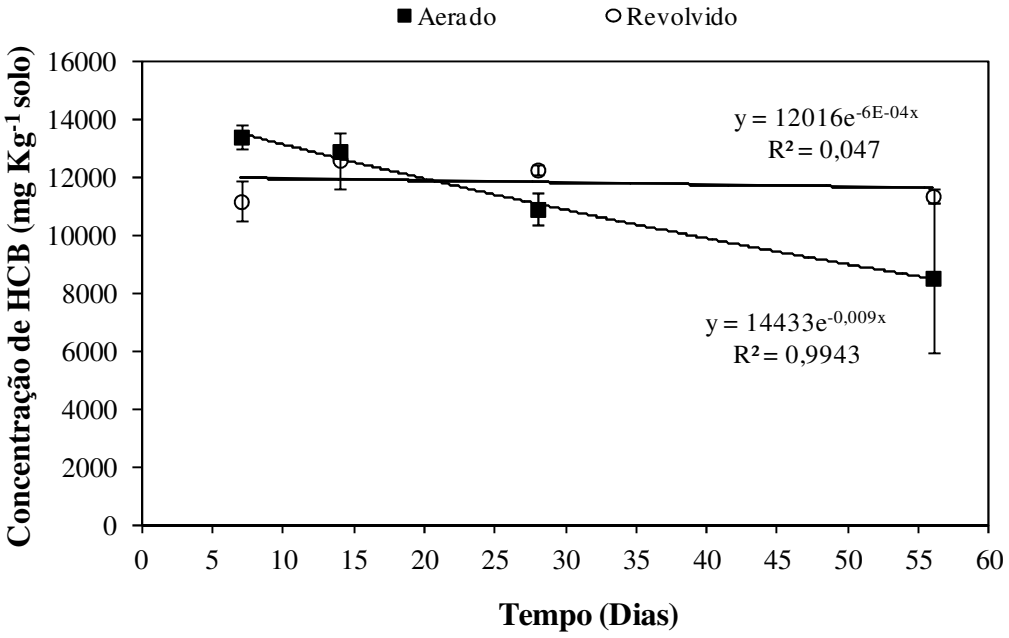
pressurização, e que o pico de maior atividade desta enzima também foi aos 7 dias de incubação do fungo.

Biodegradação dos organoclorados

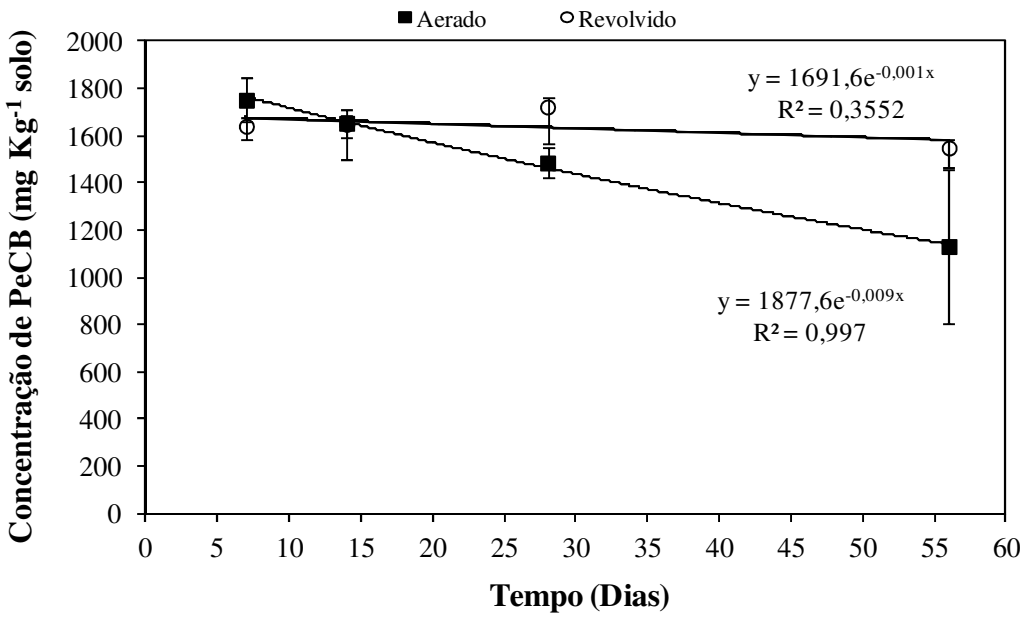
As concentrações iniciais dos compostos organoclorados no solo variaram entre 9300,20 ± 423,47 a 10643,81 ± 2567,76 mg HCB Kg^{-1}, 1318,74 ± 92,78 a 1550,24 ± 153,21 mg PeCB Kg^{-1} e 150,34 ± 12,24 a 175,76 ± 7,31 mg TCB total Kg^{-1}. Observou-se um aumento significativo da concentração dos compostos organoclorados analisados na primeira semana de incubação de *L. crinitus* em todas as condições analisadas (Figura 8 A, B e C).

O aumento da concentração dos compostos organoclorados presentes no solo na primeira semana de incubação de *L. crinitus* pode ser explicado pela presença do óleo vegetal e do Tween 20 no sistema de cultivo, o que foi evidenciado em estudos específicos desenvolvidos posteriormente.

A



B



C

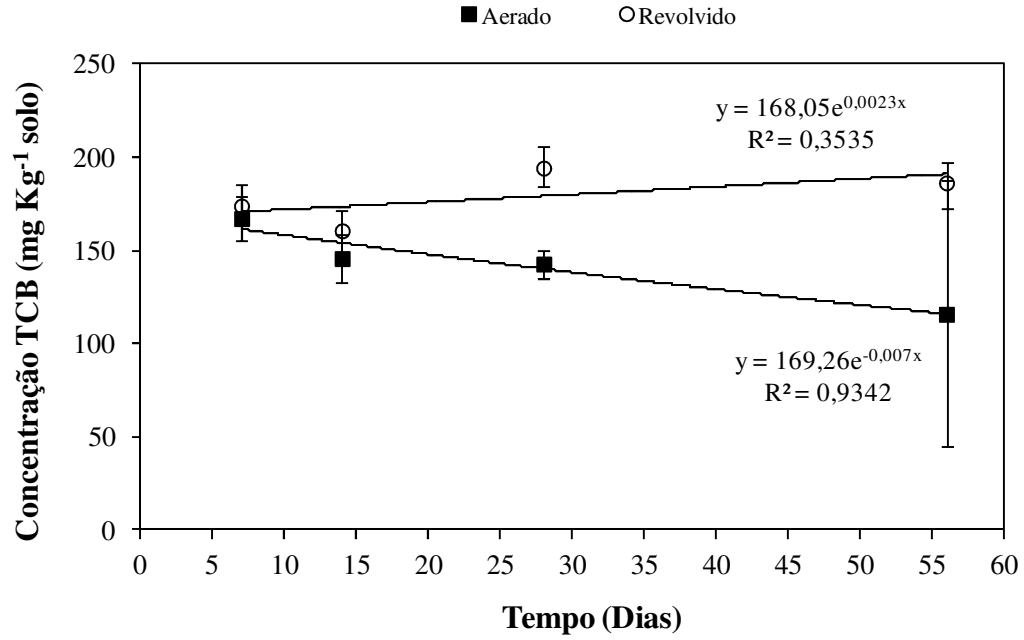


Figura 8: Concentração dos compostos organoclorados no solo, A) hexaclorobenzeno, B) pentaclorobenzeno, C) tetraclorobenzeno, durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, ■ reatores com injeção de ar sob pressão, ○ reatores com revolvimento semanal do solo, durante 56 dias de incubação a 28 ± 3 ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

Se considerarmos a degradação a partir da primeira semana de incubação de *L. crinitus* ao final do período de incubação observou-se efeito altamente significativo da injeção de ar

sob pressão na degradação dos organoclorados. Nos reatores com injeção de ar sob pressão *L. crinitus* degradou 36,3% de HCB, 35,4% de PeCB e 22,9% dos TCB totais. Nos reatores com revolvimento de solo não foi observado redução dos compostos organoclorados.

Com a linearização da equação foi possível determinar uma cinética de degradação de primeira ordem e, com isso calcular a taxa de degradação diária e a meia vida de cada composto (Dupont *et al.* 1998). Nos reatores com injeção de ar pressurizado a taxa de degradação diária dos organoclorados foi de 101,46 mg HCB Kg^{-1}, 12,56 mg PeCB Kg^{-1} e 0,92 mg TCB Kg^{-1} dia. A meia vida dos compostos nesta situação analisada foi de 66,03 dias para o HCB, 69,73 dias para o PeCB e 90,88 dias para TCB.

Em que pese saber ser possível construir uma cinética de primeira ordem de degradação com os dados de concentração obtidos, em sistemas de biodegradação de organoclorados em solo por fungos basidiomicetos esse comportamento de cinética de degradação pode ser aplicado por pelo menos 80 dias de incubação do fungo, pois a partir desse período o fungo entra na sua fase estacionária de crescimento. Silva (2009) isolou *L. crinitus* em biorreator metabolicamente ativo até 84 dias de incubação, com produção de biomassa ativa, atividade enzimática e descoloração do corante RBBR, porém não foi observado degradação dos compostos organoclorados do solo.

Poucos são os estudos de biodegradação de compostos organoclorados em solo com concentrações tão elevadas desses compostos e em grande escala. Silva (2009) em estudos de biodegradação de HCB por *L. crinitus* com o mesmo solo utilizado neste experimento, em biorreator com 400 Kg de solo com injeção de ar, porém sem pressão não observou degradação de HCB e PeCB ao final de 224 dias de incubação, contudo em estudos em microcosmos, com as mesmas condições experimentais adotadas por Silva (2009), Matheus (2003) observou que *L. crinitus* foi capaz de remover cerca de 68 % de HCB kg^{-1} em solo (32.960 mg HCB kg^{-1} solo) e mineralizar cerca de 25% de ^{14}C-HCB em 56 dias de incubação quando 8% de óleo vegetal foi adicionado ao solo.

Moreira-Neto (2006) observou degradação de 32,4% de HCB em solo com 2000 mg Kg^{-1} após 70 dias de incubação de *Psilocybe castanella* em microcosmos. Vitali (2004) também observou a redução de 42,82% HCB e 60% PeCB por *P. castanella* e *Eupenicillium baarnense* em solo com cerca de 3770 mg kg^{-1} de solo. Ballaminut (2007) em estudo de biodegradação de pentaclorofenol em solo (200 mg PCF Kg^{-1} de solo) registrou 100% de degradação do composto por *L. crinitus*.

Em estudos de biodegradação de compostos recalcitrantes em biorreatores também em microcosmos Valentin *et al.* (2007) observaram degradação de 50% de HPAs em solo com 50 mg Kg^{-1} de solo pelo fungo *Bjerkandera adusta*. Fulekar *et al* (2012) registraram diminuição de 98,5% de cádmio, 99,6 de cobre e 100% de ferro em solo com 100 mg kg^{-1} de metal em solo utilizando a microbiota autóctone em reator aerado sem pressão. Jiang *et. al.* (2006) também em estudo de biodegradação de pentaclorofenol em solo (100 mg kg^{-1} solo) em biorreator com aeração, obtiveram quase 100% de degradação ao final de 60 dias de incubação.

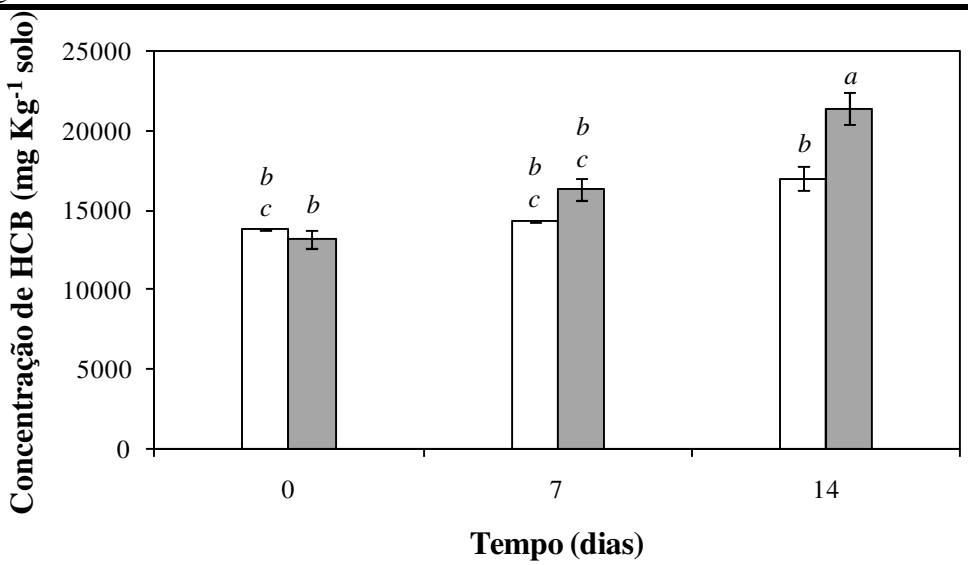
Efeito da emulsão de óleo vegetal e surfactante na biodisponibilidade dos organoclorados no solo

As concentrações iniciais dos compostos organoclorados presentes no solo variaram entre 13197,45 ± 550,06 a 13829,92 ± 97,86 mg HCB Kg^{-1} solo e 1508,18 ± 21,78 a 1625,02 ±76,24 mg PeCB Kg^{-1} solo. Foi possível observar um efeito significativo do óleo vegetal no aumento da concentração dos compostos organoclorados no solo (tabela 3 e figura 9 A e B).

Tabela 3: Concentração dos compostos organoclorados do solo (mg Kg^{-1} solo) nos tempos 0 e 14 dias de incubação

	Concentração dos organoclorados do solo (mg Kg^{-1} solo)			
	HCB		PeCB	
	0 dia	14 dias	0 dia	14 dias
Sem óleo vegetal	13829,92 ± 97,86	17019,94 ± 758,80	1508,18 ± 21,78	1943,39 ± 32,27
Com óleo vegetal	13197,45 ± 550,06	21424,96 ± 1007,54	1625,02 ± 76,26	2499,30 ± 126,49

A



B

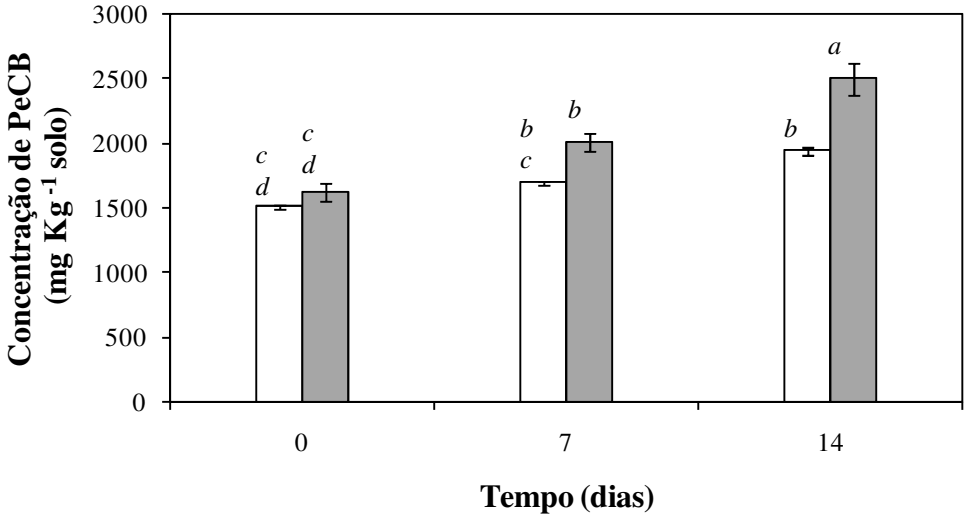


Figura 9: Concentração dos compostos organoclorados no solo, A) HCB e B) PeCB, durante 14 dias de incubação a 28 ± 3 ºC, sem inóculo fúngico, □ controle sem óleo vegetal, ■ 5% óleo vegetal (Barras de erro ± desvio médio).

O aumento da concentração dos compostos organoclorados presentes no solo pode ser explicado pela presença da emulsão do óleo vegetal e do Tween 20. Sabe-se que a taxa de degradação de um contaminante no solo depende da sua biodisponibilidade para que os microrganismos possam metabolizá-lo, a qual é influenciada por fatores como dessorção, difusão e dissolução. Muitos dos contaminantes mais persistentes apresentam baixa solubilidade em água e, portanto sua biodisponibilidade pode muitas vezes ser melhorada pela adição de óleo vegetal e surfactantes. Ao reduzir a superfície e a tensão interfacial entre líquidos, sólidos e gases, permitindo-lhes dispersar facilmente, os óleos e surfactantes químicos ou biológicos podem ter um papel fundamental sobre a biodegradação do contaminante (Banat *et al.* 2000, Singh *et al.* 2007).

Uma série de trabalhos descreve o uso de óleo vegetal como um solvente para lavar o solo e remover compostos organoclorados com uma eficiência de até 90% de extração (Chiou 1985; Zemanek *et al.* 1997, Pannu *et al.* 2003, Gong *et al.* 2005, Gong *et al.* 2006).

Em estudos realizados por Salvi (2008), com o mesmo solo utilizado neste experimento em microcosmos foi observado cerca de 35,0% de ^{14}C-resíduos não extraíveis no solo sem a presença do óleo vegetal, enquanto que na presença de 5% de óleo vegetal os resíduos ligados foram de 9,32%. Esses compostos organoclorados, sendo lipossolúveis se desprenderam do solo, quando na forma de compostos ligados e incorporaram-se a solução do solo, tornando-se disponíveis para a ação do fungo. Moreira-Neto (2006) em estudo de degradação de HCB em microcosmos por *Psilocybe castanella*, observou um aumento de 23% da concentração de HCB durante a primeira semana de incubação do fungo, e esse perfil de aumento da concentração também foi observado para os controles não inoculados.

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis como os aromáticos policíclicos (HPAs) pelo uso de biossurfactantes. O tratamento de amostras contaminadas por fenantreno (Déziel *et al.* 1996) e naftaleno (Zhang *et al.* 1997) com biossurfactantes resultou em aumento nas suas taxas de

mineralização e solubilização. Yuan *et al.* (2007) em estudo de dessorção de HCB (50 mg Kg^{-1} solo) em solo com diferentes surfactantes registrou cerca de 60% de dessorção do HCB na presença de Tween 80 durante 48 hs de tratamento, corroborando com os resultados obtidos neste estudo com tween 20.

Sabe-se que algumas propriedades do solo como a umidade também tem grande influência sobre o processo de sorção de pesticidas no solo. O aumento da dessorção dos compostos oganoclorados no solo sem a presença do óleo vegetal pode ser influenciada pelo ajuste da umidade do solo estudado que foi de 50% CMRA. Kleinschmitt (2003) estudou a dessorção do herbicida atrazina em solo e observou taxa de 28,3% de dessorção em solo com 50% CMRA e esterilizado. Por outro lado, Rocha (2003) estudou a biodegradação e sorção de 2,4 D e diuron em solos com 25%, 50% e 75% da capacidade de campo e concluiu que tanto a biodegradação como a sorção foram maiores nos solos com maior umidade.

Conclusão

A pressurização dos sistemas de biorremediação de solo impede a formação de caminhos preferências de ar na massa de solo. A aeração sob pressão em biorreator também interfere significativamente no metabolismo de *L. crinitus,* com um aumento considerável da quantidade de biomassa fúngica, da atividade enzimática e principalmente um aumento considerável na degradação dos compostos organoclorados presentes no solo, principalmente hexaclorobenzeno.

Agradecimentos

Agradecemos a Rhodia do Brasil e a Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG, pelo suporte financeiro, a CAPES pela concessão da bolsa de

doutorado, ao Instituto de Botânica de São Paulo pelo uso do laboratório e ao Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA) e a Dra. Ellen Aquino Perpétuo pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Referências Bibliográficas

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. New York: Ed. Academic Press, 453p.

Andrea, M. M, Papini, S. & Nakagawa, L. E. 2001. Otimizing microwave-assited solvent extraction of pesticides from soil. Journal of Environmental Science and Health 36 (1): 87-93.

Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. Biodegradation.

Atlas, R. M. 1993. Management of the environment through biotechnology. World Journal Microbiology and Biotechnology 9: 493-494.

Ballaminut, N. 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163p.

Ballaminut, N., & Matheus, D. R. 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. Brazilian Journal of Microbiology 38: 248-252.

Banat, I. M., Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appiedl Microbiology and Biotechnology 53: 495–508.

Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Yinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. Journal of Microbiological Methods 50: 227-236.

Bôer, C. G., Obici, L., Souza, C. G. M. & Peralta, R. M. 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. Bioresource Technology 94: 107–112.

Boopathy, R. 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology 74: 63-67.

Chiou, C. T. 1985. Partition coefficients of organic compounds in lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. Environmental Science and Technology 19: 57–62.

Davis, M. W. & Lamar, R. T. 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. Soil Biology & Biochemistry 24 (3): 189-198.

Deveci, T., Unyayar, A. & Mazmanci, M. A. 2004. Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30: 25–32.

Déziel, E., Paquette, G., Vellemur, R., Lepins, F. & Bisaillnon, J. G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on PAH´s. Applied and Environmental Microbiology 62 (3): 1908-1912.

Dupont, R. R., Bruell, C. J., Marley, M. C., Downey, D. C., Norris, R. D., Hulling, S. G. & Pivets, B. 1998. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.

Eerd, L. L. V., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. & Hall, J. C. 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. Weed Science 51: 472–495.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K. E. L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus:* purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology 62 (4): 1151-1158.

Field, J. A. & Sierra-Alvarez, R. 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. Biodegradation 19: 463-480.

Fulekar, M. H., Sharma, J. S. & Tendulkar, A. 2012. Bioremediation of heavy metal using biostimulation in laboratory bioreactor. Environmental Monitoring Assessment 184: 7299-7307.

Gong, Z., Alef, K., Wilke, B. M. & Li, P. 2005. Dissolution and removal of PAHs from a contaminated soil using sunflower oil. Chemosphere 58: 291–298.

Gong, Z., Wilke, B. M., Alef, K., Li, P. & Zhou, Q. 2006. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from manufactured gas plant-contaminated soils using sunflower oil: laboratory column experiments. Chemosphere 62: 780–787.

Gowthaman, M. K., Krishna, C. & Moo-Young, M. 2001. Fungal solid state fermentation – an overview. Khachatourians, G. G. & Arora, D. K. (eds.). Agriculture and Food Production. Applied Mycology and Biotechnology 1: 305-352.

Häggblom, M. M. 1992. Microbiol breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. FEMS Microbiology Review 103: 29-72.

Häggblom,M. M. & Valo, R. J. 1995. Bioremediaton of chlorophenol wastes. *In:* Young, L.Y., Cerninglia, C.E. (Eds). Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss, New York, p. 389-434.

Harms, H., Schosser, D. & Wick, L. Y. 2011. Untapped potencial: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Applied and Industrial Microbiology 9: 177-192.

Heerenklage, H.,K., Woyczehowski, H., Bollow, S., Stegmann, R. 1998. Influence of oxygen on the degradation of Diesel Fuel in Soil Bioreactors. Acta Biotechnology 2: 109-122.

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

Holroyd, M.L. & Caunt, P. 1995. Large-Scale Soil Bioremediantion Using White-Rot Fungi. *In*: Bioaumentation for Site Remediation. Hinchee, R., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (eds.). Columbus: Battelle Press 181-187.

Hwang, E. Y., Park, J. S., Kim, J. D. & Namkoong, W. 2006. Effects of aeration mode on the composting of diesel contaminated soil. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 12 (5): 694-701.

Iqbal, J. Metosh-Dickey, C. & Portier, R. J. 2007. Temperature effects on bioremediation of PAHs and PCP contaminated South Louisiana soils: a laboratory mesocosm study. Journal of Soils and Sediments 7 (3): 153 – 158.

Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H. 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. Soil Biology & Biochemistry 32: 85-91.

Jarosz-Wilkoazka, A. & Graz, M. 2006. Organic acids production by white rot Basidiomycetes in the presence of metallic oxides. Canadian Journal Microbiology 52: 779-785.

Jiang, X., Zeng, G., Huang, D., Chen, Y., Liu, F., Huang, G., Li, J., Xi, B. & Liu, H. 2006. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium.* World Journal of Microbiology & Biotechnology 22: 909–913.

Kiehl, E. J. 1985. Fertilizantes orgânicos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. 492p.

Kirk, T. K. & Shimada, M. 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In:* Higuchi, T. (Ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press 21: 579-605.

Kleinschmitt, A. R. 2003. Dessorção do herbicida atrazina e atividade microbiana em duas classes de solos do Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 78p.

Kulikova, N. A., Klein, O. I., Stepanova, E. V. & Koroleva, O. V. 2011. Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies:

Fundamental and Applied Aspects (Review). Applied Biochemistry and Microbiology 47: 619-634.

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. & Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters 169: 247-250.

Lamar, R. T. & Scholze, R. J. 1992. White-rot fungi biodegradation of PCP-treated ammunition boxes. *In:* Proccedings of R&D 92 National research & development conference on the control of hazardous materials, San Francisco – California p. 89-94.

Leisinger, T. 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. Experientia 39: 1183-1191.

Liu, J., Li, D. B. & Yang, J. C. 2007. Operating characteristics of solid-state fermentation bioreactor with air pressure pulsation. Applied Biochemistry and Microbiology 43 (2): 211–216.

Machado, K. M. G. & Matheus, D. R. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 37: 468-473.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R. 2005. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 297-301.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Rodrigues, T. A. & Bononi, V. L. R. 2006. Enhancement of growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. Brazilian Journal of Microbiology 37: 425-427.

Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R. 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ^{14}C hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In:* Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Proceedings of The Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus p. 2b-10, ISBN 1-57477-132-9.

Matheus, D. R. & Machado, K. M. G. 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In:* Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador. 13: 479-500.

Matheus, D. R. & Okino, L. K. 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In:* Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.

Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16 (5): 415-421.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2001. New basidiomycetes on bioremediation of organochlorine contaminated soil. *In*: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. San Diego, Battelle Press, 3v, pp. 99-106.

Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R., Rodrigues, T.A. 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. Proceedings do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.

Mohammadi, A. & Nasernejad,B. 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. Journal of Hazardous Materials 161: 534-537.

Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.

Nakagawa, L.E., & Andréa, M.M. 2006. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Revista Brasileira de Ciência do Solo 30: 575-582.

Novotný, C., Erbanová, P., Šašek1, V., Kubátová, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J. & Zadražil, F. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. Biodegradation 10: 159-168.

Okada, W.S. 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 112p.

Okeke, B.C., Paterson, A., Smith, J.E., Watson-Craik, I.A. 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. Applied Microbiol Biotechnology 48: 563-569.

Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R. 2000 Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 889–893.

Palmieri, G., Cennamo, G. & Sannia, G. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus. ostreatus* and its oxidative enzymatic system. Enzyme and Microbial Technology 36: 17–24.

Pannu, J. K., Singh, A. & Ward, O. P. 2003. Influence of peanut oil on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Canadian Journal of Microbiology 49: 508-513.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 20–33.

Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V. & Vasilchenco, L. G. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. Applied Biochemistry and Microbiology 40 (1): 1-17.

Rhykerd, R. L., Crews, B., Mclnnes, K. J. & Weaver, R. W. 1999. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. Bioresource Technology 67: 279-285.

Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., Soriano, A. U., Santos, R. L. C. & Sobral, L. G. S. 2006. Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorreatores. *In* Série Tecnologia Ambiental STA-37. Rio de Janeiro, 59p.

Robles-Hernández, L., Franco, A.C.G., Donald L. Crawford, D.L., Chun, W.W.C. 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms - Revisión de degradación de contaminantes ambientales por basidiomicetos de la pudrición Blanca. TecnoCiência Chihuahua 2 (1): 32-40.

Rocha, W. B. D. 2003. Sorção de 2,4-D e diuron nos agregados organominerais de latossolos em função dos conteúdos de matéria orgânica e água. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 75p.

Salvi, M. B. 2008. Degradação química e biológica de ^{14}C-Hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.

Semple, K. T., Reid, B. J. & Fermor, T. R. 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution 112: 269-283.

Shannon, M. J. R. & Uterman, R. 1993. Evaluating Bioremediation: Distinguishing Fact from Fiction. Annual Review Microbiology. 47: 715-738.

Sheu, W. J. & Liou, N. C. 1999. Effect of temporal variation of pressure on vaporization of liquid droplets. International Journal of Heat and Mass Transfer 42: 4043-4054.

Silva, R.R. 2009. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em reatores. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 186p.

Silva, R.R., Corso, C.R. & Matheus, D.R. 2009. Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella.* World Journal Microbiology and Biotechnology 26: 841-846.

Singh, A., Van Hamme, J. D. & Ward, O. P. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnology Advances 25: 99-121.

Soares, G. M. B., Costa Ferreira, M. & Amorim, P. 2001. Descolorization of an anthraquinonetype dye using a laccase formulation. Bioresource Technology 79: 171-177.

Srinivasan, U. & Glaser, J.A. 1999. The validity of ergosterol-based fungal biomass estimate in biorremediation, *In*: Alleman, B.C., Leeson, A., Bioreactor and Ex Situ biological Treatment Technologies.San Diego, California: Battelle Press, p.103-109.

Sutherland, T. D., Horne, I., Weir, K. M., Coppin, C. W., Williams, M. R., Selleck, M., Russell, R. J. & Oakeshott, J. G. 2004. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31: 817–821.

Tortella, G. R., Diez, M. C. & Durán, N. 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. Critical Reviews in Microbiology 31: 197–212.

Troquet, J., Larroche, C. & Dussap, C. G. 2003. Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13: 103–112.

Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F. & Viale, A. 2003. Optimization of a culture medium for ligninolyttic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30: 682-690.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72: 169-183.

Valentín, L., Lu-Chau, T. A., Lopez, C., Feijoo, G., Moreira, M. T. & Lema, J. M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the whyte-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Process Biochemistry 42: 641-648.

Vitali, V. M. V. 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.

Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andrea, M. M., Bononi, V. L. R. 2006. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. Brazilian Journal of Microbiology 37: 256-261.

Yuan, S., Shu, Z., Wan, J. & Lu, X. 2007. Enhanced desorption of hexachlorobenzene from kaolin by single and mixed surfactants. Journal of Colloid and Interface Science 314 (1): 167-175.

Zemanek, M. G., Pollard, S. J. T., Kenefick, S. L. & Hrudey, S. E. 1997. Multi-phase partitioning and co-solvent effects for polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) in authentic petroleum- and creosote-contaminated soils. Environmental Pollution 98: 239–252.

Zhang, Y., Maier, W. J. & Miller, R.M. 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, biovailability and biodegradation of phenanthrene. Environmental Science and Technology 31: 2211-2217.

ARTIGO II

Influência dos ácidos graxos insaturados e da concentração dos compostos organoclorados do solo na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611

Marina Bianchini de Salvi[1, 2*], Dácio Roberto Matheus[1,3]

[1]Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

[2]Pós-graduanda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo;

[3]Professor Titular da Universidade Federal do ABC;

[*] Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 5067-6067. E-mail: ma_bianchini@hotmail.com

Resumo

Os basidiomicetos apresentam um enorme potencial em processos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (POPs), dentre eles o hexaclorobenzeno (HCB). Objetivo foi avaliar a degradação de compostos organoclorados em solo contaminado por *L. crinitus* acondicionados em biorreator com capacidade para 9 Kg de solo e a influência da concentração de ácidos graxos insaturados e a diminuição da concentração dos organoclorados do solo. Solo contaminado (11562,97 mg HCB Kg^{-1} solo e 3965,68 mg PeCB Kg^{-1} solo) foi esterilizado com benomyl (10mg Kg^{-1} solo). Lotes de 9 Kg de solo (seco) foram transferidos para biorreatores, onde foram incorporados 2,5% de gesso comercial (peso seco) e 900 mg de *L. crinitus* (peso seco), crescido em bagaço de cana misturado com farinha de soja e fécula de mandioca nas proporções de 20 e 30% (peso seco). As condições de cultivos analisadas foram: 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p), utilizado como controle, 2 reatores com 8% de uma emulsão de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) e 2 reatores com solo contaminado diluído com solo branco (1:10 p/p) para diminuição da concentração inicial dos organoclorados. Foi instalado um sensor de temperatura nos biorreatores, e injetado um fluxo de ar não esterilizado para atingir pressão de 0,2 bar. A incubação dos biorreatores foi feita durante 56 dias, a 28 ºC. Aos 0, 7, 14, 28 e 56 dias de incubação foram determinadas atividades enzimáticas, pH, crescimento fúngico e umidade do solo, temperatura do solo e % de oxigênio do solo foram acompanhadas diariamente. Foram observadas atividades enzimáticas durante todo período de crescimento de *L. crinitus* e um efeito significativo do óleo vegetal no sistema de cultivo. Não houve alteração do pH do solo. O teor de oxigênio nos reatores variou entre 21 e 25%. A temperatura do solo nos biorreatores variou entre 16 e 28ºC. Houve crescimento significativo de *L. crinitus* em todas as situações

analisadas e um efeito significativo da concentração do óleo vegetal no aumento da biomassa fúngica. *L. crinitus* foi capaz de degradar 43,7% de HCB, 50,4% de PeCB e 41,7% dos TCB.

Palavras chaves: óleo vegetal, biodegradação, biorreator

Abstract

The basidiomycetes have huge potential in bioremediation of persistent organic pollutants (POPs), including hexachlorobenzene (HCB). The objective was to evaluate the biodegradation of organochlorine compounds in contaminated soil by *L. crinitus* packed in a 9 kg capacity bioreactor as well as the influence of the concentration of unsaturated fatty acids and decreasing of the concentration of organochlorine. The contaminated soil (10643,81 mg kg^{-1} soil HCB and PeCB 1550,24 mg kg^{-1} soil) was sterilized with benomyl (10,0 mg kg^{-1} soil). Batches of 9 kg of soil (dried) were transferred to bioreactors which were incorporated by 2,5% of commercial gypsum (dry weight) and 900,0 mg of *L. crinitus* (dry weight) grown on sugar cane bagasse mixed with soy flour (20%) and cassava flour (30%). The culture conditions analyzed were: two reactors with 5% of emulsion of commercial vegetable oil (trade name Lisa) and Tween 20 at the ratio of 9:1 (w/w) used as control, two reactors with 8% of emulsion of vegetable oil and Tween 20 at the ratio of 9:1 (w/w) and two reactors with contaminated soil diluted with uncontaminated soil (1:10 w/w) to decrease the initial concentration of organochlorine, in all reactors was injected pressurized air (0,2 bar). It was installed a heating sensor in the bioreactors and a probe to measure oxygen content. Incubation of bioreactors was made during 56 days at 28 ºC. At 0, 7, 14, 28 and 56 days of incubation were determined enzyme activities, pH, fungal growth and moisture soil, soil temperature and the percentage of oxygen soil were monitored daily. Enzyme activities were observed during all the growth period of *L. crinitus* and a significant effect of vegetable oil

use in the cultivation system. There was no change in the soil pH. The oxygen content reactors ranged between 21 and 25%. Soil temperature in the bioreactors ranged between 16 and 28 ºC. There was significant growth of *L. crinitus* in all cases analyzed, and a significant effect of concentration of the vegetable oil to increase the fungal biomass. *L. crinitus* was able to degrade 43,7% HCB, 50,4% PeCB and 37,3% TCB.

Key words: vegetable oil, biodegradation, bioreactor

Introdução

O hexaclorobenzeno (HCB) é um composto aromático halogenado que apresenta o núcleo benzênico completamente clorado. Esta característica confere estabilidade ao composto, já que o cloro ligado organicamente inibe a sua biodegradação e, embora a ligação carbono-cloro não seja totalmente estranha à natureza, a maioria dos organismos não dispõe de enzimas que a quebre (Bailey 2001, Toledo 2002, Barber *et al.* 2005, Nakagawa & Andrea 2006).

Devido a esta resistência natural à degradação biológica e química, à sua persistência no ambiente e à sua capacidade de se transportar para lugares distantes de sua fonte emissora, pelo ar e pelas águas, o HCB se configura num grupo de substâncias químicas de particular interesse, em nível global, para a agricultura, a indústria, a saúde pública e o meio ambiente: os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (Matheus *et al*. 2000,Toledo 2002, Hirano *et al.* 2007)

O HCB é o principal composto presente nos solos contaminados por organoclorados da Baixada Santista, São Paulo. Foi oriundo do processo industrial de produção do tetracloreto de carbono, um desengraxante bastante utilizado na indústria metalúrgica. Os

resíduos da fabricação de tetracloreto de carbono constituem-se de uma mistura de compostos organoclorados, sendo o HCB o componente principal, muito embora o pentaclorofenol (PCF) possa estar presente em concentrações relativamente elevadas, além de outros organoclorados em menores concentrações (Matheus 2003).

Diversas tecnologias têm sido avaliadas para degradação de organolcorados, sendo a biorremediação umas das mais promissoras do ponto de vista ambiental e econômico (Freire *et al*. 2000, Lodolo *et al.* 2001, Matheus & Machado 2002, Matheus & Bononi 2002, Moreno *et al.* 2004, Rizzo *et al.* 2006, Field & Sierra-Alvarez 2008, Kulikova *et al.* 2011, Harms *et al.* 2011).

Fungos são interessantes para a aplicação em sistemas de biorremediação, pois são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o crescimento bacteriano. Ainda, o crescimento dos fungos (induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico), por meio do alongamento e da ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, otimizando o contato do microrganismo com o contaminante, uma vez que aumenta sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (Dupont *et al.* 1998). Alguns basidiomicetos nativos do Estado de São Paulo foram selecionados para aplicação em tratamentos ambientais de solos contaminados, por sua capacidade de degradar compostos organoclorados. *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 (CCB274), *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 (CCB444) e *Trametes villosa* CCIBt 2513 (CCB176) são alguns dos fungos selecionados e estão sendo estudados em escala de laboratório e de campo (Okino *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2000; Matheus *et al.* 2001; Matheus & Bononi 2002, Matheus *et al.* 2003; Machado *et al.* 2005a; Machado *et al.* 2006; Ballaminut 2007, Salvi 2008, Silva 2009, Okada 2010)

Muitas são as evidências de que os mecanismos que atuam na regulação do sistema ligninolítico dos basidiomicetos são os mesmos que atuam na degradação dos xenobióticos, e,

portanto podem ser também estimulados pela variação das condições de cultivo dos fungos (Boyle 1995, Wu *et al.* 1996; Sandermann *et al.* 1998; Bakshi *et al.* 1999; Kadhim *et al.* 1999, Ullah *et al.* 2000a, Ullah *et al.* 2000b).

Segundo Hofrichter (2002) nos processos de degradação da lignina e de poluentes orgânicos persistentes, certos co-oxidantes, tais como compostos sulfúricos orgânicos (L-cisteína) e ácidos graxos insaturados e seus derivados (ácido linoleico, Tween 80, por exemplo), são oxidados pelo sistema da peroxidase dependente do manganês (MnP) para formar radicais tióis e peroxilas, respectivamente, que são altamente reativos. Na presença de oxigênio, estes radicais podem atacar estruturas recalcitrantes da lignina, as quais não são normalmente abertas diretamente pelo sistema da MnP. Estes radicais também podem ser fontes de H_2O_2.

Este sistema de mediação, baseado nos ácidos graxos insaturados e seus derivados, tem sido proposto para explicar a ação da MnP na degradação de estruturas não-fenólicas da lignina. Este processo, que é conhecido como peroxidação de lipídios, é forte o bastante para quebrar ligações Cα-Cβ e éter β-arílicas em compostos diméricos não fenólicos de modelos de lignina (Kapich *et al.* 1999).

Os óleos vegetais e os surfactantes, como tween 20, podem servir como fontes de carbono para *Phanerochaete chrysosporium* e estimular a atividade ligninolítica (^{14}C-lignina $\rightarrow$ $^{14}CO_2$). Além disso, os óleos vegetais e os surfactantes podem alterar a composição fosfolipídica e a permeabilidade das membranas celulares, facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente a ação das enzimas produzidas (Asther *et al.* 1998, Leštan *et al.* 1990; 1993).

Matheus & Bononi (2002) otimizou as condições de cultivo *Psilocybe castanella* e *Lentinus crinitus*, com a adição de ácidos graxos insaturados ao solo e observou aumento das taxas de mineralização de ^{14}C-HCB em solo superiores a 20% após 56 dias de incubação.

Dessa forma, os ácidos graxos insaturados, presentes no óleo de soja, podem ter intermediado a ação de peroxidases produzidas por *P. castanella* e *L. crinitus* na mineralização do ^{14}C-HCB, através do sistema de peroxidação dos lipídios descrito por Hofrichter (2002). Sendo o HCB um composto muito estável quimicamente, é provável que o estímulo para tais reações oxidativas tenha sido o principal papel desempenhado pelos ácidos graxos presentes no óleo de soja. Assim, o efeito da emulsão de óleo de soja em tween 20 sobre a mineralização de ^{14}C-HCB pode sugerir a ação conjunta destes compostos, promovendo maior crescimento fúngico, maior permeabilidade da membrana, maior difusão de oxigênio e produção de radicais altamente reativos capazes de quebrar o anel benzênico e transformá-lo até $^{14}CO_2$.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos ácidos graxos insaturados e diminuição da concentração dos compostos organoclorados na biodegradação por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Material e Métodos

Solo: contendo organoclorados, principalmente hexaclorobenzeno (HCB), pentaclorobenzeno (PeCB) e isômeros de tetraclorobenzeno (TCBs), foi oriundo de áreas contaminadas na região de restinga do Distrito de Samaritá, São Vicente, SP. O solo tem como características 98% areia, pH 5,07, capacidade de troca iônica de 5,50 mEq. 100 mL^{-1}, 0,13% de matéria orgânica, 0,06% nitrogênio, 1,00 μg g^{-1} fósforo e 0,01 mEq. 100 mL^{-1} potássio, determinadas pelo laboratório "Lagro – Laboratório Agronômico" S/C de Campinas.

Material Biológico: foi utilizado o basidiomiceto *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCIBt 2611 (antes identificado por CCB274) pertencente à Coleção de Cultura de Basidiomicetos do Instituto de Botânica de São Paulo (CCIBt). Este fungo foi isolado de basidioma encontrado

em madeira de mata de restinga no município de São Vicente, região da Baixada Santista, SP (Okino *et al.* 2000) e foi selecionado por degradar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em solo contaminado (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005a). A cultura foi mantida a 4º C em ágar extrato malte (MEA 2%), constituído de: extrato de malte 2 %, peptona 0,1 % e ágar 1,5 %.

Inóculo fúngico: o substrato foi constituído de bagaço de cana-de-açúcar picado misturado com farinha de soja e fécula de mandioca nas proporções de 20 e 30% (peso seco), respectivamente e a umidade ajustada para 70 % com água destilada (Okada 2010). Alíquotas de 120,0 g de substrato sólido foram colocadas no fundo do saco plástico de polipropileno (20,0 x 40,0 cm) e modeladas na forma cilíndrica de modo a produzir inóculos nos formatos e dimensões propostas por Okada (2010). Foram autoclavados por 90 min a 121 ºC (Ballaminut & Matheus 2007). Após resfriamento, discos de crescimento micelial do fungo em placas de Petri contendo MEA 2% foram inoculados nos sacos em condições assépticas na proporção 1:10 (disco : g de substrato úmido). Os inóculos foram incubados em estufa incubadora (ELETROLAB / 101 STD) sob controle de temperatura de 28 ± 2 °C, durante 14 dias.

Condições de cultivo: ao solo contaminado foi adicionado 2,5% (peso seco) de gesso comercial e uma solução de benomyl (10,0 mg Kg^{-1} de solo), para controle fúngico do solo (Machado *et al.* 2006). Após a incorporação do benomyl, 9,0 Kg de solo (seco) foram colocados dentro dos reatores e a umidade foi ajustada com água destilada esterilizada para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) do solo, de acordo com Matheus (2003). Em cada reator, foram incorporados 900,0 g (peso seco) de inóculo fúngico peletizado (3,0 x 4,5cm) segundo Okada (2010). As condições de cultivos analisadas foram: 2 reatores com 5% de uma emulsão de óleo de soja comestível comercial (marca Lisa) e tween 20, na

proporção de 9:1 (p/p), utilizados como controle, 2 reatores com 8% de uma emulsão de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) e 2 reatores com solo diluído 1:10 (90,0 g solo contaminado: 810,0 g solo sem branco) da concentração inicial de organoclorados. A diluição do solo foi feita com a mistura manual do solo contaminado com solo não contaminado da mesma região, na proporção de (1:10 peso seco) em saco de polipropileno. Nos reatores, os solos foram homogeneizados manualmente com auxílio de uma colher de madeira esterilizada, em 3 etapas de 3,0 Kg de solo cada, durante 5 min. Com o biorreator cheio de solo, foi instalado um sensor de temperatura na região central da coluna de solo e pela tampa foi inserida uma sonda medidora de oxigênio (EIJKELKAMP) até a parte central da coluna de solo. A tampa foi fechada e vedada e foi injetado um fluxo de ar não esterilizado na parte inferior mantido sob baixa pressão (0,2 bar) por válvulas e medidores nas saídas de ar. Todo o ar efluente dos reatores foi filtrado em carvão ativado, eliminando todos os resíduos organoclorados, e enviado para atmosfera externa da sala. Os biorreatores foram incubados durante 56 dias em sala com temperatura controlada a 28 ± 3 ºC, no escuro.

Amostragem e análise do solo: foram retiradas de cada reator amostras de 200,0 g de solo imediatamente após a inoculação do fungo e posteriormente aos 7, 14, 28 e 56 dias de incubação, com o auxílio de um trado amostrador de solo (50,0 x 2,5cm) esterilizado a cada coleta para as seguintes análises:

- **Crescimento fúngico:** foi determinado pela quantificação de ergosterol, extraído a partir de amostra de 3,0 g de solo por saponificação alcoólica e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Silva *et al.* (2009).

- **Isolamento de basidiomicetos:** foram retirados três amostras de solo contendo fragmentos do inóculo fúngico, os quais foram inoculados em extrato malte ágar (2%), contendo o corante Azul de Remazol Brilhante Blue R (RBBR 0,02%). Após cinco dias de incubação a 28 ºC foi avaliada a capacidade de crescimento e descoloração do corante e confirmação de crescimento dos basidiomicetos pela observação em microscópio ótico da presença de ansas na hifa fúngica, conforme descrito por Silva (2009).

- **pH:** suspensão de 10,0 g solo em 90,0 mL de água deionizada (em triplicata), foi agitada por 30 min e repousada por 60 mim. A medida do pH foi feita em pHmetro digital, equipado com eletrodo combinado.

- **Umidade do solo:** avaliada por gravimetria das amostras liofilizadas para quantificação de ergosterol.

- **Contagem de unidades formadoras de fungos e bactérias:** foi determinada pelo método de "pour-plate" a partir da inoculação de 1,0 mL da suspensão de solo (10,0 g de solo em 90,0 mL de solução salina a 0,85%) em meio de cultura nutriente Agar (NA) para isolamento de bactérias (24 e 48 h de incubação) e em meio de Martin para fungos (até 7 dias de incubação).

- **Monitoramento do teor de oxigênio do solo:** feito diariamente por uma sonda detectora de oxigênio (EIJKELKAMP) inserido no meio da coluna de solo dos reatores, com variação de 0 a 25%.

- **Monitoramento da temperatura do solo:** feito diariamente às 15:00 h, acoplando-se um termômetro de solo (mod. SalvTerm 700 - Gulton) à sonda instalada na região central da pilha de solo nos biorreatores.

- **Atividades enzimáticas:** o extrato enzimático bruto do solo foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 na proporção de 1:3 (p/v), de acordo com Machado *et al.* (2006). As atividades de oxidação total do ABTS e Lacase foram determinadas pela oxidação do ABTS (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)), medida pela variação de absorbância a 420 nm (ε = 36000 M^{-1} cm^{-1}) durante 10 min, em espectrofotômetro (THERMO SCIENTIFIC – GENESYS 10S UV-Vis), na presença e ausência de peróxido de hidrogênio (Machado & Matheus 2006). Peroxidase foi dada pela diferença entre a oxidação total do ABTS e a atividade de lacase (Eggert *et al.* 1996). Peroxidase dependente de manganês (MnP) foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol (Kuwahara *et al.* 1984). Para todas as enzimas uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 μMol do substrato por minuto.

- **Quantificação dos organoclorados:** a extração dos organoclorados no solo foi feita por micro-ondas, de acordo com método descrito por Andrea *et al.* (2001) modificado. As quantificações foram realizadas em cromatógrafo a gás (Varian CP-3800) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian Saturn 2200), equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor split/spletless e coluna VF-5ms (VARIAN) composta por 5% Difenil e 95% Dimetil Polisiloxano (30 m x 0.25 mm x 0,25 μm). O gás de arraste foi hélio com um fluxo de 1,0 mL min^{-1}, com modo split de 50 vezes. A temperatura de operação foi de 260 ºC no injetor. O programa de temperatura da

coluna foi 100 ºC durante 1:00 min, aumentou 4 ºC min^{-1} até 230 ºC, permanecendo por 34:30 min nessa temperatura e por fim aumentou 35 ºC min^{-1} até 280 ºC permanecendo por 4 min. As amostras analisadas foram diluídas 10 vezes em n-hexano (UV-análise de resíduo da Merk) e filtradas em filtro millex HV 13 mm (ns f-slip da Millipore). A identificação individual dos compostos foi baseada no tempo de retenção relativo a uma mistura de padrões que incluía: HCB, pentaclorobenzeno (PeCB), pentacloroanisol (PCA), pentaclorofenol (PCF) e isômeros de tetraclorobenzeno (TCB). A quantificação dos organoclorados nas amostras de solo foi feita usando a curva padrão construída para cada composto.

Análise estatística: Os dados foram analisados pelo programa estatístico MiniTab versão Release 15. As médias foram comparadas pelo teste de Tuckey sempre protegida por análise de variância (ANOVA) ($\alpha \leq 0,05$). Os dados percentuais foram transformados de acordo com a fórmula de Vieira & Hoffmann 1989.

Resultados e discussão

Crescimento microbiano

O ergosterol vem sendo muito utilizado para determinação de crescimento fúngico em substrato sólido (Gessner & Schmitt 1996, Joergensen 2000, Matheus *et al.* 2003, Compart *et al.* 2007, Moreira-Neto 2006, Ballaminut & Matheus 2007, Okada 2012). Esse marcador bioquímico é um indicador de biomassa ativa de fungos, já que com a morte celular, sua molécula é convertida rapidamente para outros esteróis (Eash *et al.* 1996), sendo estimada apenas a quantidade de biomassa viva. Além disso, existe correlação altamente significativa

(95%) entre a quantidade de ergosterol e a quantidade de biomassa seca para essa linhagem de *L. crinitus* (Silva *et al.* 2009).

O crescimento de *L. crinitus* foi semelhante em todas as situações analisadas com gradativo aumento da quantidade de ergosterol ao longo do período de incubação. O crescimento foi estatisticamente significativo nos biorreatores controle. As quantidades de ergosterol ao final de 56 dias de incubação foram de 15.372,80 ± 808,75 µg g^{-1} solo nos reatores controles, 8.457,40 ± 593,92 µg g^{-1} solo nos reatores com 8% de óleo vegetal e 10.603,87 ± 27,60 µg g^{-1} nos reatores com solo diluído (1:10) (Figura 1).

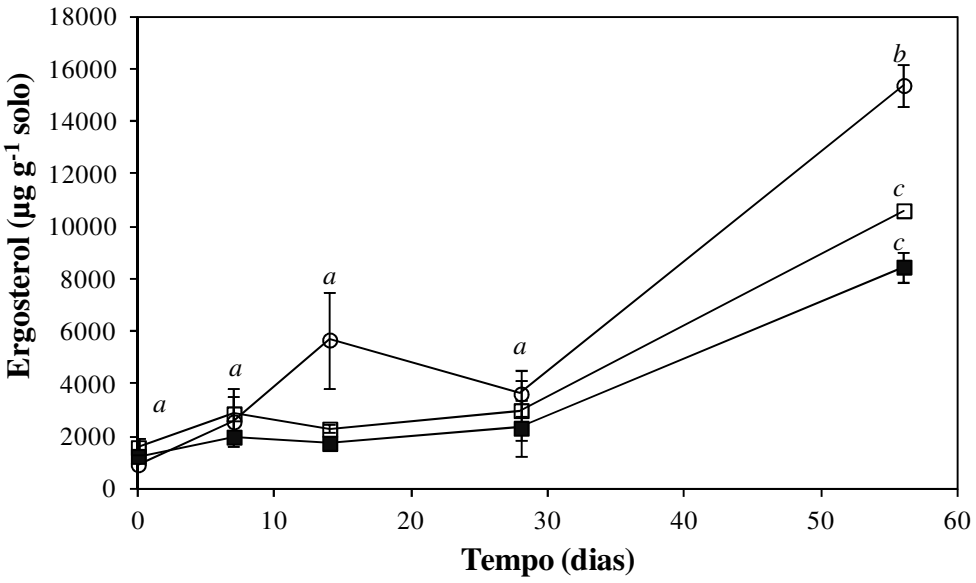


Figura 1: Crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ○ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, $P<0,05$)

Alguns autores afirmam que a idade fisiológica, as características do meio de cultivo e a concentração de organoclorados podem influenciar o metabolismo do ergosterol nas células de algumas espécies fúngicas (Davis & Lamar 1992, Srinivasan & Glaser 1999, Barajas-Aceves *et al*. 2002, Silva *et al.* 2009), porém no presente estudo tal fato não foi evidenciado

para *L. crinitus*, pois com a diminuição da concentração dos compostos organoclorados do solo, não se observou um aumento significativo da biomassa fúngica, porém Novotný *et al.* (2000) observaram que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) contendo 3 ou 4 anéis aromáticos (50 mg Kg^{-1} solo) inibiram o crescimento de *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* em solo. Em estudos realizados por Matheus *et al.* (2000) dentre 36 linhagens de basidiomicetos brasileiros, *L. crinitus* foi uma das linhagens que apresentou tolerância à 50000 mg HCB Kg^{-1} solo e também foi capaz de colonizar o solo contaminado com 4600 mg PCP Kg^{-1} solo, no entanto, outras linhagens avaliadas não foram capazes de colonizar o solo nesta mesma concentração (Machado *et al.* 2005a).

Silva (2009) em estudo de biodegradação de compostos organoclorados, principalmente HCB, em solo utilizando também o basidiomiceto *Lentinus crinitus* acondicionado em biorreator com capacidade para 400 Kg de solo, 5% emulsão de óleo vegetal e tween 20 (9:1 p/p) e com sistema de injeção de ar (1,5 m^3 h^{-1}), porém sem pressão, também observou crescimento de *L. crinitus* pela estimativa de ergosterol, porém as quantidades de ergosterol observadas pelo autor foram muito inferiores (cerca de 13 µg ergosterol Kg^{-1} solo) as obtidas neste estudo (15.900 µg ergosterol Kg^{-1} solo). Matheus *et al.* (2003) em estudo de crescimento de *L. crinitus* em biorreator com solo não contaminado (400 Kg solo) também observaram crescimento de *L. crinitus* até 36 dias de incubação, com 5% da emulsão, porém sem a aeração pressurizada, e o crescimento se manteve estável por até 73 dias de incubação.

Salvi & Matheus (dados não publicados) também em estudo de biodegradação de organoclorados nas mesmas condições de cultivo deste trabalho observaram que a aeração dos reatores sob pressão promoveu uma situação bem otimizada para o crescimento de *L. crinitus* nos reatores (cerca de 30.000 µg ergosterol g^{-1} solo) quando comparadas aquelas observadas por Silva (2009), trabalhando sem a pressurização do ar.

Foi possível isolar *L. crinitus* metabolicamente ativo até o final do período de incubação em todas as condições avaliadas com a análise de descoloração do corante RBBR e a presença de ansa no micélio fúngico, evidenciando tratar-se do basidiomiceto (Tabela 1). Esses dados obtidos corroboram com a análise de crescimento fúngico pela estimativa de ergosterol, onde foi possível quantificar ergosterol até 56 dias de incubação de *L. crinitus*. Silva (2009) também observou *L. crinitus* metabolicamente ativo por até 56 dias de incubação em biorreator. Valentín *et al.* (2007) em estudo de biorremediação de solo contaminado com HPAs em biorreator, também isolou o fungo *Bjerkandera adusta* metabolicamente ativo após 21 dias de incubação, pela análise de descoloração do corante Poly R-478 em placa.

Tabela 1: Isolamento de *L. crinitus* nas amostras simples de coluna de solo, em triplicata

Biorreatores	**Tempo de incubação (dias)**				
	0	**7**	**14**	**28**	**56**
Controle	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**++-**
8% de óleo vegetal	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**
Solo diluído (1:10)	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**	**+++**

\+ indica crescimento de *L.crinitus* confirmado pela descoloração de RBBR e observação microscópica, em cada réplica da amostra.
\- indica ausência de crescimento de *L.crinitus* na réplica analisada.

Na primeira amostragem não foram isoladas colônias de fungos contaminantes em nenhuma das situações avaliadas, colônias de bactérias foram observadas em apenas uma condição, evidenciando assim eficiência do controle de fungos do solo pelo benomyl (Tabela 2).

A injeção de ar não esterilizado nos biorreatores permitiu a entrada de outros micro-organismos durante o período de incubação (Tabela 2), o que é de se esperar em tratamentos em larga escala de solo, uma vez que seja inviável do ponto de vista operacional e financeiro

o procedimento de esterilização de grandes volumes de solo (Holroyd & Caunt 1995, Dupont *et al*. 1998, Alexander 1999).

Tabela 2: Contagem de UFCs bacterianas e fungos contaminantes no solo aos 0 e 56 dias de incubação nos biorreatores

Biorreatores	Bactérias (UFC g^{-1} solo) x 10^5		Fungos (UFC g^{-1} solo) x 10^5	
	0 dias	56 dias	0 dias	56 dias
Controle	0,00 (± 0,00)	31,5 (± 11,25)	0,00 (± 0,00)	87,75 (± 51,75)
8% de óleo vegetal	0,00 (± 0,00)	292,5 (± 160,20)	0,00 (± 0,00)	168,75 (± 131,40)
Solo diluído (1:10)	3,50 (± 2,50)	18,0 (± 9,00)	0,00 (± 0,00)	4,50 (± 2,70)

UFCs = unidades formadoras de colônia

Oxigenação, umidade, pH e temperatura do solo

Durante o crescimento de *L. crinitus* no solo contaminado foi acompanhado a porcentagem de oxigênio nos reatores (Figura 2). Os resultados apresentados referem-se apenas aos reatores com 8% de óleo vegetal e solo diluído (1:10), por uma limitação na quantidade de equipamento, pois o laboratório dispunha de apenas 4 sondas detectoras de oxigênio.

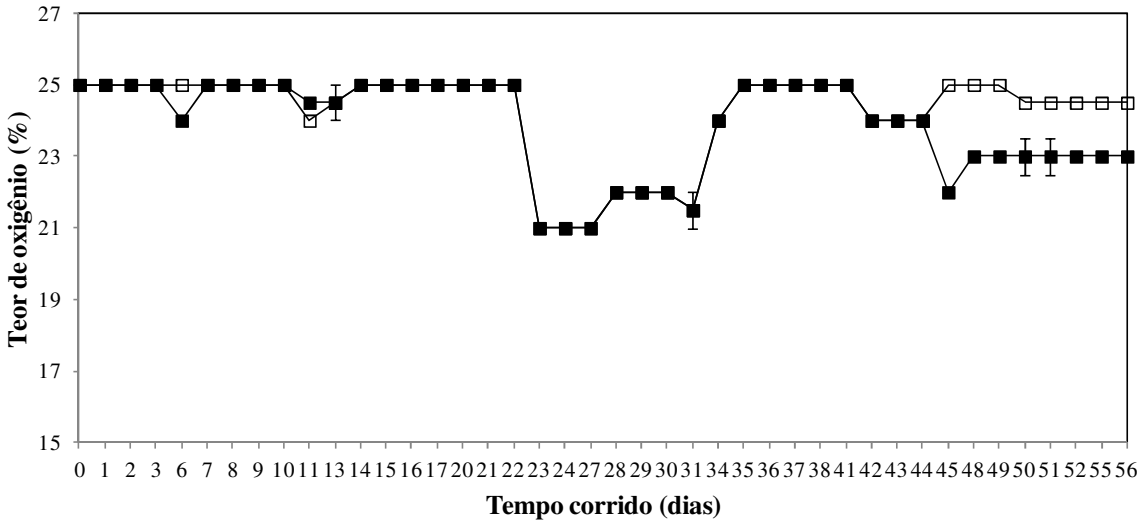


Figura 2: Monitoramento da % de oxigênio do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ■ 8% de

óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

A figura 3 mostra o aumento da umidade do solo nos biorreatores a partir da umidade determinada inicialmente em todos os tratamentos até a primeira semana de incubação. Em todos os reatores a partir do 14º dia de incubação houve a necessidade de se ajustar a umidade dos solos com água destilada esterilizada em todos os dias de amostragem até o final do período de incubação.

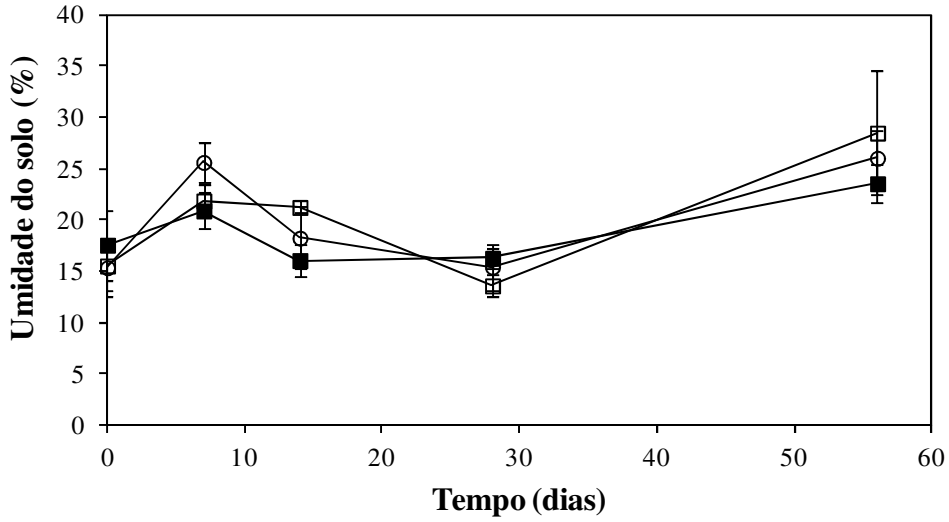


Figura 3: Monitoramento da umidade do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ○ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC (Barras de erro ± desvio médio).

Como descrito na literatura a degradação microbiana do material orgânico no solo promove a formação de dióxido de carbono e água (Kiehl 1985, Dupont *et al*. 1998, Alexander 1999).Silva (2009) afirma que o aumento da umidade do solo indica atividade biológica intensa dos fungos, o que foi observado pelo autor. Embora neste estudo tal efeito tenha sido observado apenas durante a primeira semana de incubação do fungo, isso não

indica que *L. crinitus* não está ativo, pois pelas análises de crescimento microbiano, atividade enzimática e isolamento de microrganismo, evidencia-se a ação do fungo.

Durante todo o período de incubação de *L crinitus* em solo não houve diferença significativa entre os valores de pH registrados em todos as condições avaliadas (Figura 4).

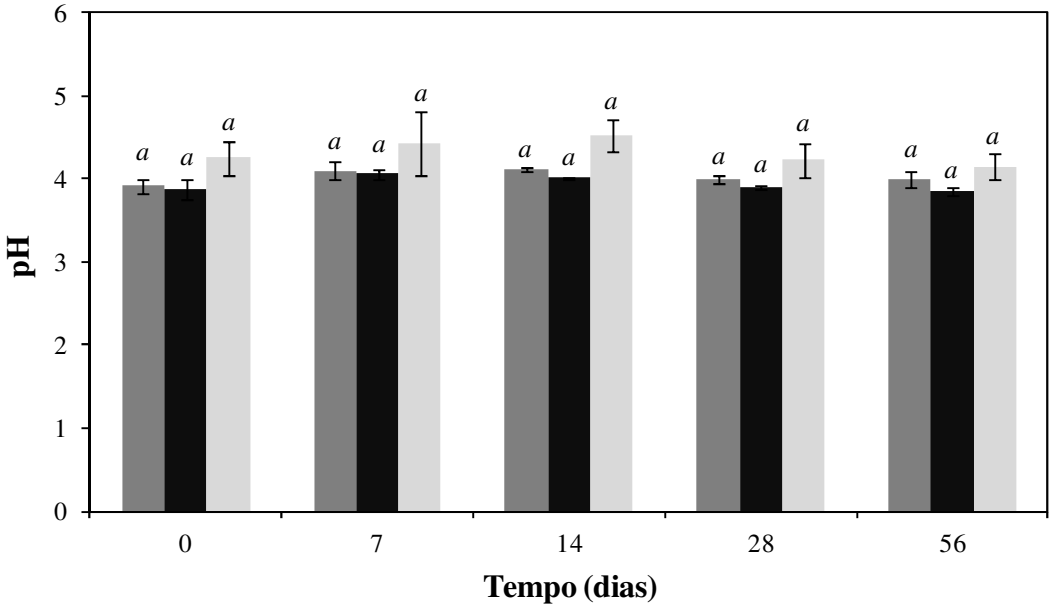


Figura 4: pH do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ■ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras iguais indicam igualdade estatística - Teste de Tukey, $P<0,05$)

Já é bem documentada na literatura a diminuição do pH do meio ou substrato de cultivo com o crescimento de muitas espécies de basidiomicetos (Okeke *et al*. 1996, Itoh *et al*. 2000, Tekere *et al*. 2001, Galhaup *et al*. 2002, Robles-Hernández *et al*. 2008, Moreira Neto *et al*. 2009, Silva 2009). A redução do pH está associada com a liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos (Robles-Hernández *et al*. 2008), e dependendo de sua natureza química, esses ácidos podem interferir na atividade de enzimas ligninolíticas (Itoh *et al*. 2000). Embora tal resultado não tenha sido observado no presente estudo isto não significa

que o fungo não esteja ativo. Em estudo de biodegradação de HPAs em solo com 50 mg Kg^{-1} solo em biorreator de fermentação sólida utilizando o fungo *Bjerkandera adusta* Valentín *et al.* (2007) observaram aumento significativo do pH do solo.

Na figura 5 está apresentada a variação diária da temperatura dos biorreatores. Não houve diferença significativa das temperaturas em todas as condições avaliadas até 56 dias de incubação de *L. crinitus*. As temperaturas dos biorreatores ficaram abaixo da temperatura da sala de incubação, devido ao fato de o ar injetado ser retirado da atmosfera externa da sala, referindo-se à temperatura do ambiente externo, pois a temperatura da sala de incubação era controlada a 28 ± 3ºC.

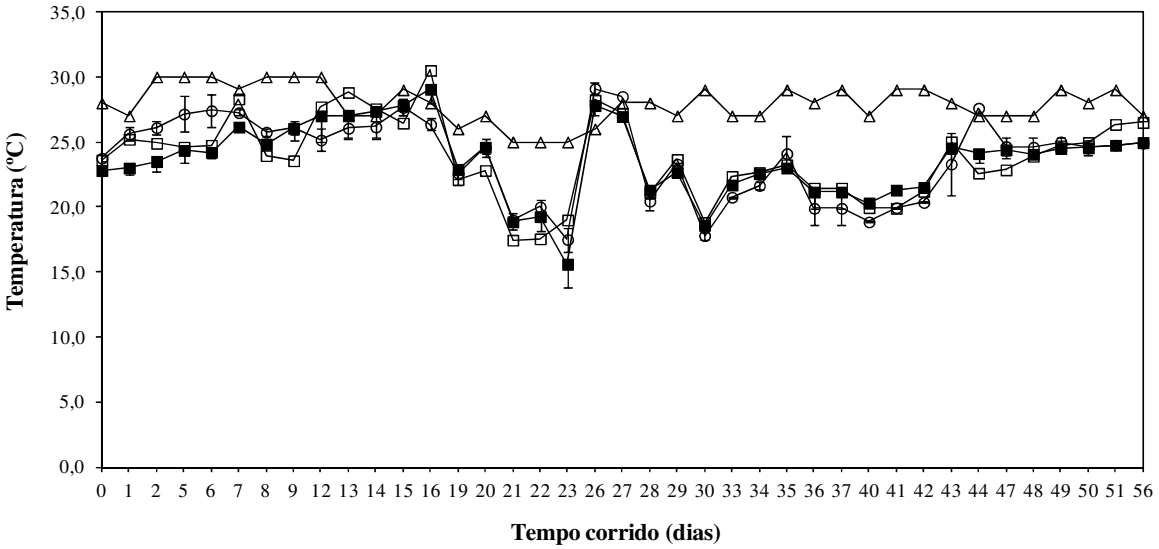


Figura 5: Variação diária da temperatura do solo durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, ○ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, Δ temperatura da sala de incubação, durante 56 dias de incubação a 28 ± 3ºC (Barras de erro ± desvio médio).

Atividade enzimática

Foram observadas atividades enzimáticas durante todo período de crescimento de *L. crinitus* em todos os tratamentos avaliados. Na figura 6 estão apresentadas as atividades de oxidação total do ABTS, foi possível observar efeito altamente significativo do aumento da concentração de óleo vegetal na oxidação total do ABTS. O pico de maior atividade enzimática foi observado no dia da inoculação dos reatores, com 468,08 ± 176,06 UL^{-1} nos reatores controles, 1369,60 ± 457,31 UL^{-1} nos reatores com 8% de óleo vegetal e 90,84 ± 51,46 a UL^{-1} nos reatores com solo diluído (1:10).

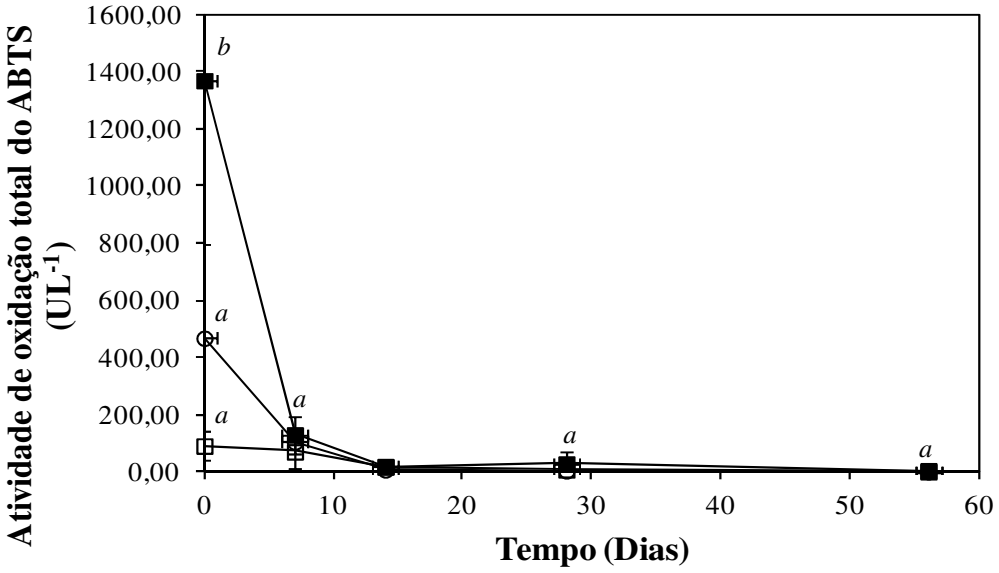


Figura 6: atividade de oxidação total do ABTS pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, durante crescimento em solo contaminado com organoclorados, ○ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, P<0,05)

As atividades de lacase e peroxidadase estão apresentadas na figura 7 A e B, respectivamente. Foi possível determinar as atividades dessas enzimas até o final do tempo de

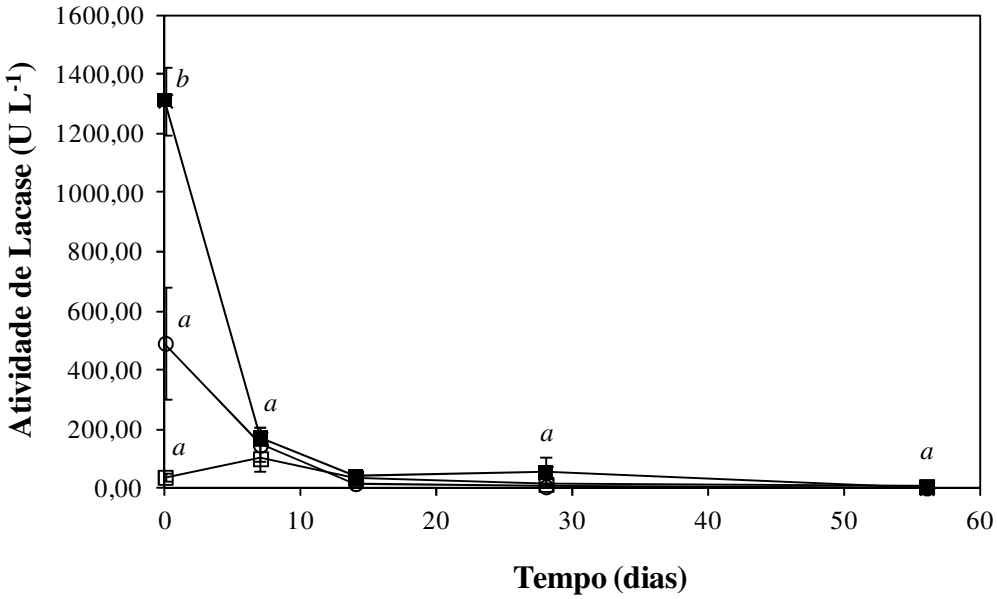
incubação de *L. crinitus*. O maior pico de atividade de Lacase também foi registrado no dia da inoculação dos reatores, com 491,40 ± 188,32 UL^{-1} nos reatores controles, 1312,40 ± 514,56 UL^{-1} nos reatores com 8% de óleo vegetal e 100,86 ± 43,01 UL^{-1} nos reatores com solo diluído (1:10).

Foi observada uma diminuição significativa das atividades de oxidação total do ABTS e lacase a partir das atividades determinadas inicialmente em todas as condições avaliadas. Em que pese saber ainda que basidiomicetos sejam capazes de tolerar concentrações elevadas de poluentes orgânicos (Leontievsky *et al.* 2002, D'Annibale, *et al.* 2005, Machado *et al.* 2005b), a presença desses xenobióticos em culturas fúngicas pode interferir nos processos metabólicos, incluindo alterações nas atividades das enzimas ligninolíticas (Barr & Aust 1994). Compostos xenobióticos podem promover, em organismos eucariotos, alterações de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais, podendo ocorrer aumento ou diminuição da atividade no meio intracelular ou extracelular, por inibição ou por meio da interação direta do agente químico com a proteína (Jonsson 2005).

Alguns autores comentam a relação do período de incubação com a atividade de lacase. Walter *et al.* (2004) estudaram a biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes versicolor*, crescido em substrato sólido, e verificaram diminuição da atividade de lacase durante a incubação. Contrária ao crescimento do fungo que, avaliado pelo potencial biológico, aumentou durante o período de incubação.

Diferentemente do observado com as demais enzimas o pico de atividade de peroxidadase foi aos 7 dias de incubação de (figura 7 B), com 11,33 ± 1,32 UL^{-1} nos reatores controles, 23,33 ± 3,82 a UL^{-1} nos reatores com 8% de óleo vegetal e 21,06 ± 2,00 UL^{-1}. nos reatores com solo diluído (1:10).

A



B

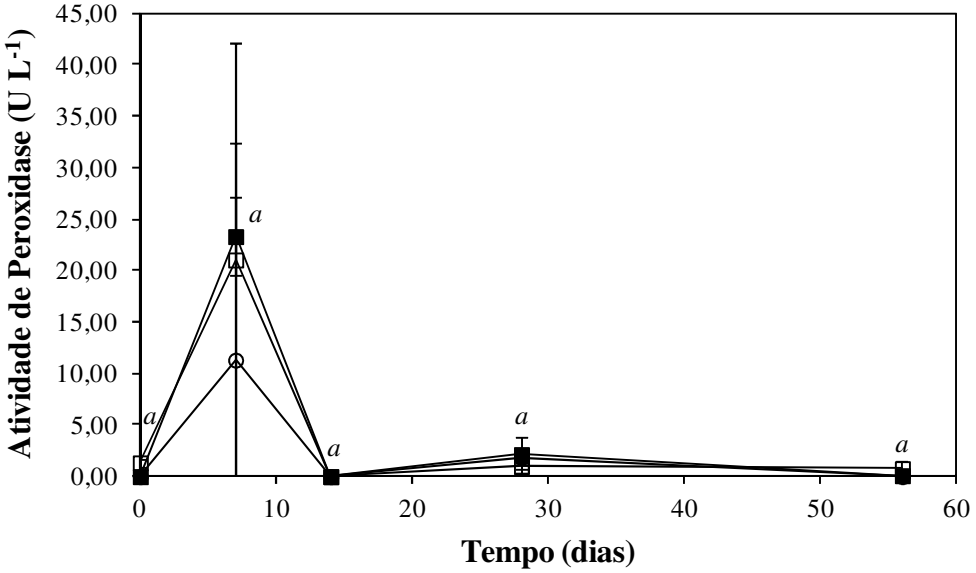


Figura 7: atividade de lacase (A) e peroxidase (B) pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, durante crescimento em solo contaminado com organoclorados, ○ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, □ Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28±3ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

(Letras diferentes indicam diferença estatística - Teste de Tukey, $P<0,05$)

Observou-se um efeito altamente significativo da concentração do óleo vegetal nas atividades enzimáticas, os reatores com 8% de óleo vegetal apresentaram os maiores

valores de oxidação total do ABTS e lacase. Asther *et al.* (1988), Leštan *et al.* (1990, 1993) observaram que os óleos vegetais e os surfactantes, como Tween 20, podem servir como fontes de carbono para *Phanerochaete chrysosporium* e estimular a atividade ligninolítica. Além disso, os óleos vegetais e os surfactantes podem alterar a composição fosfolipídica e a permeabilidade das membranas celulares, facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente, a ação das enzimas produzidas.

A determinação da atividade de enzimas ligninolítcas em processos de biorremediação é um dos parâmetros avaliados para o acompanhamento do fungo na degradação dos compostos xenobióticos. Em seu estudo de biodegradação de organoclorados Silva (2009) também observou atividade de oxidação total do ABTS e Lacase, porém em quantidades bem inferiores às obtidas neste estudo, com seu pico de maior atividade sendo aos 14 dias de incubação de *L. crinitus*, com cerca de 7,08 U L^{-1} de fenoloxidade e 4,11 U L^{-1} de lacase. O autor também relata que aos 28 dias a atividade dessas enzimas diminuiu consideravelmente nos biorreatores, não tendo sido mais detectadas a partir dos 56 dias. Em estudo de biodegradação de HCB em solo (2000 mg HCB Kg^{-1} de solo) por *Psilocybe castanella* CCIBt 2718 (CCB444), em microcosmos, Moreira-Neto (2006) observou a produção de peroxidase durante todo o período de cultivo (70 dias), sendo que o pico de maior atividade foi aos 12 dias de incubação com 103,71 UL^{-1}.

Não foi observada atividade de peroxidase dependente de manganês (MnP) até 56 dias de incubação de *L. crinitus* em quaisquer das situações avaliadas, embora Ballaminut (2007) tenha demonstrado a capacidade de *L. crinitus* produzir MnP. Silva (2009) também não registrou atividade de MnP por *L. crinitus* em bioreator durante todo período de incubação do fungo. Moreira-Neto (2006) também não obteve atividade de MnP no cultivo de *Psilocybe castanella* CCIBt 2718 (CCB444) em solo contaminado com hexaclorobenzeno (2000 mg

HCB Kg^{-1} de solo) em microcosmos, sugerindo que as condições de cultivo tenham provocado a inibição da enzima.

A produção e atividade de peroxidases dependente de manganês (MnP) está intimamente relacionada com o bom desenvolvimento dos fungos, mas também com a presença de mediadores bioquímicos no sistema de cultivo, embora muitos desses mediadores possam ser produzidas pelo metabolismo do próprio fungo (Hofrichter 2002, Moreira-Neto 2006, Jarosz-Wilkolazka & Graz 2006, Asgher *et al*. 2008). Um destes sistemas é baseado na mediação por ácidos graxos insaturados e seus derivados (lipídeos) e tem sido relacionado com a degradação de estruturas não fenólicas de lignina por MnP. Este sistema atua pela geração de radicais intermediários reativos (radicais peroxil) a partir de estruturas de ácidos graxos insaturados, processo conhecido como peroxidação lipídica. Embora tenha sido introduzido óleo vegetal ao sistema de cultivo do fungo não foi possível quantificar a MnP.

Biodegradação dos organoclorados

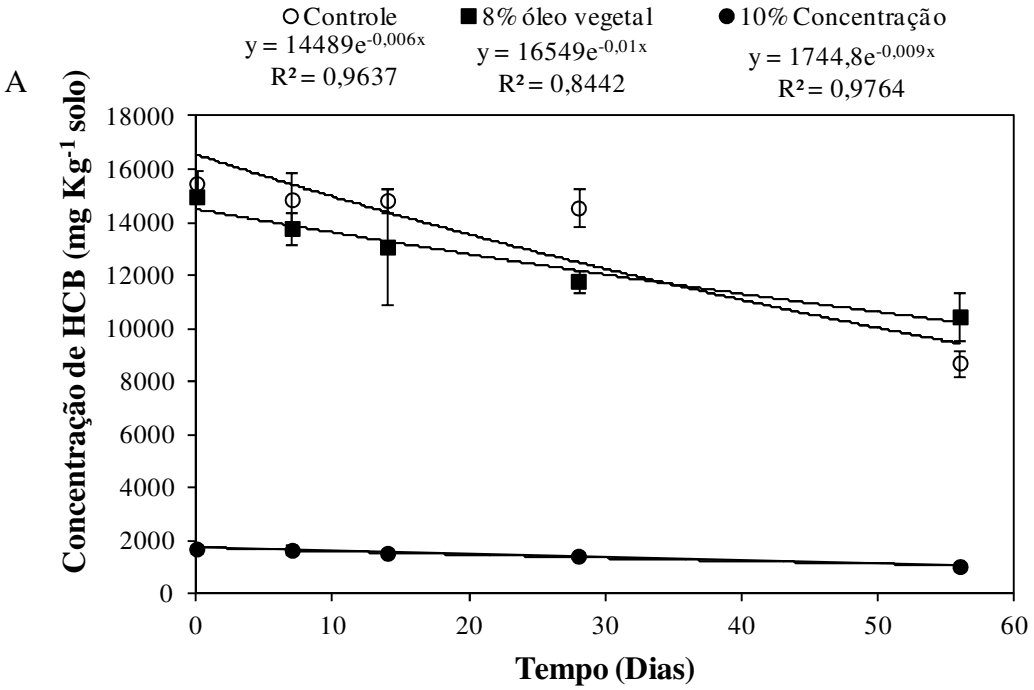
As concentrações iniciais dos compostos organoclorados no solo variaram entre 14979,67 ± 105,86 a 15472,93 ± 472,03 mg HCB Kg^{-1}, 4877,66 ± 264,46 a 5565,67 ± 335,60 mg PeCB Kg^{-1} e 242,88 ± 4,61 a 259,39 ± 11,88 mg TCB total Kg^{-1}. Observou-se uma diminuição significativa da concentração desses compostos organoclorados ao final do período de incubação de *L. crinitus* em todas as condições analisadas (Figura 8 A, B e C). As porcentagens de degradação dos organoclorados do solo estão apresentadas na tabela 3. Não houve diferença estatística significativa nas porcentagens de degradação dos organoclorados do solo entre as situações avaliadas.

Tabela 3: Porcentagem de degradação dos compostos organoclorados do solo ao final de 56 dias de incubação de *L. crinitus*

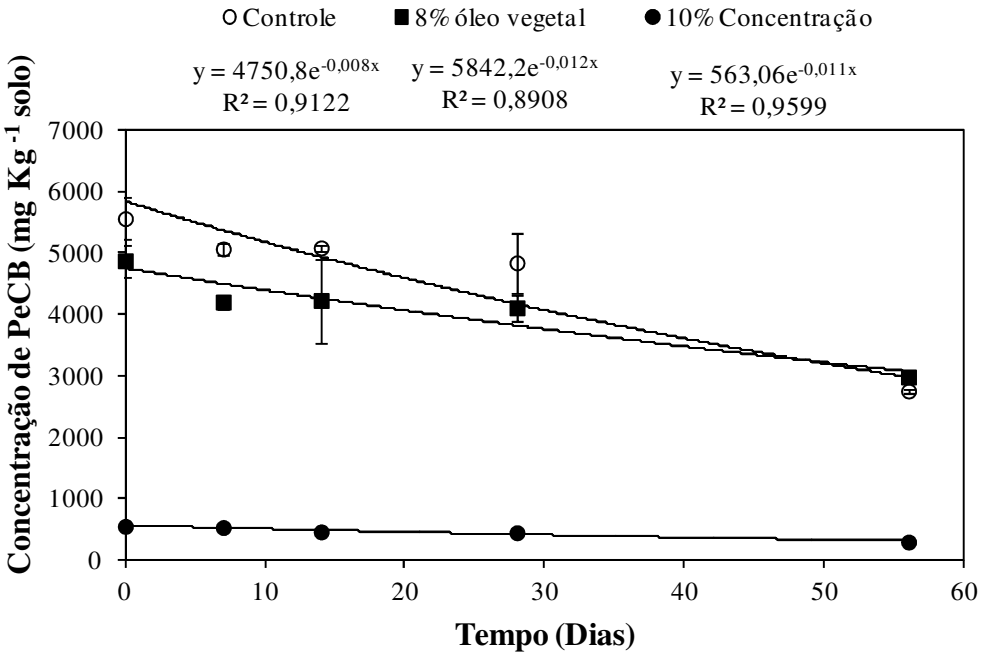
Biorreatores	Degradação dos compostos organoclorados do solo (%)		
	HCB	PeCB	TCB
Controle	43,70 a	50,47a	37,38 a
8% de óleo vegetal	30,27 a	38,80 a	41,79 a
Solo diluído (1:10)	38,99 a	46,27a	29,26 a

Letras iguais indicam igualdade estatística - Teste de Tukey, $P<0,05$

A



B



C

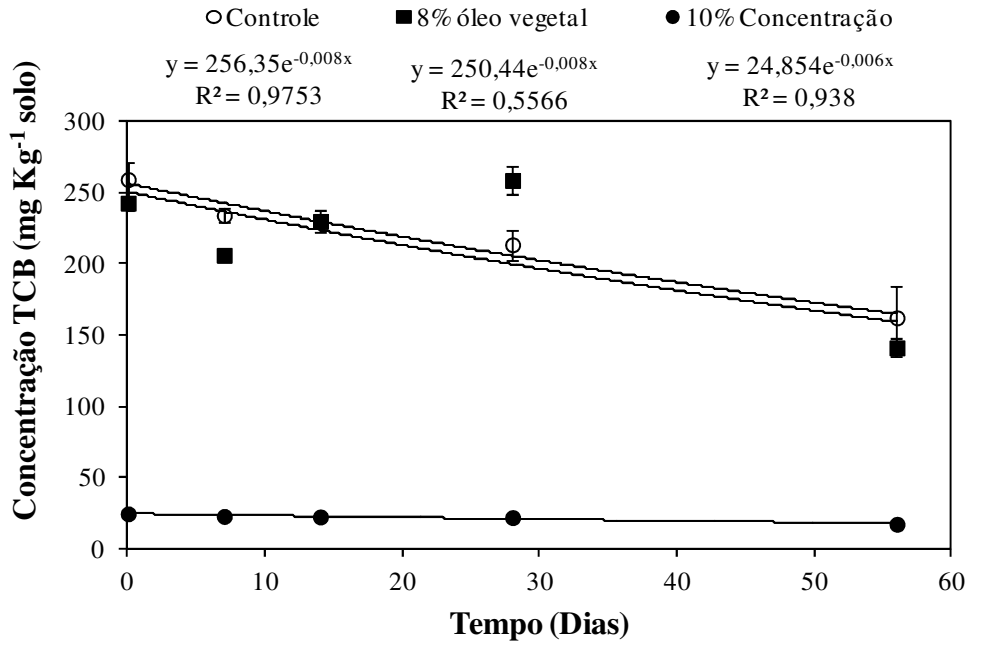


Figura 8: Concentração dos compostos organoclorados no solo, A) hexaclorobenzeno, B) pentaclorobenzeno, C) tetraclorobenzeno, durante crescimento de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, ○ Controle, ■ 8% de óleo vegetal, ● Solo diluído (10:1) da concentração de organoclorados, durante 56 dias de incubação a 28 ± 3 ºC. (Barras de erro ± desvio médio).

Com a linearização da equação foi possível determinar a cinética de degradação de primeira ordem e, com isso calcular a taxa de degradação diária e a meia vida de cada composto (Dupont *et al.* 1998) (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de degradação diária e meia vida dos compostos organoclorados contaminantes do solo calculadas pela linearização da equação

Biorreatores	HCB		PeCB		TCB	
	Taxa de degradação diária (mg kg^{-1} solo)	Meia Vida (dias)	Taxa de degradação diária (mg kg^{-1} solo)	Meia Vida (dias)	Taxa de degradação diária (mg kg^{-1} solo)	Meia Vida (dias)
Controle	117,40	65,89	47,50	58,58	1,60	81,06
8% de óleo vegetal	77,03	96,89	29,42	82,89	1,44	84,33
Solo diluído (1:10)	11,86	71,55	4,46	61,76	0,11	113,50

Como observado na análise da atividade enzimática era de se esperar que com o aumento da concentração da emulsão de óleo vegetal e tween 20 adicionada ao sistema de cultivo, houvesse um aumento na taxa de degradação dos organoclorados, como registrado por Matheus (2003), onde *L. crinitus* foi capaz de remover cerca de 68,0 % de HCB em solo (32.960 mg HCB kg^{-1} solo) e mineralizar cerca de 25% de ^{14}C-HCB em 56 dias de incubação quando 8% de óleo vegetal foi adicionado ao solo. Alguns trabalhos descrevem que a concentração de óleo vegetal adicionada ao sistema é o principal fator que determina os efeitos sobre os tratamentos biológicos. Concentrações de óleos vegetais que variam de 0,2% (p/p) a 5% (p/p) têm sido utilizadas como co-substratos para melhorar a biotransformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de 11% para 68%, em condições otimizadas (Boogan & Lamar 1999, Pannu *et al.* 2003, Schuur *et al.* 2003, Leonard *et al.* 2008, Scherr *et al.* 2009). Pannu *et al.* (2003) descreveram os efeitos da adição de óleo vegetal na biodegradação de HPAs em solo em biorreator inoculado com uma cultura mista de bactérias.

A presença de 0,2% (p/p) de óleo de amendoim estimulou a degradação dos HPAs em um sistema de chorume de solo (razão de 2:1 água: solo), sendo que 96% de fenantreno, 74% de antraceno, 65% de pireno e 70% de benzo [a] pireno foram degradados após 24 dias de incubação a 30 ◦C. Em outro estudo realizado por Scherr *et al.* (2009), a biodegradação foi realizada a 20 ºC na presença de 1% (v/v) de óleo de canola em cultura mista inoculada em suspensão de solo (20 ml de água : 5 g de solo). A adição de óleo aumentou a biodisponibilidade aos HPAs com até 4 anéis, mas não teve efeito nos compostos com 5 e 6 anéis. A eficiência de remoção foi de 78,7% em solo contaminado proveniente de uma antiga ferrovia (cerca de 105 dias de tratamento). Bogan e Lamar (1999) também realizaram estudo de biodegradação de HPAs em solo com fungos de podridão branca com a dição de 5% de óleo vegetal (p/p) com remoção total de 83,3% após 35 dias de 13 HPAs.

Leonardi *et al.* (2008) foram os únicos que estudaram a biodegradação de HPAs em solo inoculado com fungos de podridão branca, *Irpex lacteus* e *Pleurotus ostreatus*, previamente crescidos em caule de milho e incubados a 24 ◦C, no escuro e úmido (15% de água). A adição de 2,5% (p/p) de óleo de soja aumentou a degradação de 7 tipos de HPAs com uma eficiência de remoção entre 75 a 100% após 45 dias de incubação de ambos os fungos.

Moreira-Neto (2006) observou degradação de 32,4% de HCB em solo com 2000 mg Kg^{-1} e adição de 5% de emulsão de óleo vegetal e tween 20 após 70 dias de incubação de *Psilocybe castanella* em microcosmos. Vitali (2004) também observou a redução de 42,82% HCB e 60% PeCB por *P. castanella* e *Eupenicillium baarnense* em solo com 5% de óleo vegetal com cerca de 3770 mg HCB kg^{-1} de solo. Ballaminut (2007) em estudo de biodegradação de pentaclorofenol em solo (200 mg PCF Kg^{-1} de solo) também com 5% de óleo vegetal registrou 100% de degradação do composto por *L. crinitus*. Matheus (2003)

observou que *P. castanella* reduziu cerca de 50% de PeCB em ensaios em microcosmos com 30 g de solo e 2,5% de óleo vegetal.

O efeito da adição de óleo vegetal também foi observado na biodegradação de endosulfan por Correa (2005). A degradação de endosulfan por *Aspergillus* sp., em meio de cultura líquido, foi potencializado quando foi introduzido óleo de soja ao meio de cultura. O autor atribui esse aumento da degradação ao aumento considerável da biomassa fúngica provocada pela adição do óleo de soja ao meio de cultura.

Rosenbrock *et al.* (1997) detectaram 38% de degradação de ^{36}Cl-HCB em solo, porém em condições anaeróbicas, quando se adicionou o surfactante Tween 80 juntamente ao solo com glicose, porém sem observar mineralização do composto. Hirano *et al.,* (2007) também registraram degradação de 60% do HCB em estudo de biodegradação de HCB em sedimento e em condições anaeróbicas, sem qualquer mineralização ou produção de compostos voláteis.

Embora os trabalhos acima citados demonstrem que a adição de óleo vegetal pode ampliar a capacidade de micro-organismos em degradar contaminantes como os HAPs e organoclorados, outros estudos indicaram que a adição de óleo vegetal em tratamento do solo resultou em uma inibição (Scheer *et al.* 2008) ou nenhum efeito significativo (Pizzul *et al.* 2006). Acima das concentrações desejadas de óleo vegetal, a degradação teve sua eficiência reduzida (Pannu *et al.* 2003), não apresentando alterações significativas (Scherr *et al.* 2009). Quantidades excessivas de fonte primária de carbono podem inibir a biodegradação dos contaminantes, resultando em insuficiência energética dos microrganismos para degradar por cometabolismo os poluentes (Baipai *et al.* 2003). Tais situações corroboram com os resultados aqui observados, onde a adição da emulsão de óleo vegetal e tween 20 (9:1) acima de 5% não apresenta efeito significativo sobre a degradação dos organoclorados, em condições de biorreatores.

Em estudos de biodegradabilidade de compostos tóxicos orgânicos ou inorgânicos em solo existem alguns parâmetros que podem afetar o processo, são eles: oxigenação do solo, nutriente, temperatura, pH e principalmente a concentração dos compostos contaminantes do solo. A concentração muito elevada desses compostos pode ser tóxica para os micro-organismos afetando assim seu potencial de biodegradação, levando a necessidade de diminuição da concentração para permitir sua degradação (Dupont 1998, Gevao *et al.* 2000), porém com os resultados obtidos neste trabalho essa afirmativa não pode ser usada para *L. crinutus* uma vez que, com a diminuição da concentração dos compostos organoclorados presentes para 1697,24 mg HCB Kg^{-1} solo e 550,90 mg PeCB Kg^{-1} solo, as taxas de degradação foram semelhantes às obtidas nos tratamentos com alta concentração de organoclorados (15226,30 mg HCB Kg^{-1} solo e 5221,67 mg PeCB Kg^{-1} solo).

Conclusão

O aumento da concentração de óleo vegetal ao sistema de cultivo de *L. crinitus* e a diminuição da concentração dos organoclorados presentes no solo não influenciaram no crescimento de *L. crinitus* nos reatores e tão pouco não foi observado diferença significativa nas taxas de degradação dos compostos organoclorados, contudo houve um aumento significativo da produção das enzimas ligninolíticas com a introdução de 8% de óleo vegetal.

Agradecimentos

Agradecemos a Rhodia do Brasil e a Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG, pelo suporte financeiro, a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, ao Instituto de Botânica de São Paulo pelo uso do laboratório e ao Centro de

Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA) e a Dra. Ellen Aquino Perpétuo pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Referências Bibliográficas

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. New York: Ed. Academic Press, 453p.

Andrea, M. M, Papini, S. & Nakagawa, L. E. 2001. Otimizing microwave-assited solvent extraction of pesticides from soil. Journal of Environmental Science and Health 36 (1): 87-93.

Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M. & Legge, R.L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. Biodegradation.

Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G. & Odier, E. 1998. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete crysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. Applied Microbiology and Biotechnology 27: 393-398.

Bailey, R.E. 2001. Global hexachlorobenzene emissions. Chemosphere 43: 167–182.

Baipai, R.; Kim, J. & Qasin, M. 2003. Bioremediation. *In:* D. R. Heldman, C. I. Morau (Eds.), Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering, Marcel Dekker, New York, p. 108–118.

Bakshi, D. K., Gupta, K. G. & Sharma, P. 1999. Enchanced biodecolorization of synthetic textile dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium* under improved culture conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 507-509.

Ballaminut, N. 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163p.

Ballaminut, N., & Matheus, D. R. 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. Brazilian Journal of Microbiology 38: 248-252.

Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Yinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. Journal of Microbiological Methods 50: 227-236.

Barber, J. L., Sweetman, A. J., Wijk, D. V. & Jones, K. C. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. Science of the Total Environment 349: 1-44.

Barr, D. P. & Aust, S. D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. Environmental Science and Technology 28 (2): 78-87.

Bogan, B. W. & Lamar, R. T. 1999. Surfactant enhancement of white-rot fungal PAH soil remediation, *In:* A. Leeson, B. C. Alleman (Eds.). Bioremediation Technologies for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compounds, Battelle Press, Columbus.

Boyle, C. D. 1995. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. Canadian Journal of Microbiology 41 (4-5): 345-353.

Compart, L. C. A., Machado, K. M. G., Matheus, D. R. & Cardoso, A. V. 2007. Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23 (10): 1479-1483.

Côrrea, C. M. D. 2005. Efeito de óleo de soja na persistência de Endosulfan no ambiente. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 85p.

D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quaratino, D., Mincione, E. & Petrucciol, M. 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. Biotechnology and Bioengineering 90 (6): 723-731.

Davis, M. W. & Lamar, R. T. 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. Soil Biology & Biochemistry 24 (3): 189-198.

Dupont, R. R., Bruell, C. J., Marley, M. C., Downey, D. C., Norris, R. D., Hulling, S. G. & Pivets, B. 1998. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.

Eash, N. S., Stahl, P. D., Parkin, T. B. & Karlen, D. L. 1996. A simplifieild method for extraction of ergosterol from soil. Soil Science Society of America Journal 60: 468-471.

Eggert, C., Temp, U. & Eriksson, K. E. L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus:* purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology 62 (4): 1151-1158.

Field, J. A. & Sierra-Alvarez, R. 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. Biodegradation 19: 463-480.

Freire, R. S., Pelegrini, R., Kubota, L. T. & e Durán, N. 2000**.** Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. Química Nova 23 (4): 504-511.

Gallaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. & Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. Enzyme and Microbial Technology. 30: 529-536.

Gessner, M. O. & Schmitt, A. L. 1996. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. Applied and Environmental Microbiology 62 (2): 415-419.

Harms, H., Schosser, D. & Wick, L. Y. 2011. Untapped potencial: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Applied and Industrial Microbiology 9: 177-192

Hirano, T., Ishida, T., Oh, K. & Sudo, R. 2007. Biodegradation of chlordane and hexachlorobenzene in river sediment. Chemosphere 67: 428-434.

Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology. 30: 454-466.

Holroyd, M. L. & Caunt, P. 1995. Large-Scale Soil Bioremediantion Using White-Rot Fungi. *In*: Bioaumentation for Site Remediation. Hinchee, R., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (eds.). Columbus: Battelle Press 181-187.

Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K. & Yamamoto, H. 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. Soil Biology & Biochemistry 32: 85-91.

Jarosz-Wilkoazka, A. & Graz, M. 2006. Organic acids production by white rot Basidiomycetes in the presence of metallic oxides. Canadian Journal Microbiology 52: 779-785.

Joergensen, R. G. 2000. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. Soil Biology and Biochemistry 32: 647-652.

Jonsson, C. M. 2005. Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum:* extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 117 p.

Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S. & Rastall, R. A. 1999. Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. Enzyme and Microbial Technology 24: 303-307.

Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. & Hatakka, A. 1999. Coupling of manganese peroxidasemediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model

compounds and ^{14}C-labeled lignins. Biochemical and Biophysical Research Communications 259: 212-219.

Kiehl, E. J. 1985. Fertilizantes orgânicos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. 492p.

Kulikova, N. A., Klein, O. I., Stepanova, E. V. & Koroleva, O. V. 2011. Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies: Fundamental and Applied Aspects (Review). Applied Biochemistry and Microbiology 47: 619-634.

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. & Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters 169: 247-250.

Leonardi, V., Giubilei, M. A., Federici, E., Spaccapelo, R., Sasek, V., Novothny, C., Petruccioli, M. & D'Annibale, A. 2008. Mobilizing agents enhance fungal degradation of polycyclic hydrocarbons and affect diversity of indigenous bacteria in soil. Biotechnology and Bioengineering 101: 273–285.

Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Golovleva, L. A., Sedarati, M. & Evans, C. S. 2002. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentration of chlorophenols. Applied Microbiology and Biotechnology 59: 599-604.

Leštan, D., Cernilec, M., Strancar, A. & Perdih, A. 1993. Influence of some surfactants and related compounds ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters 106: 17-22.

Leštan, D., Strancar, A. & Perdih, A. 1990. Influence of some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 34: 426-428.

Liu, J., Li, D. B. & Yang, J. C. 2007. Operating characteristics of solid-state fermentation bioreactor with air pressure pulsation. Applied Biochemistry and Microbiology 43 (2): 211–216.

Lodolo, A., Gonzalez-Valencia, E. & Miertus, S. 2001. Overview of remediation technologies for persistent toxic substances. Arh Hig Rada Toksiko 52: 253-280.

Machado, K. M. G. & Matheus, D. R. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 37: 468-473.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R. 2005a. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 297-301.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R. 2005b. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. Brazilian. Journal of Microbiology 36: 246-252.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Rodrigues, T. A. & Bononi, V. L. R. 2006. Enhancement of growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. Brazilian Journal of Microbiology 37: 425-427

Matheus, D. R. & Machado, K. M. G. 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In:* Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador. 13: 479-500.

Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16 (5): 415-421.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2001. New basidiomycetes on bioremediation of organochlorine contaminated soil. *In*: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. San Diego, Battelle Press, 3v, pp. 99-106.

Matheus, D.R. & Bononi, V.L.R. 2002. C/N ratio and vegetable oil to mineralize ^{14}C-hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In:* Gavaskar, A.R.; Chen, A.S.C. (Eds). Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of The Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus, 2002, p. 2b-10, ISBN 1-57477-132-9.

Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R. & Rodrigues, T.A. 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. Proceedings do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.

Moreira-Neto, Matheus, D.R, Machado, K.M.G. 2009. Influence of pH on the growth, lacasse activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. Brazilian Archives of Biology and Technology 52 (2): 1075-1082.

Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.

Moreno, C. M., Becerra, A. G. & Santos, M. J. B. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micologia 21: 103-120.

Nakagawa, L. E., & Andréa, M. M. 2006. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Revista Brasileira de Ciência do Solo 30: 575-582.

Novotný, C., Erbanova, P., Cajthaml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C. & Sasek, V. 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 850-853.

Okada, W.S. 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 112p.

Okeke, B.C., Smith, J.E., Paterson, A. & Watson-Craik, I.A. 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiol Biotechnology 45: 263-266.

Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R. 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 889–893.

Pannu, J.K.; Singh, A.; Ward, O.P. 2003. Influence of peanut oil on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Canadian Journal of Microbiology 49: 508-513.

Pizzul, L.; Castillo, Md. P. & Stenstrom, J. 2006. Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spike soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 745–752.

Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., Soriano, A. U., Santos, R. L. C. & Sobral, L. G. S. 2006. Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorreatores. *In:* Série Tecnologia Ambiental STA-37. Rio de Janeiro, 59p.

Robles-Hernández, L., Franco, A. C. G., Donald L. Crawford, D. L. & Chun, W. W. C. 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms - Revisión de degradación de contaminantes ambientales por basidiomicetos de la pudrición Blanca. Tecno Ciência Chihuahua 2 (1): 32-40.

Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F. & Munch, J. C. 1997. Initiation of [^{36}Cl] hexachlorobenzene dechlorination in three different soils under artificially induced anaerobic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 48: 115-120.

Salvi, M.B. 2008. Degradação química e biológica de ^{14}C-Hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.

Sandermann Jr., H., Heller, W., Hertkorn, N., Hoque, E., Pieper, D. & Winkler, R. 1998. A new intermediated in the mineralization of 3,4-dichloroaniline by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium.* Applied and Environmental Microbiology 64: 3305-3312.

Scherr, K. E.; Hasinger, M.; Mayer, P. & Loibner, A. P. 2009. Effect of vegetable oil addition on bioaccessibility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in historically contaminated soils. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84 (6): 857-835.

Scherr, K.; Hasinger, M.; Castaldini, F. & Loibner, A. P. 2008. Polycyclic acromatic hydrocarbon degradation: increasing bioavailability by addition of canola oil. In: 4th European Bioremediation Conference.

Schuur, B. J. H. & Mattiasson, B. 2003. Separation of coal-tar constituents from soilparticles in a two-liquid-phase slurry system. Environmental Technology 24: 755–765.

Silva, R.R. 2009. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em reatores. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 186p.

Silva, R.R., Corso, C.R. & Matheus, D.R. 2009. Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella.* World Journal Microbiology and Biotechnology

Srinivasan, U. & Glaser, J.A. 1999. The validity of ergosterol-based fungal biomass estimate in biorremediation, *In*: Alleman, B.C., Leeson, A., Bioreactor and Ex Situ biological Treatment Technologies.San Diego, California: Battelle Press, p.103-109.

Tekere, M., Mswaka, A. Y., Zvauya, R. & Read, J. S. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. Enzyme and Microbial Technology 28: 420–426.

Toledo, H. H. B. 2002. Hexaclorobenzeno. *In:* Poluentes Orgânicos Persistentes. Fernícola, N. A. G. G.; Oliveira, S. S.– Salvador : CRA, v.13, cap.10, pág.385-416, 2002 (Série Caderno de Referência Ambiental).

Ullah, M. A., Bedford, C. T. & Evans, C. S. 2000b. Reactions of pentachlorophenol with lacase from *Coriolus versicolor*. Applied Microbiology and Biotechnology 53: 230-234.

Ullah, M. A., Kadhim, H., Rasatal, R. A. & Evans, C. S. 2000a. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 832-837.

Valentín, L., Lu-Chau, T. A., Lopez, C., Feijoo, G., Moreira, M. T. & Lema, J. M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the whyte-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Process Biochemistry 42: 641-648.

Vieira, S. & Hoffmann, R. Estatística Experimental. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

Vitali, V. M. V. 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.

Walter, M., Boul, L., Chong, R. & Ford, C. 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. Journal of Environmental Management 71: 361–369.

Wu, F., Ozaki, H., Yutaka, T., Imada, T. & Ohkouchi, Y. 1996. Activities of ligninolytic enzymes of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* and its recalcitrant substance degradability. Water Sience and Technology 34 (7-8): 68-78.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi parte integrante do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do potencial de aplicação de fungos em processos de biorremediação de solos contaminados por resíduos organoclorados" que teve como objetivo selecionar e avaliar fungos nativos do Brasil com potencial para a biorremediação de solos contaminados na Baixada Santista, Estado de São Paulo. O projeto fez parte de um convênio assinado entre o Instituto de Botânica - IBt da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo e a Rhodia do Brasil Ltda, através da Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG.

Vários estudos com enfoque na utilização de fungos basidiomicetos foram conduzidos no Laboratório de Micologia Aplicada – IBt, visando a sua utilização para a descontaminação do solo. No referido projeto institucional, Machado *et al.* (2005a) selecionaram 32 linhagens de um total de 125 estudadas para aplicação em estudos de biodegradação de PCF em solo, dentre as 32 linhagens apenas 6 foram capazes de crescer em solo com 4600 mg PCF kg^{-1} solo. No mesmo estudo Machado *et al.* (2005a) também observou que *Peniophora cinerea* CCIBt 2541, *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 e *Trametes villosa* CCIBt 2513 foram capazes de degradar até 80% do PCF presente no solo.

Matheus *et al.* (2000) observaram redução de até 25% de HCB durante crescimento de *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 e *Lentinus* crinitus CCIBt 2611 em solo contendo 1.327 mg de HCB kg^{-1}, sem qualquer suplementação, com taxas de mineralização inferiores a 1%. No entanto, a otimização das condições de cultivo, com a adição de ácidos graxos insaturados no solo e a variação da relação C/N no inóculo de *P. castanella* e *L. crinitus* aumentou as taxas de mineralização para mais de 20% (Matheus & Bononi 2002; Matheus 2003). Segundo Ballaminut (2007) *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 foi capaz de degradar 100% de pentaclorofenol em solo contaminado com 100 mg PCF Kg^{-1} em apenas 5 dias de incubação. Moreira-Neto (2006) observou degradação de 32,4% de HCB em solo com 2000 mg Kg^{-1}

após 70 dias de incubação de *P. castanella* em microcosmos. Vitali (2004) também observou a redução de 42,82% HCB e 60% PeCB por *P. castanella* e *Eupenicillium baarnense* em solo com cerca de 3770 mg kg^{-1} de solo. Em estudo realizado por Salvi (2008) *Trametes villosa* CCIBt 2513 também foi capaz de mineralizar 12% de tetraclorodietozibenzeno em solo (4200 mg TCDB g^{-1}solo), produto originado da oxidação química do HCB, sendo mais tóxico que o HCB.

Entretanto, em tentativa de aumento de escala do tratamento de solo contaminado com HCB em biorreatores de 400 Kg de capacidade, Silva (2009) não observou degradação de HCB e PeCB ao final de 224 dias de incubação de *L. crinitus*, *P. castanella* e *T. villosa*, verificando que os fungos não foram capazes de reproduzir o mesmo desempenho observado por Matheus (2003) em escala laboratorial com cerca de 68 % de degradação HCB kg^{-1} em solo (32.960 mg HCB kg^{-1} solo) e cerca de 25% de mineralização de ^{14}C-HCB por *P. castanella*, já que não foi observada alteração das quantidades iniciais de HCB no solo tratado (cerca de 25.000 mg HCB kg^{-1} solo).

Foram então analisados alguns fatores que pudessem estar exercendo influência sobre a não degradação de HCB pelos fungos. Dentre os fatores analisados em diversos estudos de fisiologia de fungos de podridão branca, a produção de um inóculo fúngico que garantisse viabilidade fúngica foi um dos fatores enfatizados. Isto se deve ao fato de que fragmentos miceliais e esporos são mais sensíveis ao processo inibitório de crescimento proporcionado por fenóis como, por exemplo, PCF, do que micélio imobilizado, o que acaba prejudicando o desempenho do fungo em solos contaminados com tais compostos. Foi então que Okada (2012) estudou a otimização da produção de inóculo fúngico de *P. castanella* para biorremediação de solo contaminado e constatou que a utilização de farinha de soja e fécula de mandioca misturados ao bagaço de cana na proporção de 20% e 30% foram os melhores agregantes para produção de pellets com dimensões aproximadas de 3,0 x 4,5cm com taxa de degradação de 75% de PCF em solo (200 mg PCF kg^{-1} solo).

Contudo, Silva (2009) sugeriu ainda que apesar de a oxigenação do solo nos biorreatores ser necessária para o desenvolvimento dos fungos e para as reações de oxidação dos compostos organoclorados, ela pode ser comprometida pela formação de caminhos preferenciais do fluxo de ar através do solo, originando setores com menor oxigenação. Com isso fez-se necessária a realização de novas pesquisas com objetivo de avaliar o efeito da aeração pressurizada nos biorreatores, o qual foi o principal objeto de estudo do presente trabalho.

Para a realização dos experimentos foram construídos biorreatores com capacidade de 10 Kg de solo em polipropileno, bem como foram importadas sondas detectoras de oxigênio e adquiridos um compressor para injeção de ar e um regulador de pressão para manter a pressão constante (aproximadamente 2 bar). E com os resultados obtidos verificou-se que a hipótese sugerida por Silva (2009) foi confirmada, pois com a injeção de ar pressurizado nos biorreatores foram registradas taxas de degradação de até 43,7% de HCB e 37,3% de PeCB.

Na literatura poucos são os trabalhos de biodegradação de compostos organoclorados em solo com concentrações tão elevadas desses compostos e que utilizam a técnica de aeração sob pressão, a maioria utiliza apenas a injeção de ar para oxigenação do meio. Jiang *et. al.* (2006) em estudo de biodegradação de pentaclorofenol em solo (100 mg kg^{-1} solo) em biorreator com aeração, obtiveram quase 100% de degradação ao final de 60 dias de incubação. Valentin *et al.* (2007) observaram degradação de 50% de PHAs em solo com 50 mg Kg^{-1} de solo pelo fungo *Bjerkandera adusta*. Fulekar *et al* (2012) registraram diminuição de 98,5% de cádmio, 99,6 de cobre e 100% de ferro em solo com 100 mg kg^{-1} de metal em solo utilizando a microbiota autóctone em reator aerado sem pressão.

Com os resultados apresentados, mais uma vez observa-se, portanto que, a aeração dos reatores sob pressão promoveu uma situação bastante melhorada para a degradação de HCB e PeCB, se comparado aquelas observadas por Silva (2009) trabalhando sem a pressurização do ar.

Embora os resultados deste trabalho tenham registrado taxas de degradação muito significativas para estes compostos organoclorados em solo acondicionados em biorreatores com uma quantidade de solo acima das estudas em diversos trabalhos, faz-se necessário novos estudos com objetivo de aumento da taxa de degradação e aumento de escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, A. & Ferraz, A. 2011. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. Química Nova 34 (10): 1729-1738.

Alef, K. & Nannipieri, P. 1995. Methods in Applied soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, 1ª Ed., 576p.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, 2ª ed, San Diego, USA, 453p.

Andrade, J. A., Augusto, F. & Jardim, I. C. S. F. 2010. Biorremediação de solos contaminados com petróleo e seus derivados. Eclética Química 35 (3): 17-43.

Andrea, M. M, Papini, S. & Nakagawa, L. E. 2001. Otimizing microwave-assited solvent extraction of pesticides from soil. Journal of Environmental Science and Health 36 (1): 87-93.

Arora, D. S. & Sharna, R. K. 2010. ligninolytic fungal lacasses and theirmbiotechnological applications. Applied Biochemistry Biotechnology 160: 1760-1788.

Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. Biodegradation 19: 771-783.

Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G. & Odier, E. 1998. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete crysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. Applied Microbiology and Biotechnology 27: 393-398.

Atlas, R. M. 1993. Management of the environment through biotechnology. World Journal Microbiology and Biotechnology 9: 493-494.

Bailey, R.E. 2001. Global hexachlorobenzene emissions. Chemosphere 43: 167–182.

Baipai, R.; Kim, J. & Qasin, M. 2003. Bioremediation. *In:* D. R. Heldman, C. I. Morau (Eds.), Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering, Marcel Dekker, New York, p.

108–118.

Bais, N., Bouzaza, A., Guernion, P. Y. & Laplanche, A. 2008. Elimination of persistent organic pollutants (POPs) by adsorption at high temperature: The case of fluoranthene and hexachlorobenzene. Chemical Engineering and Processing 47 (3): 316-322.

Bakshi, D. K., Gupta, K. G. & Sharma, P. 1999. Enchanced biodecolorization of synthetic textile dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium* under improved culture conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 507-509.

Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews 30: 215-242.

Ballaminut, N. 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163p.

Ballaminut, N., & Matheus, D. R. 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. Brazilian Journal of Microbiology 38: 248-252.

Banat, I. M., Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appiedl Microbiology and Biotechnology 53: 495–508.

Banerji, S. K., Zappi, M. E., Teeter, C. L., Gunniso, D., Cullinane, M. J. & Morgan, R. T. 1995 bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbon using bioslurry reactors. U.S. Corps of Engineers, Washington, 61p.

Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Yinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. Journal of Microbiological Methods 50: 227-236.

Barber, J. L., Sweetman, A. J., Wijk, D. V. & Jones, K. C. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. Science of the Total

Environment 349: 1-44.

Barr, D. P. & Aust, S. D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade polluants. Environmental Scince and Technology 28 (2): 78-87.

Bôer, C. G., Obici, L., Souza, C. G. M. & Peralta, R. M. 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. Bioresource Technology. 94: 107–112.

Bogan, B. W. & Lamar, R. T. 1999. Surfactant enhancement of white-rot fungal PAH soil remediation. *In:* A. Leeson, B.C. Alleman (Eds.). Bioremediation Technologies for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compounds, Battelle Press, Columbus.

Boopathy, R. 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology 74: 63-67.

Bourbonnais, R. & Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267: 99-102.

Boyle, C. D. 1995. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. Canadian Journal of Microbiology 41 (4-5): 345-353.

Breivik, K., Alcock, R., Li, Y., Bailey, R. E., Fiedler, H. & Pacyna, J. M. 2004. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. Environmental Pollution 128: .3-16.

Brown, M.A., Zhao, Z. & Mauk, A.G. 2002. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. Inorganica Chimica Acta. 331: 232-238.

Bumpus, J.A. & Aust, S.D. 1987. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood-rotting fungus. *In*: Exner, J.H. (Ed.). Solvent Hazardous waste problems: learning from dioxins. Washington DC: American Chemistry Society 340-349.

Camacho-Pérez, B., Ríos-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N. & Poggi-Valderato, H. M. 2012. Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review. Journal of

Environmental Management 95: 306-318.

Chiou, C. T. 1985. Partition coefficients of organic compounds in lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. Environmental Science and Technology 19: 57–62.

Chovancová, J., Conka, K., Fabisiková, A., Sejáková, Z. S., Dömötörová, M., Drobná, B. & Wimmerová, S. 2012. PCDD/PCDF, dl-PCB and PBDE serum levels of Slovak general population. Chemosphere 88: 1383-1389.

Compart, L. C. A., Machado, K. M. G., Matheus, D. R. & Cardoso, A. V. 2007. Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23 (10): 1479-1483.

Côrrea, C. M. D. 2005. Efeito de óleo de soja na persistência de Endosulfan no ambiente. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 85p.

D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quaratino, D., Mincione, E. & Petrucciol, M. 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. Biotechnology and Bioengineering 90 (6): 723-731.

Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues: Opportunities & Perspectives. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology 5: 578-595.

Davis, M. W. & Lamar, R. T. 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. Soil Biology & Biochemistry 24 (3): 189-198.

Deconica pages. 2010. *Psilocybe castanella* Peck, Bull. N. Y. State Museum 1: 7. 1887. Disponível: http://www.entoloma.nl/html/pscastanella.html (acesso em Agosto de 2010).

Deul, L. E. & Hollyday, G. H. 1997. Soil remediation for the petroleum extraction industry. Pen Well, 2ª ed, Tulsa, USA, 242p.

Deveci, T., Unyayar, A. & Mazmanci, M. A. 2004. Production of Remazol Brilliant Blue R

decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30: 25–32.

Déziel, E., Paquette, G., Vellemur, R., Lepins, F. & Bisaillnon, J. G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on PAH´s. Applied and Environmental Microbiology 62 (3): 1908-1912.

Doelman, P. & Breedvelk, G. 1999. *In situ* versus *on site* practices. *In:* Adriano, D.C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils. Madison: ASA/CSSA/SSSA 539-558.

Dupont, R. R., Bruell, C. J., Marley, M. C., Downey, D. C., Norris, R. D., Hulling, S. G. & Pivets, B. 1998. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.

Eash, N. S., Stahl, P. D., Parkin, T. B. & Karlen, D. L. 1996. A simplifieild method for extraction of ergosterol from soil. Soil Science Society of America Journal 60: 468-471.

Eerd, L. L. V., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. & Hall, J. C. 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. Weed Science 51: 472–495.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K. E. L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus:* purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology 62 (4): 1151-1158.

Ezendam, J., Staedtler, F., Pennings, J., Vandebriel, R. J., Pieters, R., Harleman, J. H. & Vos, J. G. 2004. Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in brown norway rats. Environmental Health Perspectives 112 (7): 782-791.

Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. Journal of Molecular and Catalysis B: Enzymatic 16: 231-240.

Fernícola, N. A. G. G. & Oliveira, S. S. 2002. Produtos orgânicos persistentes: POPs. Série Caderno de Referência Ambiental v.13. Salvador, 500 p.

Field, J. A. & Sierra-Alvarez, R. 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. Biodegradation 19: 463-480.

Freire, R. S., Pelegrini, R., Kubota, L. T. & e Durán, N. 2000**.** Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. Química Nova 23 (4): 504-511.

Fulekar, M. H., Sharma, J. S. & Tendulkar. 2012. Bioremediation of heavy metal using biostimulation in laboratory bioreactor. Environmental Monitoring Assessment 187: 7299-7307.

Gallaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. & Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. Enzyme and Microbial Technology. 30: 529-536.

Germain, E. & Stephenson, T. 2005. Biomass characteristics, aeration and oxygen transfer in membrane bioreactors: Their interrelations explained by a review of aerobic biological processes. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 4: 223–233.

Germann, U. A., Muller, G., Hunziker, P. E. & Lerch, K. 1988. Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Journal of Biological Chemistry 263: 885-898.

Gessner, M. O. & Schmitt, A. L. 1996. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. Applied and Environmental Microbiology 62 (2): 415-419.

Gevao, B., Semple, K. T. & Jones, K. C. 2000. Bound pesticide resdues: a review. Environmental Pollution 108: 3-14.

Gindilis, A., Zhazhina, E., Baranov, Yu., Karyakin, A., Gavrilova, V. & Yaropolov, A. 1988. Isolation and properties of laccase from the basidial fungus *Coriolus hirsutus* from quel. Biokhimiya 53: 735–739.

Goerk, H., Weber, K., Bornemann, H., Ramdohr, S. & Plötz, J. 2004. Increasing levels and biomagnification of persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic biota. Marine Pollution

Bulletin 48: 295–302.

Gold, M. H. & Alic, M. 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiological Reviews. 57: 605-622.

Gong, Z.; Alef, K.; Wilke, B.M.; Li, P. 2005 Dissolution and removal of PAHs from a contaminated soil using sunflower oil. Chemosphere 58: 291–298.

Gong, Z.; Wilke, B.M.; Alef, K.; Li, P; Zhou, Q. 2006. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from manufactured gas plant-contaminated soils using sunflower oil: laboratory column experiments. Chemosphere 62: 780–787.

Gonzales, L., Hernández, J. R., Perestelo, F., Carnicero, A. & Falcón, M. A. 2002. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. Enzyme and Microbial Technology. 30: 474-481.

Gowthaman, M. K., Krishna, C. & Moo-Young, M. 2001. Fungal solid state fermentation – an overview. Khachatourians, G. G. & Arora, D. K. (eds.). Agriculture and Food Production. Applied Mycology and Biotechnology 1: 305-352.

Graham, D. W., Smith, V. H., Cleland, D. L. & Law, K. P. 1999. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. Water, Air, and Soil Pollution 111: 1–18.

Guerzoni, S., Rossini, P., Sarretta, A., Raccanelli, S., Ferrari, G. & Molinaroli, E. 2007. POPs in the Lagoon of Venice: budgets and pathways. Chemosphere 67: 1776-1785.

Gugliotta, A.M. 2001. Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 115p.

Gutiérrez, A. 1995. Exopolissacarídios y metabolitos aromáticos de *Pleurotus:* Naturaleza y función en la degradation de la lignina. Ph. D. Thesis - Universidad de Sevilla, Sevilla.

Guzzella, L. Roscioli, C., Viganò, L. Saha, M., Sarkar, .K. & Bhattacharya, A. 2005. Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. Environment International 31: 523-534.

Häggblom, M. M. & Valo, R. J. 1995. Bioremediaton of chlorophenol wastes. *In:* Young, L. Y. & Cerninglia, C. E. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. 389-434.

Häggblom, M. M. 1992. Microbiol breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. FEMS Microbiology Review 103: 29-72.

Harms, H., Schosser, D. & Wick, L. Y. 2011. Untapped potencial: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Applied and Industrial Microbiology 9: 177-192.

Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews 13: 125-135.

Heerenklage, H., K., Woyczehowski, H., Bollow, S. & Stegmann, R. 1998. Influence of oxygen on the degradation of Diesel Fuel in Soil Bioreactors. Acta Biotechnology 2: 109-122.

Higuchi, T. 2004. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Proceeding of the Japan Academy Series B 80: 204-214.

Hirano, T., Ishida, T., Oh, K. & Sudo, R. 2007. Biodegradation of chlordane and hexachlorobenzene in river sediment. Chemosphere 67: 428-434.

Höfer, C. & Schlosser, D. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. FEBS Letters. 451: 186-190.

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

Holroyd, M. L. & Caunt, P. 1995. Large-Scale Soil Bioremediantion Using White-Rot Fungi. *In*: Bioaumentation for Site Remediation. Hinchee, R., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (eds.). Columbus: Battelle Press 181-187.

Hwang, E. Y., Park, J. S., Kim, J. D. & Namkoong, W. 2006. Effects of aeration mode on the composting of diesel contaminated soil. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 12 (5): 694-701.

Iqbal, J. Metosh-Dickey, C. & Portier, R. J. 2007. Temperature effects on bioremediation of PAHs and PCP contaminated South Louisiana soils: a laboratory mesocosm study. Journal of Soils and Sediments 7 (3): 153 – 158.

Itoh, K., Fujita, M., Kumano, K., Suyama, K., Yamamoto, H. 2000. Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. Soil Biology & Biochemistry 32: 85-91.

Jacques, R. J. S., Bento, F. M., Antoniolli, Z. I. & Camargo, F. A. O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural 37 (4): 1192-1201.

Jarosz-Wilkoazka, A. & Graz, M. 2006. Organic acids production by white rot basidiomycetes in the presence of metallic oxides. Canadian Journal Microbiology 52: 779-785.

Jiang, X., Zeng, G., Huang, D., Chen, Y., Liu, F., Huang, G., Li, J., Xi, B. & Liu, H. 2006. Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized *Phanerochaete chrysosporium.* World Journal of Microbiology & Biotechnology 22: 909–913.

Joergensen, R. G. 2000. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. Soil Biology and Biochemistry 32: 647-652.

Johannes, C., Majcherczyk, A. & Huttermann, A. 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. Applied Microbiology and Biotechnology. 46: 313-317.

Johanson, T. Elinder, K. G. & Nymar, P. O. 1993. Isozymes of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. Archives of Biochemistry and Biophysis 300: 57-62.

Jonsson, C. M. 2005. Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum:* extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 117 p.

Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S. & Rastall, R. A. 1999. Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. Enzyme and Microbial Technology 24: 303-307.

Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. & Hatakka, A. 1999. Coupling of manganese peroxidasemediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ^{14}C-labeled lignins. Biochemical and Biophysical Research Communications 259: 212-219.

Kersten, P. J.; Tien, M.; Kalyanaraman, B. & Kirk, T. K. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. Journal of Biological Chemistry. 260: 2609-2612.

Kiehl, E. J. 1985. Fertilizantes orgânicos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. 492p.

Kirk, T. K. & Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology 41: 465-505.

Kirk, T. K. & Shimada, M. 1985. Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. *In:* Higuchi, T. (Ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press 21: 579-605.

Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F. & Zeikus, J. G. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology. 117: 277-285.

Kirk, T.K. 1993. Lignin degradation: basic research progress, and applications in soil remediation and biopulping. *In:* Cellulosics: Pulp, fibre and environmental aspects. Kennedy, J.F.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. (eds.). New York: Ellis Horword 63: 421-430.

Kleinschmitt, A. R. 2003. Dessorção do herbicida atrazina e atividade microbiana em duas classes de solos do Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 78p.

Koroljova (Skorobogat'ko), O. V, Stepanova, E. V., Gavrilova, V. P., Morozova O. V., Lubimova, N. V., Dzchafarova, A. N., Jaropolov, A. I. & Makower, A. 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. Biotechnology and Applied Biochemistry 28: 47-57

Krishna. C. 2005. Solid-state fermentation systems - an overview. Critical Reviews in Biotechnology 25: 1–30.

Kulikova, N. A., Klein, O. I., Stepanova, E. V. & Koroleva, O. V. 2011. Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies: Fundamental and Applied Aspects (Review). Applied Biochemistry and Microbiology 47: 619-634.

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. & Gold, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters 169: 247-250.

Lamar, R. T. & Scholze, R. J. 1992. White-rot fungi biodegradation of PCP-treated ammunition boxes. *In:* Proccedings of R&D 92 National research & development conference on the control of hazardous materials, San Francisco – California p. 89-94.

Lamar, R. T. & White, R. B. 2001. Micoremediation – commercial status and recent developments. *In*: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. San Diego, Battelle Press 3: 263-278.

Leisinger, T. 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. Experientia 39: 1183-1191.

Leonardi, V.; Giubilei, M. A.; Federici, E.; Spaccapelo, R.; Sasek, V.; Novothny, C.; Petruccioli, M. & D'Annibale, A. 2008. Mobilizing agents enhance fungal degradation of polycyclic

hydrocarbons and affect diversity of indigenous bacteria in soil. Biotechnology and Bioengineering 101: 273–285.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtás-Wasilewska, M., Cho, N. & Hofrichter, M. 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology 27:175-185.

Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Golovleva, L. A., Sedarati, M. & Evans, C. S. 2002. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentration of chlorophenols. Applied Microbiology and Biotechnology 59: 599-604.

Lerch, K., Deinum, J. & Reinhammer, B. 1978. The state of copper in *Neurospora* laccase. Biochimica et Biophysica Acta 534:7-14.

Leštan, D., Cernilec, M., Strancar, A. & Perdih, A. 1993. Influence of some surfactants and related compounds ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters 106: 17-22.

Leštan, D., Strancar, A. & Perdih, A. 1990. Influence some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 34: 426-428.

Levin, L., Villalba, L., Da Re, V., Forchiassin, F. & Papinutti, L. 2007. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping process. Process Biochemistry 42: 995-1002.

Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W. & Springael, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. Applied Microbiology and Biotechnology 66: 726–736.

Litchfield, C. 2005. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime. BioScience 55 (3): 273-

279.

Liu, J., Li, D. B. & Yang, J. C. 2007. Operating characteristics of solid-state fermentation bioreactor with air pressure pulsation. Applied Biochemistry and Microbiology 43 (2): 211–216.

Lobos, S., Larraín, J., Salas, L., Cullen, D. & Vicuna, R. 1994. Isozymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Microbiology. 140: 1691-1698.

Lodolo, A., Gonzalez-Valencia, E. & Miertus, S. 2001. Overview of remediation technologies for persistent toxic substances. Arh Hig Rada Toksiko 52: 253-280.

Loganathan, B. G., Sajwan, K. S., Richardson, J. P., Chetty, C. S. & Owen, D. A. 2001. Persistent organochlorine concentrations in sediment and fish from Atlantic Coastal and Brackish water of Sanannah, Georgia, USA. Marine Pllution Bulletin 42 (3): 246-250.

Machado, K. M. G. & Matheus, D. R. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 37: 468-473.

Machado, K. M. G., Compart, L. C. A., Morais, R. O., Rosa, L. H. & Santos, M. H. 2006. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. Brazilian Journal of Microbiology 37: 481-487.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R. 2005a. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 297-301.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R. 2005b. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. Brazilian. Journal of Microbiology 36: 246-252.

Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Rodrigues, T. A. & Bononi, V. L. R. 2006. Enhancement of

growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. Brazilian Journal of Microbiology 37: 425-427

Machado, K.M.G. 1998. Biodegradação de pentaclofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solo contaminado com resíduos industriais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p.

Martin, J.P. 1950. Use of rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Science 69: 215-232.

Matheus, D. R. & Machado, K. M. G. 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In:* Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador. 13: 479-500.

Matheus, D. R. & Okino, L. K. 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In:* Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.

Matheus, D. R. 1998. Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16 (5): 415-421.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2001. New basidiomycetes on

bioremediation of organochlorine contaminated soil. *In*: Glenn, V. S. M., Ong, J. S. K. & Leeson, A. (eds.). Bioremediation of Energetics, Phenolics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. San Diego, Battelle Press, 3v, pp. 99-106.

Matheus, D.R. & Bononi, V.L.R. 2002. C/N ratio and vegetable oil to mineralize ^{14}C-hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In:* Gavaskar, A.R.; Chen, A.S.C. (Eds). Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Proceedings of The Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus, 2002, p. 2b-10, ISBN 1-57477-132-9.

Matheus, D.R., Bononi, V.L.R., Machado, K.M.G., Silva, R.R., Rodrigues, T.A. 2003. Basidiomycetes growth in bioreactors to applied in HCB soil biorremediation. Proceedings do simpósio The Seventh International Symposium In Situ and On-Site Biorremediation, Battelle Press, Orlando, Paper G5.

McErlean, C., Marchant, R. & Banat, I. M. 2006. An evaluation of soil colonisation potential of selected fungi and their production of ligninolytic enzymes for use in soil bioremediation applications. Antonie van Leeuwenhoek 90:147–158.

Mohammadi, A. & Nasernejad,B. 2009. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. Journal of Hazardous Materials 161: 534-537.

Moore-Landecher, 1996. Fundamentals of the Fungi. 14ª ed. Brasil: Prence-Hall. Cap 9, p. 251-78.

Moorman, T. B. 1994. Pesticide degradation by microorganisms: environmental, ecological and management effects. *In*: Hatfield, J. L. & Stewart, B. A. (eds.). Soil biology: effects on soil quality. Boca Raton: Lewis Publisher, 121-163.

Moreira-Neto, Matheus, D.R, Machado, K.M.G. 2009. Influence of pH on the growth, lacasse activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. Brazilian Archives of Biology and

Technology 52 (2): 1075-1082.

Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.

Moreno, C. M., Becerra, A. G. & Santos, M. J. B. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micologia 21: 103-120.

Nakagawa, L. E. & Andréa, M. M. 2005. Volatilização e lixiviação de ^{14}C-hexaclorobenzeno em solo contaminado. Arquivos do Instituto Biológico 72 (2): 255-260.

Nakagawa, L. E., Luchini, L. C., Musumececi, M. R. & Andrea, M. M. 1995. Comportamento de atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. Pesquisa Agropecuária Brasileira 30 (4): 471-476.

Nakagawa, L.E., & Andréa, M.M. 2006. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Revista Brasileira de Ciência do Solo 30: 575-582.

Novotný, C., Erbanova, P., Cajthaml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C. & Sasek, V. 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 850-853.

Novotný, C., Erbanová, P., Šašek1, V., Kubátová, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J. & Zadražil, F. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. Biodegradation 10: 159-168.

Novotný, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. & Sasek, V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. Soil Biology and Biochemistry 36: 1545–1551.

Odendahl, S. 1994 Environmental-protection and consumer demands - a review of trends and impacts.

Pulp & Paper Canada 95: 30–34.

Okada, W.S. 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 112p.

Okeke, B.C., Paterson, A., Smith, J.E., Watson-Craik, I.A. 1997. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. Applied Microbiol Biotechnology 48: 563-569.

Okeke, B.C., Smith, J.E., Paterson, A. & Watson-Craik, I.A. 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiol Biotechnology 45: 263-266.

Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R. 2000 Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 889–893.

Olivieri, E. C. & Cooper, K. R. 1997. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorobenzeno-*p*-dioxin (TCDD) in embryon and larval of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Chemosphere 34: 1139-1150.

Palmieri, G., Cennamo, G. & Sannia, G. 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus. ostreatus* and its oxidative enzymatic system. Enzyme and Microbial Technology 36: 17–24.

Pannu, J.K.; Singh, A.; Ward, O.P. 2003. Influence of peanut oil on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Canadian Journal of Microbiology 49: 508-513.

Pierzynski, G. M., Sims, J. T. & Vance, G.F. 1994. Soil and Environmental Quality. Lewis Publishes, 313p.

Pizzul, L.; Castillo, Md. P. & Stenstrom, J. 2006. Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spike soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 745–752.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 20–33.

Pointing, S. B., Pelling, A. L., Smith, G. J., Hyde, K. D. & Reddy, C. A. 2005. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and lacasse gene-specific sequences. Mycological Research 109: 115-124.

Pontin, J. A. & Massaro, S. 2001. Poluição Química. Editora Brasiliense, 3ª Edição, São Paulo SP.

Provident, M. A., Lee, H. & Trevors, J. T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. Journal of Industrial Microbiology 12: 379-395.

Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V. & Vasilchenco, L. G. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. Applied Biochemistry and Microbiology 40 (1): 1-17.

Reddy, G. V. B & Gold, M. H. 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. Microbiology 146: 405–413.

Reddy, G. V. B., Gelpke, M. D. S. & Gold, M. H. 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. Journal of Bacteriology 180 (19): 5159–5164.

Rhykerd, R. L., Crews, B., Mclnnes, K. J. & Weaver, R. W. 1999. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. Bioresource Technology 67: 279-285.

Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., Soriano, A. U., Santos, R. L. C. & Sobral, L. G. S. 2006. Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorreatores. *In:* Série Tecnologia Ambiental STA-37. Rio de Janeiro, 59p.

Robles-Hernández, L., Franco, A.C.G., Donald L. Crawford, D.L., Chun, W.W.C. 2008. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms - Revisión

de degradación de contaminantes ambientales por basidiomicetos de la pudrición Blanca. TecnoCiência Chihuahua 2 (1): 32-40.

Rocha, W. B. D. 2003. Sorção de 2,4-D e diuron nos agregados organominerais de latossolos em função dos conteúdos de matéria orgânica e água. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 75p.

Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F. & Munch, J. C. 1997. Initiation of [^{36}Cl] hexachlorobenzene dechlorination in three different soils under artificially induced anaerobic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 48: 115-120.

Ruiz-Duenas, F. J. & Martinez, A. T. 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. Microbial Biotechnology 2: 164–177.

Salvi, M. B. 2008. Degradação química e biológica de ^{14}C-Hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 150p.

Sandermann Jr., H., Heller, W., Hertkorn, N., Hoque, E., Pieper, D. & Winkler, R. 1998. A new intermediated in the mineralization of 3,4-dichloroaniline by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium.* Applied and Environmental Microbiology 64: 3305-3312.

Saparrat, M., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martinez, A.T. & Martinez, M.J. 2002. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology. 68 (4): 1534-1540.

Schecter, A. & Oslon, R. 1997. Cancer risk assessment using blood dioxin levels and daily dietary TEQ intake in general populations of industrial and non-industrial countries. Chemosphere 34: 1569-1577.

Scherr, K. E.; Hasinger, M.; Mayer, P. & Loibner, A. P. 2009. Effect of vegetable oil addition on

bioaccessibility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in historically contaminated soils. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84 (6): 857-835.

Scherr, K.; Hasinger, M.; Castaldini, F. & Loibner, A. P. 2008. Polycyclic acromatic hydrocarbon degradation: increasing bioavailability by addition of canola oil. In: 4th European Bioremediation Conference.

Schlosser, D. & Höfer, C. 2002. Laccase-Catalyzed Oxidation of Mn^{2+} in the Presence of Natural Mn^{3+} Chelators as a Novel Source of Extracellular H_2O_2 Production and Its Impact on Manganese Peroxidase. Applied and Environmental Microbiology. 68 (7): 3514-3521.

Schuur, B.J.H. & Mattiasson, B. 2003. Separation of coal-tar constituents from soilparticles in a two-liquid-phase slurry system. Environmental Technology 24: 755–765.

Semple, K. T., Reid, B. J. & Fermor, T. R. 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution 112: 269-283.

Shannon, M. J. R. & Uterman, R. 1993. Evaluating Bioremediation: Distinguishing Fact from Fiction. Annual Review Microbiology. 47: 715-738.

Shelton, D. R. & Parkin, T. B. 1991. Effect of soil moisture on sorption and biodegradation of carbofuran in soil. Journal of Agriculture and Food Chemistry 39: 2963-2068.

Sheu, W. J. & Liou, N. C. 1999. Effect of temporal variation of pressure on vaporization of liquid droplets. International Journal of Heat and Mass Transfer 42: 4043-4054.

Shim, S. S. & Kawamoto, K. 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. Water Research 36: 4445–4454.

Silva, C. M. M. S.& & Fay, E. F. 1997. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. *In*: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (eds.). Microbiologia Ambiental, Jaguariúna, Embrapa – CNPMA, 440 p.

Silva, R.R. 2009. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos

basidiomicetos em reatores. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo. 186p.

Silva, R.R., Corso, C.R. & Matheus, D.R. 2009. Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella.* World Journal Microbiology and Biotechnology 26: 841-846.

Singh, A., Van Hamme, J. D. & Ward, O. P. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnology Advances 25: 99-121.

Soares, G. M. B., Costa Ferreira, M. & Amorim, P. 2001. Decolorization of na anthraquinonetype dye using a laccase formulation. Bioresource Technology 79: 171-177.

Srinivasan, U. & Glaser, J.A. 1999. The validity of ergosterol-based fungal biomass estimate in biorremediation, *In*: Alleman, B.C., Leeson, A., Bioreactor and Ex Situ biological Treatment Technologies.San Diego, California: Battelle Press, p.103-109.

Stone, R. 1994. Enviromental estrogens stir debate. Science 265: 308-310.

Stotzky, G. 1972. Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. CRC Critical Reviews in Microbiology 2: 59-137.

Stringer, R. & Johnston, P. 2002. Chlorine and the Environmental: An overview of the chlorine industry. Kluwer Academic Publishers, 2ª ed, Netherlands, 437p.

Sutherland, T. D., Horne, I., Weir, K. M., Coppin, C. W., Williams, M. R., Selleck, M., Russell, R. J. & Oakeshott, J. G. 2004. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31: 817–821.

Tekere, M., Mswaka, A. Y., Zvauya, R. & Read, J. S. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. Enzyme and Microbial Technology 28: 420–426.

Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19–26.

Tien, M. & Kirk, T. K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium:*

purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2-requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Science 81: 2280-2284.

Tien, M. & Kirk, T. K. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology 161: 238-249.

Toledo, H. H. B. 2002. Hexaclorobenzeno. *In:* Poluentes Orgânicos Persistentes. Fernícola, N. A. G. G.; Oliveira, S. S.– Salvador : CRA, v.13, cap.10, pág.385-416, 2002 (Série Caderno de Referência Ambiental).

Tortella, G. R., Diez, M. C. & Durán, N. 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. Critical Reviews in Microbiology 31: 197–212.

Troquet, J., Larroche, C. & Dussap, C-G. 2003. Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13: 103–112.

Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F. & Viale, A. 2003. Optimization of a culture medium for ligninolyttic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30: 682-690.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72: 169-183.

Ullah, M. A., Bedford, C. T. & Evans, C. S. 2000b. Reactions of pentachlorophenol with lacase from *Coriolus versicolor*. Applied Microbiology and Biotechnology 53: 230-234.

Ullah, M. A., Kadhim, H., Rastall, R. A. & Evans, C. S. 2000a. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor,* for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. Applied Microbiology and Biotechnology 54:832-837.

Valentín, L., Lu-Chau, T. A., Lopez, C., Feijoo, G., Moreira, M. T. & Lema, J. M. 2007. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by

the whyte-rot fungus *Bjerkandera* sp BOS55. Process Biochemistry 42: 641-648.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemestry 73:1163-1172.

Vieira. S. & Hoffmann, R. Estatística Experimental. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

Vitali, V. M. V. 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.

Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andrea, M. M. & Bononi, V. L. R. 2006. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. Brazilian Journal of Microbiology 37: 256- 261.

Walter, M., Boul, L., Chong, R. & Ford, C. 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. Journal of Environmental Management 71: 361–369.

Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y. & Kuwahara, M. 2000. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. European Journal of Biochemistry. 267: 4222-4231.

Wong, D.W.S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Applied Biochemistry and biotechnology 157: 174-209.

Woo, S. H. & Park, J. M. 1999. Evaluation of drum bioreactor performance used for descontamination of soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 74: 937-944.

Wu, F., Ozaki, H., Yutaka, T., Imada, T. & Ohkouchi, Y. 1996. Activities of ligninolytic enzymes of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* and its recalcitrant substance degradability. Water Sience and Technology 34 (7-8): 68-78.

Yamanaka, R., Soares, C. F., Matheus, D. R. & Machado, K. M. G. 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. World Journal of

Microbiology 39: 78-84.

Yap, C. L., Gan, S. & Ng, H. K. 2010. Application of vegetable oils in thr treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials 177: 28-41.

Youn, H. D., Kim, K. J., Maeng, J. S., Han, Y. H., Jeong, I. B., Jeong, G., Kang, S. O. & Hah, Y.C. 1995. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus.* Archives of Microbiology 141: 393-398.

Yuan, S., Shu, Z., Wan, J. & Lu, X. 2007. Enhanced desorption of hexachlorobenzene from kaolin by single and mixed surfactants. Journal of Colloid and Interface Science 314 (1): 167-175.

Yuan, S., Tian, M. & Lu, X. 2006. Electrokinetic movement of hexachlorobenzene in clayed soils enhanced by Tween 80 and β-cyclodextrin. Journal of Hazardous Materials 137 (2): 1218-1225.

Zang, S., Li, P., Li, W., Zhang, D. & Hamilton, A. 2007. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. Chemosphere 67: 1368-1374.

Zemanek, M. G., Pollard, S. J. T., Kenefick, S. L. & Hrudey, S. E. 1997. Multi-phase partitioning and co-solvent effects for polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) in authentic petroleum- and creosote-contaminated soils. Environmental Pollution 98: 239–252.

Zhang, J., Zheng, Z., Luan, J., Yang, G., Song, W., Zhong, Y. & Xie, Z. 2007. Degradation of hexachlorobenzene by electron beam irradiation. Journal of Hazardous Materials 142: 431–436.

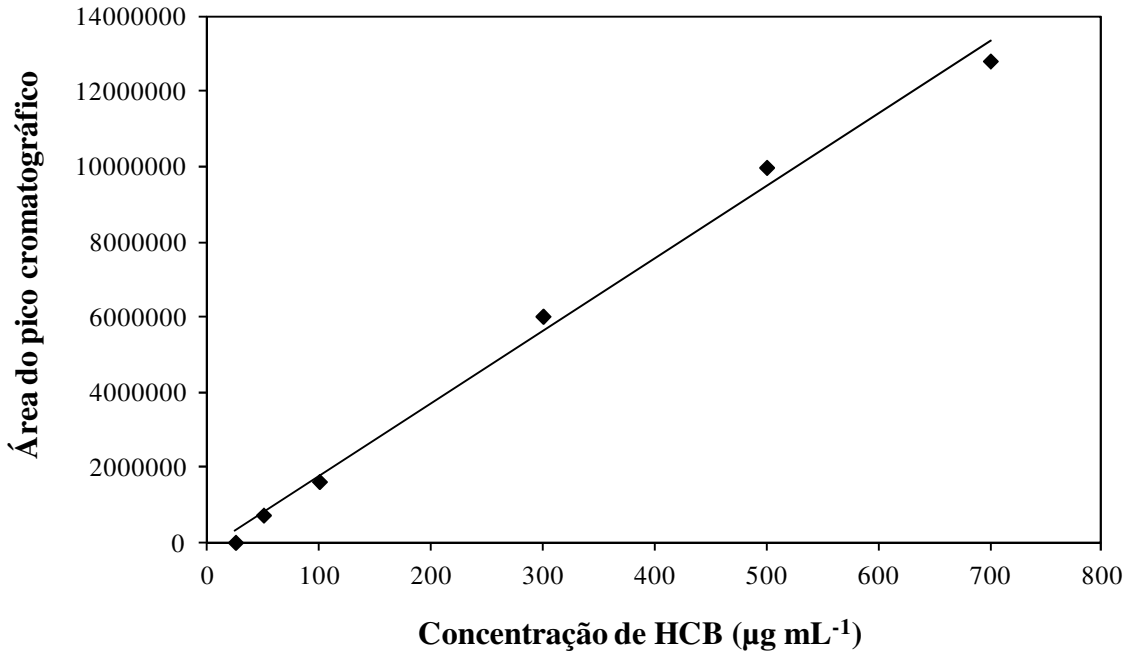
Zhang, Y., Maier, W. J. & Miller, R.M. 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, biovailability and biodegradation of phenanthrene. Environmental Science and Technology 31: 2211-2217.

Zitko, V. 2003. Hexachlorobenzene. *In* Handbook of Environmental Chemistry 3 (Cap10) 91-122.

ANEXO 1

Curva padrão de concentrações conhecidas de hexaclorobenzeno (HCB), utilizada para quantificação do hexaclorobenzeno (HCB) recuperado nos extratos do solo.

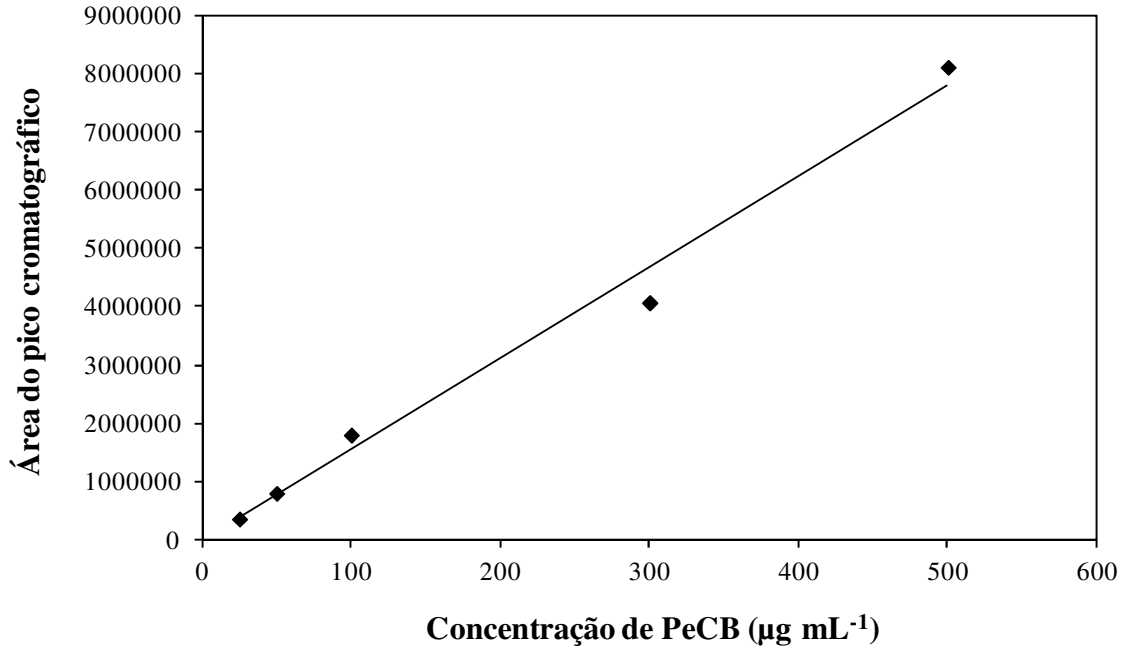
Equação da reta y = 19320x + 182554, $r^2 = 0,9943$.



ANEXO 2

Curva padrão de concentrações conhecidas de pentaclorobenzeno (PeCB), utilizada para quantificação do pentaclorobenzeno (PeCB) recuperado nos extratos do solo.

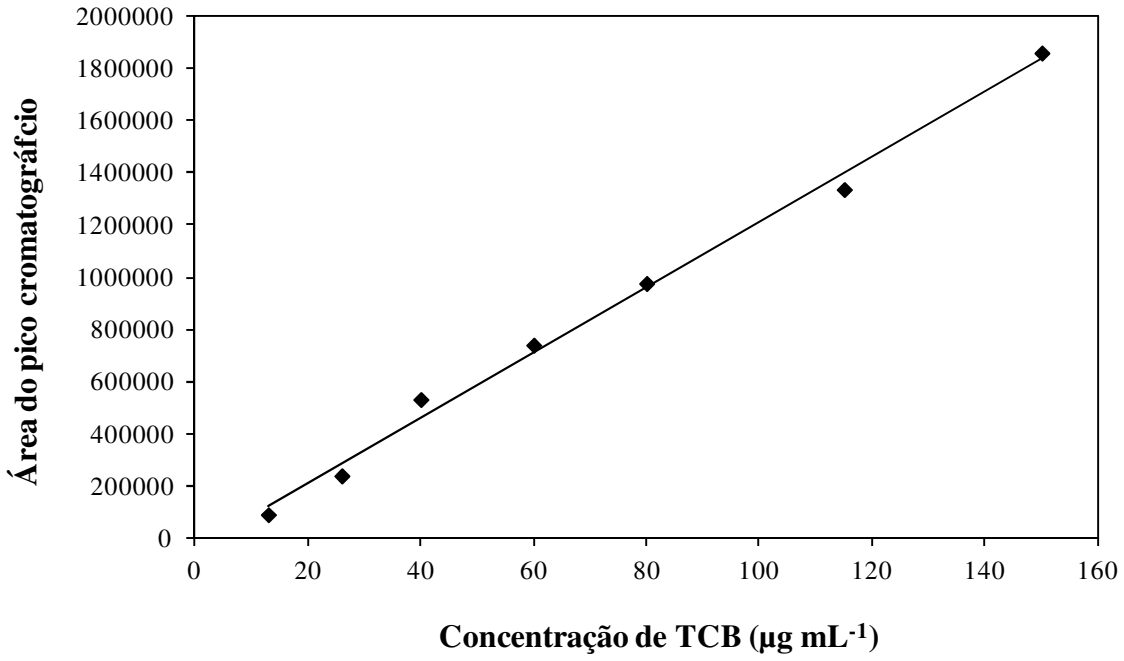
Equação da reta y = 15659x – 21494, $r^2 = 0,987$.



ANEXO 3

Curva padrão de concentrações conhecidas de tetraclorobenzeno (TCB), utilizada para quantificação do tetraclorobenzeno (TCB) recuperado nos extratos do solo.

Equação da reta $y = 12529x - 40038$, $r^2 = 0,9941$

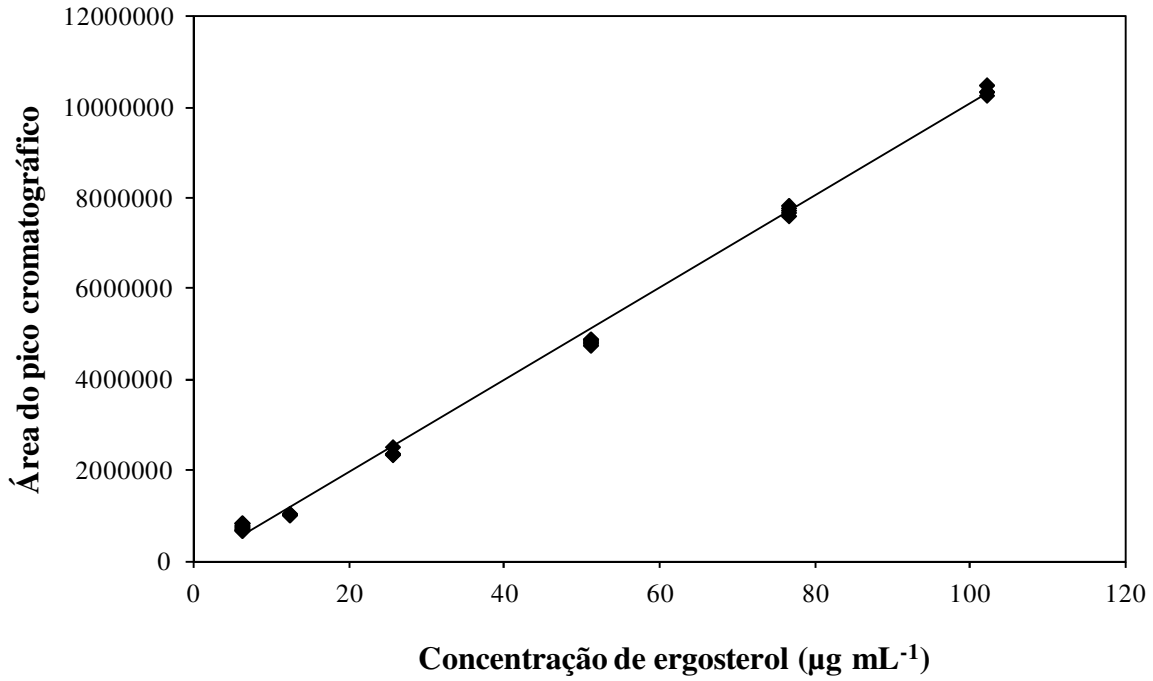


.

ANEXO 4

Curva padrão de concentrações conhecidas de ergosterol, utilizada para quantificação do ergosterol recuperado nos extratos do solo.

Equação da reta y = 101435x - 73488, $r^2 = 0,9974$.



ANEXO 5

Análise de variância da quantidade de ergosterol (µg g^{-1}) produzido por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreatores com ar pressurizado e revolvimento do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: µg ergosterol g^{-1} massa seca *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ERGOSTEROL, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	1152767162	1152767162	288191790	65,44	0,000**
Tratamento	1	439745798	439745798	439745798	99,86	0,000**
Tempo*Tratamento	4	1224061762	1224061762	306015441	69,49	0,000**
Error	20	88076185	88076185	4403809		
Total	29	2904650907				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	1409,0	1713	0,9972
	T 7 reator com pressão	929,2	1713	0,9999
	T 7 reator revolvido	463,4	1713	1,0000
	T 14 reator com pressão	1209,1	1713	0,9991
	T 14 reator revolvido	425,3	1713	1,0000
	T 28 reator com pressão	228,9	1713	0,0868
	T 28 reator revolvido	-78,9	1713	1,0000
	T 56 reator com pressão	33004,5	1713	0,0000
	T 56 reator revolvido	5590,9	1713	1,0000
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	-480	1713	1,0000
	T 7 reator pressão	-946	1713	0,9993
	T 14 reator revolvido	-200	1713	1,0000
	T 14 reator pressão	-1180	1713	0,9998
	T 28 reator revolvido	4182	1713	0,3542
	T 28 reator pressão	-1488	1713	0,9959
	T 56 reator revolvido	31596	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	-984	1713	0,9999
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-466	1713	1,0000

Continuação	T 14 reator revolvido	280	1713	1,0000
	T 14 reator pressão	-700	1713	1,0000
	T 28 reator revolvido	4662	1713	0,2301
	T 28 reator pressão	-1008	1713	0,9998
	T 56 reator revolvido	32075	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	-504	1713	1,0000
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	745,7	1713	1,0000
	T 14 reator pressão	-38,1	1713	1,0000
	T 28 reator revolvido	5127,5	1713	1,0000
	T 28 reator pressão	-542,3	1713	1,0000
	T 56 reator revolvido	0,1439	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	-234,5	1713	0,1439
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-784	1713	1,0000
	T 28 reator revolvido	4382	1713	0,9998
	T 28 reator pressão	-1288	1713	0,9986
	T 56 reator revolvido	-980	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	31795	1713	0,2981
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	5165,6	1713	0,1382
	T 28 reator pressão	-196,4	1713	1,0000
	T 56 reator revolvido	32579,2	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	-504,2	1713	1,0000
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	-5670	1713	0,0794
	T 56 reator revolvido	27414	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	-5362	1713	0,1119
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	33083,4	1713	0,0000
	T 56 reator pressão	307,8	1713	1,0000
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	-32776	1713	0,0000

ANEXO 6

Análise de variância da atividade de oxidação total do ABTS (UL^{-1}) produzida por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreator com ar pressurizado e revolvimento do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Atividade de oxidação total do ABTS (UL^{-1}) *versus* Tempo de incubação (Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA FENOLOXIDASE, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	79724,8	79724,8	19931,2	50,43	0,000**
Tratamento	1	470,3	470,3	470,3	1,19	0,288
Tempo*Tratamento	4	5364,9	5364,9	1341,2	3,39	0,028*
Erro	20	7904,4	7904,4	395,2		
Total	29	93464,3				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	39,3	16,23	0,3639
	T 7 reator com pressão	143,10	16,23	0,0000**
	T 7 reator revolvido	106,13	16,23	0,0001**
	T 14 reator com pressão	20,04	16,23	0,9572
	T 14 reator revolvido	-0,62	16,23	1,0000
	T 28 reator com pressão	8,21	16,23	0,9999
	T 28 reator revolvido	-15,18	16,23	0,9930
	T 56 reator com pressão	-23,93	16,23	0,8871
	T 56 reator revolvido	-21,81	16,23	0,9306
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	66,82	16,23	0,0001**
	T 7 reator pressão	-19,26	16,23	0,0150**
	T 14 reator revolvido	-39,92	16,23	0,9662
	T 14 reator pressão	-31,10	16,23	0,3447
	T 28 reator revolvido	-54,48	16,23	0,6597
	T 28 reator pressão	-63,24	16,23	0,0723
	T 56 reator revolvido	-61,12	16,23	0,0240
	T 56 reator pressão	-37,0	16,23	0,0315
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-123,1	16,23	0,0320
	T 14 reator revolvido	-143,7	16,23	0,0000**

Continuação	T 14 reator pressão	-134,9	16,23	0,0000**
	T 28 reator revolvido	-158,3	16,23	0,0000**
	T 28 reator pressão	-167,0	16,23	0,0000**
	T 56 reator revolvido	-164,9	16,23	0,0000**
	T 56 reator pressão	-86,1	16,23	0,0000**
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	-106,7	16,23	0,0011**
	T 14 reator pressão	-97,9	16,23	0,0001**
	T 28 reator revolvido	-121,3	16,23	0,0000**
	T 28 reator pressão	-130,1	16,23	0,0003**
	T 56 reator revolvido	-127,9	16,23	0,0000**
	T 56 reator pressão	-20,66	16,23	0,0000**
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-11,84	16,23	0,9489
	T 28 reator revolvido	-35,22	16,23	0,9989
	T 28 reator pressão	-43,97	16,23	0,5051
	T 56 reator revolvido	-41,86	16,23	0,2345
	T 56 reator pressão	8,82	16,23	0,2885
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	-14,56	16,23	0,9999
	T 28 reator pressão	-23,31	16,23	0,9948
	T 56 reator revolvido	-21,20	16,23	0,9011
	T 56 reator pressão	-23,38	16,23	0,9408
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	-30,02	16,23	0,8996
	T 56 reator revolvido	-32,14	16,23	0,6208
	T 56 reator pressão	-8,753	16,23	0,6994
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	2,117	16,23	1,000
	T 56 reator pressão	-6,637	16,23	1,000
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	39,3	16,23	0,9999

ANEXO 7

Análise de variância da atividade de lacase (UL^{-1}) produzida por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreator com ar pressurizado e revolvimento do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Atividade de lacase (UL^{-1}) *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	49450,0	49450,0	12362,5	54,55	0,000**
Tratamento	1	12,5	12,5	12,5	0,06	0,817
Tempo*Tratamento	4	4898,3	4898,3	1224,6	5,40	0,004**
Erro	20	4532,6	4532,6	226,6		
Total	29	58893,4				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	45,19	12,29	0,0380*
	T 7 reator com pressão	109,66	12,29	0,0000**
	T 7 reator revolvido	78,88	12,29	0,0001**
	T 14 reator com pressão	10,79	12,29	1,0000
	T 14 reator revolvido	0,87	12,29	0,9955
	T 28 reator com pressão	-1,04	12,29	1,0000
	T 28 reator revolvido	-14,45	12,29	0,9681
	T 56 reator com pressão	-23,17	12,29	0,6783
	T 56 reator revolvido	-20,69	12,29	0,7923
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	64,47	12,29	0,0013**
	T 7 reator pressão	33,69	12,29	0,2225
	T 14 reator revolvido	-34,39	12,29	0,2022
	T 14 reator pressão	-44,32	12,29	0,0439*
	T 28 reator revolvido	-46,23	12,29	0,0318
	T 28 reator pressão	-59,64	12,29	0,0030**
	T 56 reator revolvido	-68,36	12,29	0,0007**
	T 56 reator pressão	-65,87	12,29	0,0010**
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-30,8	12,29	0,0000**

	T 14 reator revolvido	-98,9	12,29	0,0000**
Continuação	T 14 reator pressão	-108,8	12,29	0,0000**
	T 28 reator revolvido	-110,7	12,29	0,0000**
	T 28 reator pressão	-124,1	12,29	0,0000**
	T 56 reator revolvido	-132,8	12,29	0,0000**
	T 56 reator pressão	-130,3	12,29	0,0007**
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	-68,1	12,29	0,0001**
	T 14 reator pressão	-78,0	12,29	0,0001**
	T 28 reator revolvido	-79,9	12,29	0,0000**
	T 28 reator pressão	-93,3	12,29	0,0000**
	T 56 reator revolvido	-102,0	12,29	0,0000**
	T 56 reator pressão	-99,6	12,29	0,9976
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-9,93	12,29	0,9914
	T 28 reator revolvido	-11,83	12,29	0,5754
	T 28 reator pressão	-25,25	12,29	0,2145
	T 56 reator revolvido	-33,96	12,29	0,2964
	T 56 reator pressão	-31,48	12,29	1,0000
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	-1,91	12,29	0,9547
	T 28 reator pressão	-15,32	12,29	0,6356
	T 56 reator revolvido	-24,04	12,29	0,7544
	T 56 reator pressão	-21,55	12,29	0,9801
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	-13,41	12,29	0,7279
	T 56 reator revolvido	-22,13	12,29	0,8342
	T 56 reator pressão	-19,65	12,29	0,9991
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	2,483	12,29	0,9999
	T 56 reator pressão	-6,233	12,29	1,0000
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	-8,717	12,29	0,0380*

ANEXO 8

Análise de variância da atividade de peroxidase (U L^{-1}) produzida por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo acondicionado em biorreator com ar pressurizado e revolvimento do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Atividade de peroxidase (U L^{-1}) *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASE, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	3672,88	3672,88	918,22	13,46	0,000**
Tratamento	1	174,53	174,53	174,53	2,56	0,125
Tempo*Tratamento	4	164,97	164,97	41,24	0,60	0,664
Erro	20	1364,15	1364,15	68,21		
Total	29	5376,54				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	1,367	6,743	1,0000
	T 7 reator com pressão	30,690	6,743	0,0059**
	T 7 reator revolvido	24,487	6,743	0,0416*
	T 14 reator com pressão	6,663	6,743	0,9897
	T 14 reator revolvido	-3,157	6,743	1,0000
	T 28 reator com pressão	7,707	6,743	0,9733
	T 28 reator revolvido	-1,757	6,743	1,0000
	T 56 reator com pressão	-3,523	6,743	0,9999
	T 56 reator revolvido	-3,523	6,743	0,9999
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	29,323	6,743	0,0091**
	T 7 reator pressão	23,120	6,743	0,0627
	T 14 reator revolvido	5,297	6,743	0,9980
	T 14 reator pressão	-4,523	6,743	0,9994
	T 28 reator revolvido	6,340	6,743	0,9927
	T 28 reator pressão	-3,123	6,743	1,0000
	T 56 reator revolvido	-4,890	6,743	0,9989
	T 56 reator pressão	-4,890	6,743	0,9989
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-6,20	6,743	0,9938
	T 14 reator revolvido	-24,03	6,743	0,0478*
Continuação	T 14 reator pressão	-33,85	6,743	0,0021**
	T 28 reator revolvido	-22,98	6,743	0,0653

	T 28 reator pressão	-32,45	6,743	0,0033**
	T 56 reator revolvido	-34,21	6,743	0,0019**
	T 56 reator pressão	-34,21	6,743	0,0019**
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	-17,82	6,743	0,2608
	T 14 reator pressão	-27,64	6,743	0,0156**
	T 28 reator revolvido	-16,78	6,743	0,3305
	T 28 reator pressão	-26,24	6,743	0,0242**
	T 56 reator revolvido	-28,01	6,743	0,0138**
	T 56 reator pressão	-28,01	6,743	0,0138**
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-9,82	6,743	0,8939
	T 28 reator revolvido	1,04	6,743	1,0000
	T 28 reator pressão	-8,42	6,743	0,9542
	T 56 reator revolvido	-10,19	6,743	0,8728
	T 56 reator pressão	-10,19	6,743	0,8728
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	10,8633	6,743	0,8282
	T 28 reator pressão	1,4000	6,743	1,0000
	T 56 reator revolvido	-0,3667	6,743	1,0000
	T 56 reator pressão	-0,3667	6,743	1,0000
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	-9,46	6,743	0,9123
	T 56 reator revolvido	-11,23	6,743	0,8014
	T 56 reator pressão	-11,23	6,743	0,8014
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	-1,767	6,743	1,000
	T 56 reator pressão	-1,767	6,743	1,000
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	-0,0000	6,743	1,000

ANEXO 9

Análise de variância do pH do solo contaminado acondicionado em biorreatores com *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 com ar pressurizado e revolvimento semanal do solo do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: pH do solo *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA pH DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	0,085333	0,085333	0,021333	21,33	0,000**
Tratamento	1	0,000333	0,000333	0,000333	0,33	0,570
Tempo*Tratamento	4	0,128000	0,128000	0,032000	32,00	0,000**
Erro	20	0,020000	0,020000	0,001000		
Total	29	0,233667				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	-0,0000	0,02582	1,0000
	T 7 reator com pressão	0,1000	0,02582	0,0252*
	T 7 reator revolvido	-0,1000	0,02582	0,0252*
	T 14 reator com pressão	-0,0333	0,02582	0,9445
	T 14 reator revolvido	-0,0667	0,02582	0,2870
	T 28 reator com pressão	-0,1667	0,02582	0,0001**
	T 28 reator revolvido	-0,1000	0,02582	0,0252*
	T 56 reator com pressão	-0,2000	0,02582	0,0000**
	T 56 reator revolvido	-0,0000	0,02582	1,0000
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	0,1000	0,02582	0,0252*
	T 7 reator pressão	-0,1000	0,02582	0,0252*
	T 14 reator revolvido	-0,0333	0,02582	0,9445
	T 14 reator pressão	-0,0667	0,02582	0,2870
	T 28 reator revolvido	-0,1667	0,02582	0,0001**
	T 28 reator pressão	-0,1000	0,02582	0,0252
	T 56 reator revolvido	-0,2000	0,02582	0,0000**
	T 56 reator pressão	-0,0000	0,02582	1,0000
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-0,2000	0,02582	0,0000**
	T 14 reator revolvido	-0,1333	0,02582	0,0015**
Continuação	T 14 reator pressão	-0,1667	0,02582	0,0001**
	T 28 reator revolvido	-0,2667	0,02582	0,0000**

	T 28 reator pressão	-0,3000	0,02582	0,0000**
	T 56 reator revolvido	-0,2000	0,02582	0,0000**
	T 56 reator pressão	-0,1000	0,02582	0,0252*
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	0,0667	0,02582	0,2870
	T 14 reator pressão	0,0333	0,02582	0,9445
	T 28 reator revolvido	-0,0667	0,02582	0,2870
	T 28 reator pressão	0,0000	0,02582	1,0000
	T 56 reator revolvido	-0,1000	0,02582	0,0252*
	T 56 reator pressão	0,1000	0,02582	0,0252*
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-0,0333	0,02582	0,9445
	T 28 reator revolvido	-0,1333	0,02582	0,0015**
	T 28 reator pressão	-0,0667	0,02582	0,2870
	T 56 reator revolvido	-0,1667	0,02582	0,0001**
	T 56 reator pressão	0,0333	0,02582	0,9445
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	-0,1000	0,02582	0,0252
	T 28 reator pressão	-0,0333	0,02582	0,9445
	T 56 reator revolvido	-0,1333	0,02582	0,0015**
	T 56 reator pressão	0,0667	0,02582	0,2870
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	0,06667	0,02582	0,2870
	T 56 reator revolvido	-0,03333	0,02582	0,9445
	T 56 reator pressão	0,16667	0,02582	0,0001**
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	-0,1000	0,02582	0,0252*
	T 56 reator pressão	0,1000	0,02582	0,0252*
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	0,2000	0,02582	0,0000**

ANEXO 10

Análise de variância da concentração de HCB ao final de 56 dias de incubação de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, acondicionado em biorreator com ar pressurizado e revolvimento semanal do solo.

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Concentração de HCB do solo *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA HCB DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	40486164	40486164	10121541	5,92	0,003**
Tratamento	1	2694306	2694306	2694306	1,58	0,224
Tempo*Tratamento	4	22298053	22298053	5574513	3,26	0,033*
Erro	20	34185639	34185639	1709282		
Total	29	99664163				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	1343,7	1067	0,9521
	T 7 reator com pressão	4100,0	1067	0,0269**
	T 7 reator revolvido	1873,1	1067	0,7537
	T 14 reator com pressão	3598,0	1067	0,0704
	T 14 reator revolvido	3298,1	1067	0,1205
	T 28 reator com pressão	1606,6	1067	0,8750
	T 28 reator revolvido	-764,5	1067	0,2094
	T 56 reator com pressão	2964,8	1067	0,9990
	T 56 reator revolvido	2057,3	1067	0,6528
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	2756	1067	0,2870
	T 7 reator pressão	529	1067	1,0000
	T 14 reator revolvido	2254	1067	0,5401
	T 14 reator pressão	1954	1067	0,7103
	T 28 reator revolvido	263	1067	1,0000
	T 28 reator pressão	1621	1067	0,8695
	T 56 reator revolvido	-2108	1067	0,6238
	T 56 reator pressão	714	1067	0,9994
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-2227	1067	0,5557

	T 14 reator revolvido	-502	1067	1,0000
Continuação	T 14 reator pressão	-802	1067	0,9986
	T 28 reator revolvido	-2493	1067	0,4096
	T 28 reator pressão	-1135	1067	0,0058*
	T 56 reator revolvido	-4864	1067	0,9832
	T 56 reator pressão	-2043	1067	0,6611
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	1725	1067	0,8259
	T 14 reator pressão	1425	1067	0,9331
	T 28 reator revolvido	-266	1067	1,0000
	T 28 reator pressão	1092	1067	0,9870
	T 56 reator revolvido	-2638	1067	0,3391
	T 56 reator pressão	184	1067	1,0000
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-300	1067	1,0000
	T 28 reator revolvido	-1991	1067	0,6899
	T 28 reator pressão	-633	1067	0,9998
	T 56 reator revolvido	-4362	1067	0,0160**
	T 56 reator pressão	-1541	1067	0,8986
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	-1692	1067	0,8406
	T 28 reator pressão	-333	1067	1,0000
	T 56 reator revolvido	-4063	1067	0,0290**
	T 56 reator pressão	-1241	1067	0,9703
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	1358	1067	0,9490
	T 56 reator revolvido	-2371	1067	0,4747
	T 56 reator pressão	451	1067	1,0000
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	-3729	1067	0,0551
	T 56 reator pressão	-907	1067	0,9965
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	2822	1067	0,2607

ANEXO 11

Análise de variância da concentração de PeCB ao final de 56 dias de incubação de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, acondicionado em biorreator com ar pressurizado e revolvimento semanal do solo.

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Concentração de PeCB do solo *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PeCB DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	549943	549943	137486	5,64	0,003**
Tratamento	1	178193	178193	178193	7,31	0,014**
Tempo*Tratamento	4	266190	266190	66548	2,73	0,058*
Erro	20	487783	487783	24389		
Total	29	1482108				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	231,5	127,5	0,7190
	T 7 reator com pressão	433,0	127,5	0,0670
	T 7 reator revolvido	322,0	127,5	0,3129
	T 14 reator com pressão	334,7	127,5	0,2685
	T 14 reator revolvido	330,4	127,5	0,2829
	T 28 reator com pressão	166,5	127,5	0,9408
	T 28 reator revolvido	403,8	127,5	0,1044
	T 56 reator com pressão	-186,8	127,5	0,8906
	T 56 reator revolvido	230,4	127,5	0,7244
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	201,4	127,5	0,8429
	T 7 reator pressão	90,5	127,5	0,9991
	T 14 reator revolvido	103,2	127,5	0,9976
	T 14 reator pressão	98,9	127,5	0,9982
	T 28 reator revolvido	-65,0	127,5	0,9999
	T 28 reator pressão	172,2	127,5	0,9286
	T 56 reator revolvido	-418,4	127,5	0,0838
	T 56 reator pressão	-1,2	127,5	1,0000
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	-111,0	127,5	0,9958

	T 14 reator revolvido	-98,3	127,5	0,9983
Continuação	T 14 reator pressão	-102,5	127,5	0,9977
	T 28 reator revolvido	-266,4	127,5	0,5537
	T 28 reator pressão	-29,2	127,5	1,0000
	T 56 reator revolvido	-619,8	127,5	0,0030**
	T 56 reator pressão	-202,6	127,5	0,8386
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	12,7	127,5	1,0000
	T 14 reator pressão	8,4	127,5	1,0000
	T 28 reator revolvido	-155,5	127,5	0,9603
	T 28 reator pressão	81,8	127,5	0,9996
	T 56 reator revolvido	-508,8	127,5	0,0196**
	T 56 reator pressão	-91,6	127,5	0,9990
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	-4,3	127,5	1,0000
	T 28 reator revolvido	-168,2	127,5	0,9374
	T 28 reator pressão	69,1	127,5	0,9999
	T 56 reator revolvido	-521,5	127,5	0,0159**
	T 56 reator pressão	-104,3	127,5	0,9973
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	-163,9	127,5	0,9459
	T 28 reator pressão	73,3	127,5	0,9998
	T 56 reator revolvido	-517,2	127,5	0,0171**
	T 56 reator pressão	-100,1	127,5	0,9981
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	237,2	127,5	0,6930
	T 56 reator revolvido	-353,4	127,5	0,2116
	T 56 reator pressão	63,8	127,5	0,9999
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	-590,6	127,5	0,0049*
	T 56 reator pressão	417,2	127,5	0,9259
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	-173,4	127,5	0,0853

ANEXO 12

Análise de variância da concentração de TCB ao final de 56 dias de incubação de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, acondicionado em biorreator com ar pressurizado e revolvimento semanal do solo.

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Concentração de TCB do solo *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TCB DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	1857,1	1857,1	464,3	1,31	0,302
Tratamento	1	8574,9	8574,9	8574,9	24,11	0,000***
Tempo*Tratamento	4	4234,8	4234,8	1058,7	2,98	0,044**
Erro	20	7113,1	7113,1	355,7		
Total	29	21779,9				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (COM REVOLVIMENTO DE SOLO E AERAÇÃO)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator com pressão	T 0 reator revolvido	25,38	15,40	0,8100
	T 7 reator com pressão	16,89	15,40	0,9794
	T 7 reator revolvido	23,66	15,40	0,8618
	T 14 reator com pressão	-4,45	15,40	1,0000
	T 14 reator revolvido	10,40	15,40	0,9994
	T 28 reator com pressão	-7,53	15,40	1,0000
	T 28 reator revolvido	44,00	15,40	0,1826
	T 56 reator com pressão	-34,45	15,40	0,4653
	T 56 reator revolvido	36,07	15,40	0,4058
T0 Reator revolvido	T 7 reator revolvido	-8,50	15,40	0,9999
	T 7 reator pressão	-1,72	15,40	1,0000
	T 14 reator revolvido	-29,83	15,40	0,6466
	T 14 reator pressão	-14,99	15,40	0,9907
	T 28 reator revolvido	-32,91	15,40	0,5246
	T 28 reator pressão	18,62	15,40	0,9622
	T 56 reator revolvido	-59,83	15,40	0,0245**
	T 56 reator pressão	10,69	15,40	0,9992
T 7 Reator com pressão	T 7 reator pressão	6,78	15,40	1,0000

	T 14 reator revolvido	-21,34	15,40	0,9180
Continuação	T 14 reator pressão	-6,49	15,40	1,0000
	T 28 reator revolvido	-24,41	15,40	0,8402
	T 28 reator pressão	27,12	15,40	0,7502
	T 56 reator revolvido	-51,34	15,40	0,0756
	T 56 reator pressão	19,19	15,40	0,9548
T7 Reator revolvido	T 14 reator revolvido	-28,12	15,40	0,7131
	T 14 reator pressão	-13,27	15,40	0,9961
	T 28 reator revolvido	-31,19	15,40	0,5927
	T 28 reator pressão	20,34	15,40	0,9369
	T 56 reator revolvido	-58,11	15,40	0,0310**
	T 56 reator pressão	12,41	15,40	0,9976
T 14 Reator com pressão	T 14 reator pressão	14,85	15,40	0,9913
	T 28 reator revolvido	-3,08	15,40	1,0000
	T 28 reator pressão	48,46	15,40	0,1083
	T 56 reator revolvido	-30,00	15,40	0,6401
	T 56 reator pressão	40,53	15,40	0,2655
T14 Reator revolvido	T 28 reator revolvido	-17,92	15,40	0,9700
	T 28 reator pressão	33,61	15,40	0,4975
	T 56 reator revolvido	-44,85	15,40	0,1660
	T 56 reator pressão	25,68	15,40	0,8003
T 28 Reator com pressão	T 28 reator pressão	51,53	15,40	0,0737
	T 56 reator revolvido	-26,92	15,40	0,9999
	T 56 reator pressão	43,60	15,40	0,1910
T 28 Reator revolvido	T 56 reator revolvido	-78,45	15,40	0,0018**
	T 56 reator pressão	-7,93	15,40	0,7572
T 56 Reator com pressão	T 56 reator pressão	70,52	15,40	0,8100

ANEXO 13

Análise de variância da quantidade de ergosterol (µg g^{-1}) produzido por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreatores com ar pressurizado e: adição de diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: µg ergosterol g^{-1} massa seca *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ERGOSTEROL, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	402758433	402758433	100689608	79,33	0,000**
Tratamento	2	31601775	31601775	15800887	12,45	0,001**
Tempo*Tratamento	8	39690975	39690975	4961372	3,91	0,011**
Erro	15	19039504	19039504	1269300		
Total	29	493090686				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (5% óleo vegetal, 8% óleo vegetal e solo diluído 1:10)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator 5% Óleo	T 0 Reator 8% Óleo	315,7	1127	1,0000
	T 0 Reator Solo diluído	652,5	1127	1,0000
	T 7 Reator 5% Óleo	1635,6	1127	0,9665
	T 7 Reator 8% Óleo	1053,1	1127	0,9994
	T 7 Reator Solo diluído	1937,1	1127	0,8970
	T 14 Reator 5% Óleo	4753,1	1127	0,0337*
	T 14 Reator 8% Óleo	813,1	1127	1,0000
	T 14 Reator Solo diluido	1356,3	1127	0,9926
	T 28 Reator 5% Óleo	2695,1	1127	0,5507
	T 28 Reator 8% Óleo	1388,9	1127	0,9910
	T 28 Reator Solo diluído	2061,7	1127	0,8537
	T 56 Reator 5% Óleo	14449,8	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	7534,4	1127	0,0005**
	T 56 Reator Solo diluído	9680,9	1127	0,0001**
T 0 Reator 8% Óleo	T 0 Reator Solo diluído	336,8	1127	1,0000
	T 7 Reator 5% Óleo	1319,9	1127	0,9942

	T 7 Reator 8% Óleo	737,3	1127	1,0000
	T 7 Reator Solo diluído	1621,4	1127	0,9686
	T 14 Reator 5% Óleo	4437,3	1127	0,0552
	T 14 Reator 8% Óleo	497,4	1127	0,9994
	T 14 Reator Solo diluído	1040,6	1127	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	2379,4	1127	0,7121
	T 28 Reator 8% Óleo	1073,2	1127	0,9992
	T 28 Reator Solo diluído	1746,0	1127	0,9468
	T 56 Reator 5% Óleo	14134,1	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	7218,7	1127	0,0008**
	T 56 Reator Solo diluído	9365,2	1127	0,0001**
T 0 Reator Solo diluído	T 7 Reator 5% Óleo	983,1	1127	0,9997
	T 7 Reator 8% Óleo	400,6	1127	1,0000
	T 7 Reator Solo diluído	1284,6	1127	0,9955
	T 14 Reator 5% Óleo	400,6	1127	0,0922
	T 14 Reator 8% Óleo	1284,6	1127	1,0000
	T 14 Reator Solo diluído	703,8	1127	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	2042,6	1127	0,8608
	T 28 Reator 8% Óleo	736,4	1127	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	1409,2	1127	0,9898
	T 56 Reator 5% Óleo	13797,3	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	6881,9	1127	0,0012**
	T 56 Reator Solo diluído	9028,4	1127	0,0001**
T 7 Reator 5% Óleo	T 7 Reator 8% Óleo	-582,5	1127	1,0000
	T 7 Reator Solo diluído	301,5	1127	1,0000
	T 14 Reator 5% Óleo	3117,5	1127	0,3523
	T 14 Reator 8% Óleo	-822,5	1127	1,0000
	T 14 Reator Solo diluído	-279,2	1127	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	1059,5	1127	0,9993
	T 28 Reator 8% Óleo	-246,6	1127	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	426,2	1127	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	12814,2	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	5898,8	1127	0,0055**
	T 56 Reator Solo diluído	8045,3	1127	0,0003**
T 7 Reator 8% Óleo	T 7 Reator Solo diluído	884,1	1127	0,9999
	T 14 Reator 5% Óleo	3700,0	1127	0,1651
	T 14 Reator 8% Óleo	-239,9	1127	1,0000
	T 14 Reator Solo diluído	303,3	1127	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	1642,1	1127	0,9655
	T 28 Reator 8% Óleo	335,9	1127	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	1008,7	1127	0,9996
	T 56 Reator 5% Óleo	13396,8	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	6481,4	1127	0,0022**
	T 56 Reator Solo diluído	8627,8	1127	0,0001**
T 7 Reator Solo diluído	T 14 Reator 5% Óleo	2816	1127	0,4900
	T 14 Reator 8% Óleo	-1124	1127	0,9988
	T 14 Reator Solo diluído	-581	1127	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	758	1127	1,0000
	T 28 Reator 8% Óleo	-548	1127	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	125	1127	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	12513	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	5597	1127	0,0089**
	T 56 Reator Solo diluído	7744	1127	0,0004**
T 14 Reator 5% Óleo	T 14 Reator 8% Óleo	-3940	1127	0,1170
	T 14 Reator Solo diluído	-3397	1127	0,2491
	T 28 Reator 5% Óleo	-2058	1127	0,8551
	T 28 Reator 8% Óleo	-3364	1127	0,2598
	T 28 Reator Solo diluído	-2691	1127	0,5527
	T 56 Reator 5% Óleo	9697	1127	0,0001**
	T 56 Reator 8% Óleo	2781	1127	0,5071
	T 56 Reator Solo diluído	4928	1127	0,0256**
T 14 Reator 8% Óleo	T 14 Reator Solo diluído	543,2	1127	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	1882,0	1127	0,9134
	T 28 Reator 8% Óleo	575,8	1127	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	1248,6	1127	0,9965
	T 56 Reator 5% Óleo	13636,7	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	6721,3	1127	0,0016**
	T 56 Reator Solo diluído	8867,8	1127	0,0001**

T 14 Reator Solo diluído	T 28 Reator 5% Óleo	1338,8	1127	0,9935
	T 28 Reator 8% Óleo	32,6	1127	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	13093,5	1127	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	705,4	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	6178,1	1127	0,0036**
	T 56 Reator Solo diluído	8324,6	1127	0,0002**
T 28 Reator 5% Óleo	T 28 Reator 8% Óleo	-1306	1127	0,9948
	T 28 Reator Solo diluído	-633	1127	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	11755	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	4839	1127	0,0294**
	T 56 Reator Solo diluído	6986	1127	0,0011**
T 28 Reator 8% Óleo	T 28 Reator Solo diluído	672,8	1127	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	13060,9	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	6145,5	1127	0,0038**
	T 56 Reator Solo diluído	8291,9	1127	0,0002**
T 28 Reator Solo diluído	T 56 Reator 5% Óleo	12388	1127	0,0000**
	T 56 Reator 8% Óleo	5473	1127	0,0108**
	T 56 Reator Solo diluído	7619	1127	0,0004**
T 56 Reator 5% Óleo	T 56 Reator 8% Óleo	-6915	1127	0,0012**
	T 56 Reator Solo diluído	-4769	1127	0,0329**
T 56 Reator 8% Óleo	T 56 Reator Solo diluído	2146	1127	0,8197

ANEXO 14

Análise de variância da atividade de oxidação total do ABTS (UL^{-1}) produzida produzido por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreatores com ar pressurizado e: adição de diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Atividade de oxidação total do ABTS (UL^{-1}) *versus* Tempo de incubação (Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA FENOLOXIDASE, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	610804	610804	152701	3,43	0,035*
Tratamento	2	174848	174848	87424	1,96	0,175
Tempo*Tratamento	8	481919	481919	60240	1,35	0,293
Erro	15	668658	668658	44577		
Total	29	1936229				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÉVEIS DE TEMPO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Tempo 0	Tempo 7	-241,2	121,9	0,3219
	Tempo 14	-356,8	121,9	0,0673
	Tempo 28	-359,3	121,9	0,0648
	Tempo 56	-382,1	121,9	0,0458*
Tempo7	Tempo 14	-115,6	121,9	0,8733
	Tempo 28	-118,2	121,9	0,8646
	Tempo 56	-141,0	121,9	0,7748
Tempo 14	Tempo 28	-2,54	121,9	1,0000
	Tempo 56	-25,35	121,9	0,9995
Tempo 28	Tempo 56	-22,81	121,9	0,9997

ANEXO 15

Análise de variância da atividade de lacase (UL^{-1}) produzida por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreatores com ar pressurizado e: adição de diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Atividade de lacase (UL^{-1}) *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	590720	590720	147680	3,59	0,030*
Tratamento	2	155716	155716	77858	1,89	0,185
Tempo*Tratamento	8	447295	447295	55912	1,36	0,290
Erro	15	617073	617073	41138		
Total	29	1810802				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÉVEIS DE TEMPO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Tempo 0	Tempo 7	-240,4	117,1	0,2892
	Tempo 14	-349,1	117,1	0,0610
	Tempo 28	-355,1	117,1	0,0554
	Tempo 56	-376,5	117,1	0,0394*
Tempo7	Tempo 14	-108,6	117,1	0,8817
	Tempo 28	-114,7	117,1	0,8603
	Tempo 56	-136,1	117,1	0,7718
Tempo 14	Tempo 28	-6,07	117,1	1,0000
	Tempo 56	-27,45	117,1	0,9992
Tempo 28	Tempo 56	-21,38	117,1	0,9997

ANEXO 16

Análise de variância da atividade de peroxidase (UL^{-1}) produzida por *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado acondicionado em biorreatores com ar pressurizado e: adição de diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Atividade de peroxidase (UL^{-1}) *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASE, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	1559,79	1559,79	389,95	4,93	0,010*
Tratamento	2	36,83	36,83	18,42	0,23	0,795
Tempo*Tratamento	8	130,39	130,39	16,30	0,21	0,985
Erro	15	1187,09	1187,09	79,14		
Total	29	2914,10				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÉVEIS DE TEMPO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Tempo 0	Tempo 7	18,1217	5,136	0,0217*
	Tempo 14	-0,4483	5,136	1,0000
	Tempo 28	1,2117	5,136	0,9992
	Tempo 56	-0,1600	5,136	1,0000
Tempo7	Tempo 14	-18,57	5,136	0,0183*
	Tempo 28	-16,91	5,136	0,0340*
	Tempo 56	-18,28	5,136	0,0204*
Tempo 14	Tempo 28	1,6600	5,136	0,9974
	Tempo 56	0,2883	5,136	1,0000
Tempo 28	Tempo 56	-1,372	5,136	0,9987

ANEXO 17

Análise de variância do pH do solo contaminado acondicionado em biorreatores com ar pressurizado e *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: pH do solo contaminado *versus* Tempo de incubação
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	5	0; 7; 14; 28; 56
Tratamento	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA pH DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	4	0,63315	0,63315	0,15829	6,18	0,004**
Tratamento	2	1,42209	1,42209	0,71104	27,78	0,000**
Tempo*Tratamento	8	0,22901	0,22901	0,02863	1,12	0,405
Erro	15	0,38390	0,38390	0,02559		
Total	29	2,66815				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÉVEIS DE TEMPO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Tempo 0	Tempo 7	0,36333	0,09236	0,0099**
	Tempo 14	0,20667	0,09236	0,2190
	Tempo 28	0,03333	0,09236	0,9960
	Tempo 56	-0,01000	0,09236	1,0000
Tempo7	Tempo 14	-0,1567	0,09236	0,4649
	Tempo 28	-0,3300	0,09236	0,0199**
	Tempo 56	-0,3733	0,09236	0,0080**
Tempo 14	Tempo 28	-0,1733	0,09236	0,3700
	Tempo 56	-0,2167	0,09236	0,1843
Tempo 28	Tempo 56	-0,04333	0,09236	0,9891

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÉVEIS DE TRATAMENTO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Reator 5% óleo	Reator 8% óleo	-0,1010	0,07154	0,3601
	Reator Solo diluído	0,4030	0,07154	0,0001**
Reator 8% óleo	Reator Solo diluído	0,5040	0,07154	0,0000**

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: TEMPO (0, 7, 14, 28 E 56 DIAS) E TRATAMENTO (5% óleo vegetal, 8% óleo vegetal e solo diluído 1:10)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
T 0 Reator 5% Óleo	T 0 Reator 8% Óleo	-0,07000	0,1600	1,0000
	T 0 Reator Solo diluído	0,64000	0,1600	0,0495*
	T 7 Reator 5% Óleo	0,38000	0,1600	0,5604
	T 7 Reator 8% Óleo	0,30000	0,1600	0,8337
	T 7 Reator Solo diluído	0,98000	0,1600	0,0012**
	T 14 Reator 5% Óleo	0,30000	0,1600	0,8337
	T 14 Reator 8% Óleo	0,19000	0,1600	0,9935
	T 14 Reator Solo diluido	0,70000	0,1600	0,0255*
	T 28 Reator 5% Óleo	0,18000	0,1600	0,9960
	T 28 Reator 8% Óleo	0,08500	0,1600	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	0,40500	0,1600	0,4723
	T 56 Reator 5% Óleo	0,18000	0,1600	0,9960
	T 56 Reator 8% Óleo	0,03000	0,1600	1,0000
	T 56 Reator Solo diluído	0,33000	0,1600	0,7392
T 0 Reator 8% Óleo	T 0 Reator Solo diluído	0,7100	0,1600	0,0228*
	T 7 Reator 5% Óleo	0,4500	0,1600	0,3313
	T 7 Reator 8% Óleo	0,3700	0,1600	0,5967
	T 7 Reator Solo diluído	1,0500	0,1600	0,0006**
	T 14 Reator 5% Óleo	0,3700	0,1600	0,5967
	T 14 Reator 8% Óleo	0,2600	0,1600	0,9271
	T 14 Reator Solo diluído	0,7700	0,1600	0,0117*
	T 28 Reator 5% Óleo	0,2500	0,1600	0,9437
	T 28 Reator 8% Óleo	0,1550	0,1600	0,9991
	T 28 Reator Solo diluído	,4750	0,1600	0,2662
	T 56 Reator 5% Óleo	0,2500	0,1600	0,9437
	T 56 Reator 8% Óleo	0,1000	0,1600	1,0000
	T 56 Reator Solo diluído	0,4000	0,1600	0,4895
T 0 Reator Solo diluído	T 7 Reator 5% Óleo	-0,2600	0,1600	0,9271
	T 7 Reator 8% Óleo	-0,3400	0,1600	0,7047
	T 7 Reator Solo diluído	0,3400	0,1600	0,7047
	T 14 Reator 5% Óleo	-0,3400	0,1600	0,7047
	T 14 Reator 8% Óleo	-0,4500	0,1600	0,3313
	T 14 Reator Solo diluído	-0,4600	0,1600	1,0000
	T 28 Reator 5% Óleo	-0,5550	0,1600	0,3041
	T 28 Reator 8% Óleo	0,0600	0,1600	0,1225
	T 28 Reator Solo diluído	-0,2350	0,1600	0,9635
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,4600	0,1600	0,3041
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,6100	0,1600	0,0686
	T 56 Reator Solo diluído	-0,3100	0,1600	0,8041
T 7 Reator 5% Óleo	T 7 Reator 8% Óleo	-0,0800	0,1600	1,0000
	T 7 Reator Solo diluído	0,6000	0,1600	0,0764
	T 14 Reator 5% Óleo	-0,0800	0,1600	1,0000
	T 14 Reator 8% Óleo	-0,1900	0,1600	0,9935
	T 14 Reator Solo diluído	0,3200	0,1600	0,7725
	T 28 Reator 5% Óleo	-0,2000	0,1600	0,9898
	T 28 Reator 8% Óleo	-0,2950	0,1600	0,8476
	T 28 Reator Solo diluído	0,0250	0,1600	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,2000	0,1600	0,9898
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,3500	0,1600	0,6691
	T 56 Reator Solo diluído	-0,0500	0,1600	1,0000
T 7 Reator 8% Óleo	T 7 Reator Solo diluído	0,6800	0,1600	0,0319
	T 14 Reator 5% Óleo	0,0000	0,1600	1,0000
	T 14 Reator 8% Óleo	-0,1100	0,1600	1,0000
	T 14 Reator Solo diluído	0,4000	0,1600	0,4895
	T 28 Reator 5% Óleo	-0,1200	0,1600	0,9999
	T 28 Reator 8% Óleo	-0,2150	0,1600	0,9815
	T 28 Reator Solo diluído	0,1050	0,1600	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,1200	0,1600	0,9999
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,2700	0,1600	0,9078
	T 56 Reator Solo diluído	0,0300	0,1600	1,0000
T 7 Reator Solo diluído	T 14 Reator 5% Óleo	-0,6800	0,1600	0,0319*
	T 14 Reator 8% Óleo	-0,7900	0,1600	0,0093**

	T 14 Reator Solo diluído	-0,2800	0,1600	0,8857
	T 28 Reator 5% Óleo	-0,8000	0,1600	0,0084**
	T 28 Reator 8% Óleo	-0,8950	0,1600	0,0029**
	T 28 Reator Solo diluído	-0,5750	0,1600	0,0995
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,9500	0,1600	0,0084**
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,8000	0,1600	0,0016**
	T 56 Reator Solo diluído	-0,6500	0,1600	0,0444*
T 14 Reator 5% Óleo	T 14 Reator 8% Óleo	-0,1100	0,1600	1,0000
	T 14 Reator Solo diluído	0,4000	0,1600	0,4895
	T 28 Reator 5% Óleo	-0,1200	0,1600	0,9999
	T 28 Reator 8% Óleo	-0,2150	0,1600	0,9815
	T 28 Reator Solo diluído	0,1050	0,1600	1,0000
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,1200	0,1600	0,9999
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,2700	0,1600	0,9078
	T 56 Reator Solo diluído	0,0300	0,1600	1,0000
T 14 Reator 8% Óleo	T 14 Reator Solo diluído	0,5100	0,1600	0,1920
	T 28 Reator 5% Óleo	-0,0100	0,1600	1,0000
	T 28 Reator 8% Óleo	0,2150	0,1600	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	-0,1050	0,1600	0,9815
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,0100	0,1600	1,0000
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,1600	0,1600	0,9987
	T 56 Reator Solo diluído	0,1400	0,1600	0,9997
T 14 Reator Solo diluído	T 28 Reator 5% Óleo	-0,5200	0,1600	0,1741
	T 28 Reator 8% Óleo	-0,6150	0,1600	0,0650
	T 28 Reator Solo diluído	-0,2950	0,1600	0,8476
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,5200	0,1600	0,1741
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,6700	0,1600	0,0356*
	T 56 Reator Solo diluído	-0,3700	0,1600	0,5967
T 28 Reator 5% Óleo	T 28 Reator 8% Óleo	-0,0950	0,1600	1,0000
	T 28 Reator Solo diluído	0,2250	0,1600	0,9736
	T 56 Reator 5% Óleo	-0,1500	0,1600	1,0000
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,0000	0,1600	0,9993
	T 56 Reator Solo diluído	0,1500	0,1600	0,9993
T 28 Reator 8% Óleo	T 28 Reator Solo diluído	0,32000	0,1600	0,7725
	T 56 Reator 5% Óleo	0,09500	0,1600	1,0000
	T 56 Reator 8% Óleo	-0,05500	0,1600	1,0000
	T 56 Reator Solo diluído	0,24500	0,1600	0,9509
T 28 Reator Solo diluído	T 56 Reator 5% Óleo	-0,2250	0,1600	0,9736
	T 56 Reator 8% Óleo	0,3000	0,1600	0,5785
	T 56 Reator Solo diluído	-0,0750	0,1600	1,0000
T 56 Reator 5% Óleo	T 56 Reator 8% Óleo	-0,1500	0,1600	0,9993
	T 56 Reator Solo diluído	0,1500	0,1600	0,9993
T 56 Reator 8% Óleo	T 56 Reator Solo diluído	0,3000	0,1600	0,8337

ANEXO 18

Análise de variância da concentração de HCB ao final de 56 dias de incubação de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, acondicionado em biorreator com ar pressurizado com diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10) no final do período de incubação (56 dias).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Concentração de HCB do solo *versus* Tratamento
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Óleo	fixo	2	5; 8
Concentração de organoclorados	fixo	2	0; 1

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA HCB DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Óleo	1	0,018131	0,019305	0,019305	2,24	0,232
Concentração de organoclorados	1	0,001994	0,001994	0,001994	0,23	0,664
Erro	3	0,025883	0,025883	0,008628		
Total	5	0,046009				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

ANEXO 19

Análise de variância da concentração de PeCB ao final de 56 dias de incubação de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, acondicionado em biorreator com ar pressurizado com diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10) no final do período de incubação (56 dias).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Concentração de PeCB do solo *versus* Tratamento
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Óleo	fixo	2	5; 8
Concentração de organoclorados	fixo	2	0; 1

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PeCB DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Óleo	1	0,013806	0,014080	0,014080	2,87	0,189
Concentração de organoclorados	1	0,001143	0,001143	0,001143	0,23	0,663
Erro	3	0,014740	0,014740	0,004913		
Total	5	0,029689				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

ANEXO 20

Análise de variância da concentração de TCB ao final de 56 dias de incubação de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 em solo contaminado com organoclorados, acondicionado em biorreator com ar pressurizado com diferentes concentrações de óleo vegetal (5% e 8%) ao sistema de cultivo e diluição da concentração inicial dos compostos organoclorados (1:10) no final do período de incubação (56 dias).

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: Concentração de TCB do solo *versus* Tratamento
(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Óleo	fixo	2	5; 8
Concentração de organoclorados	fixo	2	0; 1

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TCB DO SOLO, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Óleo	1	0,01279	0,00297	0,00297	0,10	0,777
Concentração de organoclorados	1	0,00754	0,00754	0,00754	0,24	0,656
Erro	3	0,09312	0,09312	0,03104		
Total	5	0,11345				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)