

Nara Ballaminut

**Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus*
crinitus (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação
de solo**

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

São Paulo

2007

Nara Ballaminut

**Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus*
crinitus (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação
de solo**

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

Orientador: Dr. Dácio Roberto Matheus

Seção 1.01 Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Artigo II. Ballaminut, Nara

B188c Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo. / Nara Ballaminut -- São Paulo, 2007.
163 p. il.

Dissertação (mestrado)—Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007
Bibliografia.

1. Biorremediação. 2. Inóculo fúngico. 3. Pentaclorofenol. I. Título

CDU 579

Ao meu filho Iago, pela paciência e compreensão
da ausência materna nas longas tardes solitárias,
para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus pela confiança, orientação, apoio e amizade, que mesmo com tantos compromissos, sempre encontrou espaço na agenda para esclarecer minhas dúvidas.

À Dra. Kátia Maria Gomes Machado pela ajuda e paciência, por tantos ensinamentos acadêmicos, científicos e morais.

À Dra. Adriana de Mello Gugliotta pela ajuda e presteza nas questões taxonômicas, nos ensaios experimentais e pela grande amizade.

À família BIOSOL que me acolheu com tanto carinho e mostrou os benefícios do trabalho em equipe.

À minha “irmãzinha” Marina Bianchini de Salvi pela paciência, companhia e força em todos os momentos.

Aos amigos e companheiros Glauciane Danusa Coelho, Ricardo Soares Oliveira, Ricardo Ribeiro da Silva, Vera Maria Valle Vitali, Luciana Gimenez Jandeli pela amizade e pelo auxílio nos ensaios realizados.

À Dona Josefa (*in memoriam*) e à Cida pelo incansável apoio, paciência e companhia nos saudosos bate-papos matinais.

Aos queridos amigos Sérgio e Stephany pelo incentivo tão bem vindo na finalização dessa etapa da minha vida.

Ao amigo Willian Seiti, pelo companheirismo e ajuda na construção de alguns arquivos dessa dissertação.

A toda equipe da Seção de Micologia e Liquenologia, Seção de Ecologia e Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica.

À FUNDEPAG pelo apoio financeiro.

À minha Tata, irmã Márcia, pelo amor, pelo apoio nos momentos mais difíceis e também pela “terapia virtual”.

Ao meu Tato, irmão Vladimir (*in memoriam*), pelo apoio emocional, que mesmo ausente em matéria sempre esteve por perto.

Ao meu ex-marido, amigo e “irmão” Wandinho, pelo enorme coração, por tanto apoio e compreensão.

À vida por tantas oportunidades e lições de amadurecimento nesse curto, porém difícil caminho da evolução.

E aos meus pais Alcides (*in memoriam*) e Arlete, pois sem eles nada disso seria possível.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	i
LISTA DE QUADROS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Poluição ambiental	1
1.2. Biorremediação	3
1.2.1. Definições e técnicas	3
1.2.2. Processos biodegradativos	5
1.2.3. Agentes biodegradadores	5
1.3. Fungos basidiomicetos e sua aplicação em biorremediação	6
1.4. As enzimas ligninolíticas	11
1.4.1. Peroxidase da lignina (LiP)	12
1.4.2. Peroxidase dependente do manganês (MnP)	12
1.4.3. Lacase	14
1.5. Uso de corantes como indicadores de atividade ligninolítica	15
1.6. Estudos de biodegradação de pentaclorofenol (PCF) utilizando basidiomicetos	17
1.7. Inóculo Fúngico	19
1.7.1. Tipos de preparo de inóculo	19
1.7.2. Materiais lignocelulósicos utilizados como substrato	20
1.7.3. Relação C/N do substrato	21
1.7.4. Características dos inóculos fúngicos	22

1.8. Basidiomicetos na biorremediação de solos contaminados da Baixada Santista	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Material Biológico	25
3.2. Preparo do inóculo	26
3.2.1. Pré inóculo	26
3.2.2. Formulação dos Substratos	27
3.2.2.1. Determinação do Carbono Orgânico	28
3.2.2.2. Determinação do Nitrogênio Total	29
3.2.2.2.1. Digestão ácida	29
3.2.2.2.2. Destilação	30
3.2.3. Substrato sólido	30
3.2.4. Inóculo para aplicação em solo	31
3.3. Cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol	32
3.4. Atividades enzimáticas	34
3.4.1. Obtenção do extrato enzimático	34
3.4.1.1. Extrato enzimático do substrato sólido	34
3.4.1.2. Extrato enzimático do solo	34
3.4.2. Quantificação de Proteínas	34
3.4.3. Atividades enzimáticas no extrato obtido de substrato sólido	35
3.4.3.1. Oxidação total do ABTS	35
3.4.3.2. Lacase	35
3.4.3.3. Peroxidases	36

3.4.3.4. Peroxidase dependente do manganês (MnP)	36
3.4.4. Atividades enzimáticas no extrato obtido de solo	36
3.4.4.1. Atividade de descoloração do RBBR	37
3.5. Avaliação do crescimento fúngico	37
3.5.1. Crescimento fúngico no substrato sólido	37
3.5.1.1. Determinação de ergosterol	38
3.5.2. Crescimento fúngico em solo	39
3.6. Determinação da degradação de pentaclorofenol no solo	39
3.6.1. Determinação de peso seco dos solos tratados	40
3.6.2. Extração e quantificação do pentaclorofenol dos solos tratados	40
3.6.2.1. Teste de solventes para a extração do pentaclorofenol	41
3.6.2.2. Teste de eficiência do método de extração do pentaclorofenol	42
3.7. Análise estatística dos dados	42
 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	 44
4.1. Atividades enzimáticas e crescimento fúngico em substrato sólido (inóculo)	44
4.2. Atividades enzimáticas e crescimento fúngico em solo	47
4.2.1 Atividades enzimáticas de peroxidases, lacase e peroxidase dependente do manganês (MnP)	48
4.2.2. Crescimento fúngico por análise visual	60
4.3. Degradação de pentaclorofenol em solos por <i>L. crinitus</i> CCB274 com inóculos de diferentes idades fisiológicas	63
4.3.1. Testes de eficácia e eficiência de extração do pentaclorofenol do solo	63
4.3.2. Biodegradação de pentaclorofenol em solo por <i>L. crinitus</i> CCB274	64
4.4. Atividades enzimáticas ligninolíticas e degradação de pentaclorofenol em solos com diferentes inóculos	68

4.5. Critérios qualitativos para caracterização do inóculo fúngico	74
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
RESUMO	94
ABSTRACT	96
ANEXOS	98

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)
¹⁴ C-hexaclorobenzeno	Hexaclorobenzeno radiomarcado
CCB	Coleção de Culturas de Basidiomicetos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMRA	Capacidade máxima de retenção de água
DDT	[1, 1, 1-tricloro-2, 2-bi(4-clorofenil) etano]
HRP	Horseradish peroxidase
Lac	Lacase
LiP	Peroxidase dependente da lignina
MEA	Meio de cultura Extrato de Malte-Ágar
MnP	Peroxidase dependente do manganês
PAHs	Hidrocarbonetos poliaromáticos
PCB's	Bifenilas policloradas
PCF	Pentaclorofenol
pH	Potencial hidrogeniônico
RBBR	Azul Brilhante de Remazol R
T5	Tratamento com inóculo de 5 dias de incubação
T10	Tratamento com inóculo de 10 dias de incubação
T15	Tratamento com inóculo de 15 dias de incubação
T20	Tratamento com inóculo de 20 dias de incubação
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno- <i>p</i> -dioxina

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Estudos de biodegradação de alguns poluentes ambientais por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .	7
Quadro 2 Fungos basidiomicetos aplicados em processos de biodegradação de diferentes xenobióticos.	8

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	39
Tabela 2	55
Tabela 3	56
Tabela 4	57
Tabela 5	58
Tabela 6	60
Tabela 7	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 cultivado e frutificado em bagaço de cana-de-açúcar (suplementado C/N 180).	26
Figura 2 Inóculo de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 (crescendo em bagaço de cana-de-açúcar suplementado C/N 90).	31
Figura 3 <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 no cultivo em substrato sólido colonizando solo contaminado com pentaclorofenol.	33
Figura 4 Atividades enzimáticas e biomassa fúngica, estimada por ergosterol, de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 cultivado em substrato sólido.	45
Figura 5 Atividades enzimáticas de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 (inóculo de 5 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol.	49
Figura 6 Atividades enzimáticas de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 (inóculo de 10 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol.	50
Figura 7 Atividades enzimáticas de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 (inóculo de 15 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol.	51
Figura 8 Atividades enzimáticas de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 (inóculo de 20 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol.	52
Figura 9 Colonização do solo contaminado com pentaclorofenol por <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 aplicado com diferentes idades fisiológicas.	62
Figura 10 Solo contaminado com pentaclorofenol totalmente colonizado pelo micélio fúngico de <i>Lentinus crinitus</i> CCB274.	63
Figura 11 Redução porcentual de pentaclorofenol do solo controle e do solo inoculado com <i>Lentinus crinitus</i> CCB274 aos 60 dias de incubação.	65
Figura 12 Acompanhamento da redução de pentaclorofenol nos tratamentos com	67

inóculo de *Lentinus crinitus* CCB274 em diferentes tempos de incubação.

- Figura 13 Degradação do pentaclorofenol presente no solo, atividade enzimática de MnP e de lacase produzidas aos 5 dias de incubação, pelos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274. 69
- Figura 14 Degradação do pentaclorofenol presente no solo, atividade enzimática de MnP e de lacase produzidas aos 15 dias de incubação, pelos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274. 71
- Figura 15 Atividades enzimáticas em substrato sólido, tempo 0 (zero) dia e em solo, tempo 5 e 15 dias, produzidas por *Lentinus crinitus* CCB274 nos diferentes tratamentos. 73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição ambiental

O rápido crescimento industrial e urbano das últimas décadas aumentou a complexidade dos resíduos lançados no meio ambiente, provocando sérios problemas ecológicos e toxicológicos. A partir do século XX foram sintetizados vários compostos das indústrias química, farmacêutica, de fertilizantes e de pesticidas que, não encontrando decompositores naturais, não participam dos ciclos biogeoquímicos. Esses compostos são estáveis, sob condições aeróbias e anaeróbias, acumulando-se no ambiente. Tais compostos são chamados genericamente de xenobióticos e podem se tornar recalcitrantes e persistentes (Leisinger 1983, Semple *et al.* 2001).

Um grande número de substâncias químicas e sintéticas (haloaromáticos, pesticidas, compostos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas, dioxinas, entre outros) foram introduzidas no mercado sem prévia avaliação do seu impacto ambiental. O resultado foi, em muitos casos, a poluição do meio ambiente por contaminantes tóxicos, colocando em risco a saúde humana e a integridade dos ecossistemas (Häggbloom 1992, Boopathy 2000, Pointing 2001, Rabinovich *et al.* 2004).

Os principais exemplos desses compostos poluentes são os defensivos agrícolas, que no início do século passado eram, em sua maioria, de composição inorgânica e muito estáveis no ambiente. A partir da década de 1940 os pesticidas inorgânicos foram substituídos por orgânicos. Isso aconteceu por acreditar-se que o problema da persistência seria resolvido, pela atuação conjunta dos agentes degradativos bióticos e abióticos sobre esses compostos. No entanto, o uso desses pesticidas orgânicos apresentou problemas de toxicidade e persistência no ambiente, resultando em biomagnificação na cadeia alimentar, provocando efeitos tóxicos ligados ao declínio de populações até em níveis tróficos mais altos (Silva & Fay 1997).

No Brasil, o consumo de defensivos agrícolas no ano de 2000 passou de 130.000 toneladas, incluindo herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas, moluscidas e reguladores de crescimento. Os estados brasileiros com maior volume de consumo desses defensivos foram: Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás (Brasil 2003).

Dentre esses estados, o Estado de São Paulo é o que apresenta também maior número de relatos de acidentes com resíduos perigosos e de áreas contaminadas. Um dos casos que merece destaque, onde o estudo em questão está inserido, é o das indústrias instaladas na cidade de Cubatão na década de 1960, que tinham como finalidade a produção de agrotóxicos e solventes clorados. Cerca de 82 toneladas de pentaclorofenol e 215 toneladas de pentaclorofenato de sódio (“pó da China”) foram produzidos nessa área. A partir de 1974, passou-se a fabricar também tetracloreto de carbono e percloroetileno (cerca de 18 mil toneladas por ano) e até meados da década de 1990, essas unidades fabris tiveram suas atividades suspensas. No entanto, resíduos da produção desses compostos foram acumulados em locais inadequados para esse fim, por estarem próximos a áreas povoadas e com possibilidade de contaminação de rios e manguezais da região. Uma unidade fabril da Rhodia, instalada no local, que mantinha vários depósitos, reconheceu alguns deles como áreas de contaminação ambiental. Parte dos solos contaminados foi removida e armazenada em um local denominado Estação de Espera, onde aguardam tratamento ainda hoje (Matheus 1998, Brasil 2003, Matheus 2003).

Opções de tratamento para esse tipo de problema 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 e por 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 (CO_2 , H_2O e sais inorgânicos). Estes sistemas não geram resíduos sólidos,

quando conduzidos *in situ* (no local contaminado), 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).

1.2. Biorremediação

1.2.1. Definições e técnicas

Biorremediação é o uso de organismos vivos em tratamento de ambiente contaminado para reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental. Esta prática é utilizada desde as primeiras civilizações que, sem o conhecimento adequado, confiaram aos microrganismos a destruição de compostos perigosos de uso doméstico, agrícola e industrial, com conversão desses compostos a dióxido de carbono, água e biomassa. A partir do século XIX, o biotratamento tornou-se mais aperfeiçoado com melhores engenharias de processo, embora ainda não tivesse sido chamado de biorremediação. Nas últimas décadas, técnicas de biotratamento foram muito empregadas. Hoje, qualquer transformação ou remoção de contaminantes do ambiente por organismos é considerada como biorremediação (Litchfield 2005).

Tecnologias de biorremediação estão recebendo maior atenção para restauração de locais muito poluídos, onde a biodegradação natural ocorre lentamente ou imperceptivelmente. Métodos de aceleração desse processo podem utilizar microrganismos de ocorrência natural (autóctone), com estimulação desta microbiota pela manipulação das condições ambientais. Esses métodos podem ainda ser otimizados, introduzindo microrganismos alóctones com comprovada capacidade de metabolizar o poluente. Processos otimizados podem ser conduzidos no próprio local (*in situ*), ou

fora dele (*ex situ*), implicando assim na remoção do material contaminado (Boopathy 2000, Pointing 2001, Matheus & Machado 2002).

Alguns exemplos de técnicas de biorremediação são: 1) biorremediação intrínseca ou atenuação natural, onde a degradação dos contaminantes é feita pela microbiota autóctone, utilizando apenas os recursos disponíveis no local; 2) bioestimulação, que é a otimização das condições de crescimento dos microrganismos nativos do local contaminado, oferecendo aos microrganismos condições que estimulem seu metabolismo degradativo; 3) bioaumento ou bioenriquecimento, onde ocorre a introdução de microrganismos para a degradação de um contaminante; 4) biofiltros, que são microrganismos mobilizados em colunas para tratamento de ar ou efluentes líquidos; 5) bioventilação, que consiste na introdução de oxigênio no solo para estimular a ação dos microrganismos e evaporar o poluente; 6) “land farming”, sistema de tratamento de resíduos e efluentes contaminados no solo; 7) compostagem, processo de tratamento aeróbio termófilo, onde o material contaminado é misturado a um grande volume de substrato que contém a microbiota degradadora; e 8) biorreatores, reatores onde é introduzido o microrganismo ou a comunidade microbiana, com controle de aeração, temperatura e outros fatores (Boopathy 2000, Pointing 2001, Matheus *et al.* 2003, Litchfield 2005).

O emprego de biorreatores é uma das melhores alternativas para tratamentos *ex situ*, pois o contato entre o poluente e os microrganismos é facilitado resultando em um processo mais eficiente. Além disso, estes vêm sendo empregados para o tratamento de materiais contaminados por uma grande variedade de compostos orgânicos poluentes, incluindo compostos recalcitrantes e tóxicos como o pentaclorofenol, halogenados e outros (Pletsch *et al.* 1999, Boopathy 2000, Pointing 2001, Matheus & Machado 2002, Matheus *et al.* 2003, Litchfield 2005).

1.2.2. Processos biodegradativos

A biorremediação envolve o processo de biotransformação do poluente, que pode ocorrer por processos de metabolismo ou de co-metabolismo. Nesse último, os compostos orgânicos biotransformados não são usados como fonte de energia ou como elementos constituintes do organismo. A biotransformação inclui reações de oxidação, redução, hidrólise e conjugação. As vias metabólicas de biodegradação dependem de diversos fatores, como a estrutura química do composto xenobiótico, a capacidade metabólica dos organismos envolvidos na degradação, as vias bioquímicas e as condições ambientais (Shannon & Unterman 1993, Eerd *et al.* 2003).

1.2.3. Agentes biodegradadores

Alguns dos agentes primários da decomposição da matéria orgânica na biosfera são bactérias heterotróficas e fungos. No entanto, o uso de bactérias em tratamentos biológicos pode ser limitado por alguns fatores de estresse ambiental. O sistema enzimático bacteriano só é produzido na presença do poluente. Além disso, bactérias têm baixa eficiência na degradação de compostos insolúveis em água ou ligados ao solo (Rabinovich *et al.* 2004).

Por outro lado, os fungos 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 a utilizam-se fungos basidiomicetos inoculados para iniciar o ataque metabólico (Matheus & Machado 2002, Rabinovich *et al.* 2004).

1.3. Fungos basidiomicetos e sua aplicação em biorremediação

Os fungos basidiomicetos lignocelulolíticos crescem sobre madeira em decomposição e resíduos de origem vegetal. Algumas espécies apresentam certo grau de especificidade e dependem da ocorrência de um substrato definido. Outras, menos exigentes, ocorrem sobre diversos substratos e possuem ampla distribuição geográfica. Possuem um sistema enzimático capaz de degradar madeira, celulose, hemicelulose e lignina, quebrando esses compostos até sua mineralização (Matheus & Okino 1998, Tuomela *et al.* 2000, Pointing 2001, Eerd *et al.* 2003, Tortella *et al.* 2005).

A degradação da lignina, biopolímero de alto peso molecular, por fungos basidiomicetos ocorre por meio de reações intermediadas por um mecanismo, que começa com a subtração de um elétron de seu núcleo aromático, para formarem radicais catiônicos instáveis e, em sequência, formam produtos de reações não enzimáticas, de radicais catiônicos com água e outros nucleófilos (Aust & Bumpus 1987, Kirk & Farrel 1987, Bononi 1997, Pointing 2001, Hofrichter 2002).

Os nutrientes absorvidos pelos fungos, por meio de reações anabólicas e catabólicas, são convertidos em constituintes celulares e energia. Os nutrientes orgânicos obtidos de carboidratos são oxidados pela respiração e pela fermentação, produzindo reservas energéticas e estruturas de parede celular. A energia química que é liberada nesses processos envolve a perda de elétrons de um composto para reduzir outro, o qual é denominado aceptor de elétrons. Na maioria dos fungos o aceptor final é o oxigênio. Os principais aceptores de elétrons de interesse na biodegradação são: o oxigênio para microrganismos aeróbios e nitrato, manganês, ferro, sulfato, dióxido de carbono e carbono orgânico para anaeróbios (Moore-Landecher 1996, Boopathy 2000, Matheus & Machado 2002).

A capacidade dos fungos de podridão branca em degradar lignina torna-os o grupo mais interessante dentre os fungos para utilização em biorremediação, pois o sistema que degrada extensivamente a lignina também é responsável, pelo menos em parte, pela degradação de alguns compostos poluentes orgânicos como clorofenóis, nitrofenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos.

Esta capacidade de degradar xenobióticos, inicialmente foi relacionada à semelhança entre as estruturas da molécula de lignina e de alguns compostos sintéticos orgânicos, principalmente os aromáticos. Atualmente sabe-se que a capacidade biodegradativa de fungos de podridão branca deve-se à presença do sistema enzimático ligninolítico inespecífico e extracelular (Kirk & Farrell 1987, Håggbloom 1992, Matheus & Okino 1998, Tuomela *et al.* 2000, Evans & Hedger 2001, Pointing 2001, Eerd *et al.* 2003).

Foi a partir do entendimento básico do mecanismo desse sistema enzimático ligninolítico, que foi proposto que esses microrganismos poderiam ser utilizados na degradação de poluentes ambientais. A maioria das descobertas sobre o mecanismo envolvido na degradação de xenobióticos foi feita com o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, que apresentou evidências de possuir capacidade de mineralizar DDT, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina), benzo(α)pireno, lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano), bifenilas policloradas (PCB's), além de degradar clorofenóis (Reddy *et al.* 1998, Reddy & Gold 2000, Pointing *et al.* 2001, Shim & Kawamoto 2002, Krishna 2005, Tortella *et al.* 2005).

Matheus & Okino (1998) citaram uma lista parcial de poluentes ambientais estudados em tratamentos de biodegradação utilizando *P. chrysosporium*. No quadro abaixo estão apresentados alguns trabalhos mais recentes (Quadro 1).

QUADRO 1: Estudos de biodegradação de alguns poluentes ambientais por *Phanerochaete chrysosporium*.

Composto poluente	Referências
Aromáticos clorados	Reddy & Gold 2000,
	Durán <i>et al.</i> 2002,
	Shim & Kawamoto 2002,
	Davila-Vazquez <i>et al.</i> 2005.

Corantes	Pazarlioglu <i>et al.</i> 2005
Pesticidas	Castillo <i>et al.</i> 2001
Policíclicos aromáticos	Dzul-Puc <i>et al.</i> 2005

Outras espécies de fungos basidiomicetos estão sendo muito estudadas em processos de biodegradação. No Quadro 2 estão apresentadas publicações recentes de estudos utilizando basidiomicetos em processos de biodegradação.

QUADRO 2: Fungos basidiomicetos aplicados em processos de biodegradação de diferentes xenobióticos.

Basidiomiceto	Xenobiótico	Referências
<i>Coriolus versicolor</i>	2,4 diclorofenol e pentaclorofenol	Ullah <i>et al.</i> 2000a, Ullah <i>et al.</i> 2000b, Seradati <i>et al.</i> 2003.
	2,4,6 triclorofenol	Leontievsky <i>et al.</i> 2000, Leontievsky <i>et al.</i> 2001.
	antraceno e benzo(α)pireno	Dodor <i>et al.</i> 2004
	Pentaclorofenol	Walter <i>et al.</i> 2004, Walter <i>et al.</i> 2005.
<i>Irpex lacteus</i>	fenantreno, fluoranteno, antraceno e pireno	Novotný <i>et al.</i> 2000, Novotný <i>et al.</i> 2004.
<i>Lentinus crinitus</i>	hexaclorobenzeno e pentaclorofenol	Matheus <i>et al.</i> 2000, Matheus <i>et al.</i> 2003, Machado <i>et al.</i> 2005b.

Continuação		
<i>Panus tigrinus</i>	2,4 diclorofenol, 2,4,6 triclorofenol e pentaclorofenol	Leontievsky <i>et al.</i> 2000, Leontievsky <i>et al.</i> 2001, Leontievsky <i>et al.</i> 2002.
<i>Pleurotus pulmonarius</i> ;	Pentaclorofenol	Law <i>et al.</i> 2003
<i>P. eryngii</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>P. sajor-caju</i>	2,4 diclorofenol e benzo(α)pireno	Rodríguez <i>et al.</i> 2004
<i>Psilocybe castanella</i>	hexaclorobenzeno	Matheus <i>et al.</i> 2000, Matheus <i>et al.</i> 2001, Matheus <i>et al.</i> 2003, Moreira-Neto 2006.
	Pentaclorofenol	Machado <i>et al.</i> 2005b
<i>Trametes villosa</i>	2,4 diclorofenol e pentaclorofenol	Ahn <i>et al.</i> 2002
	pentaclorofenol	Machado <i>et al.</i> 2005b

Sabe-se hoje que a degradação da lignina por fungos basidiomicetos constitui um processo oxidativo, extracelular e inespecífico. Apesar de vários de seus aspectos necessitarem investigação, a degradação pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intracelulares e extracelulares, representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio além de compostos metabólicos intermediários de baixo peso molecular (Boyle *et al.* 1992, Leonowicz *et al.* 1999, Tuomela *et al.* 2000, Pointing 2001). 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, Novotny' *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005a).

Aust (1990) resume algumas das vantagens em se utilizar fungos ligninocelulolíticos em processos de biorremediação e tratamento de resíduos, quais sejam:

1. O sistema enzimático, sendo extracelular, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos e, portanto, pouco acessíveis à ação bacteriana;
2. O sistema sendo inespecífico pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para a mistura deles;
3. O sistema, sendo produzido em resposta a condições de limitação de nutrientes, não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença de lignina ou do composto poluente;
4. Este grupo de fungos possui vantagens competitivas quando materiais ligninocelulósicos são utilizados como fonte de carbono;
5. A degradação da lignina ocorre até que sua concentração seja reduzida a níveis não detectáveis, onde o produto final é CO₂. Este é o tipo de processo desejável para os xenobióticos.

A falta de informações sobre a aplicação de fungos ligninolíticos em biorremediação leva a problemas significativos na aplicação em grande escala, podendo prejudicar os objetivos do tratamento. Nos Estados Unidos, o desenvolvimento comercial da biorremediação, utilizando fungos, recebeu financiamento durante períodos pré-determinados pelas instituições de fomento. O mesmo tem acontecido no Brasil. No entanto, os prazos para o desenvolvimento tecnológico são extensos excedendo, em muitos casos, os limites das agências financiadoras. Quando o tempo necessário para o desenvolvimento comercial completo da tecnologia excede os prazos previstos e o processo de biorremediação não atinge a expectativa prevista, tende a ser considerado ineficaz devido a não conclusão dos objetivos. A fisiologia dos fungos ligninolíticos, em particular em relação ao sistema enzimático e a sua participação nos mecanismos de degradação de poluentes ambientais, é ainda pouco conhecida. Lamar & White (2001), apresentaram algumas das dificuldades no desenvolvimento das pesquisas voltadas ao estudo de biorremediação em solo com

basidiomicetos em aplicações gerais. Isso provocou diminuição do número de publicações sobre esse tema, a vista de outras alternativas de biorremediação de solos contaminados com compostos pouco recalcitrantes. Assim, faz-se necessário o aumento de estudos relacionados a esse assunto o aos aspectos aplicados à engenharia de processos de biorremediação para definir a eficácia de tais processos (Morgan *et al.* 1993, Evans & Hedger 2001, Lamar & White 2001, Matheus & Machado 2002, Rabinovich *et al.* 2004).

1.4. As enzimas ligninolíticas

São três as principais enzimas diretamente envolvidas na degradação da lignina e de xenobióticos por basidiomicetos: peroxidase dependente do manganês (MnP), E.C. 1.11.1.13; peroxidase da lignina (LiP), E.C. 1.11.1.14 e lacases (Lac), E.C. 1.10.3.2. Acredita-se ser encontradas agindo na superfície das hifas em contato com as células de parede, reagindo com um grande número de compostos fenólicos. A maleabilidade da atividade ligninolítica dos fungos de podridão branca também está associada às múltiplas isoenzimas presentes, que possuem características físicas e cinéticas similares, mas diferem na estabilidade, quantidade e propriedades catalíticas (Kirk & Farrel 1987, Tuor *et al.* 1995, Leonowicz *et al.* 1999, Arora & Gill 2001, Evans & Hedger 2001, Gowthaman *et al.* 2001, Papinutti 2003, Wesenberg *et al.* 2003, Rabinovich *et al.* 2004).

Atualmente o número de trabalhos que relacionam a produção enzimática de basidiomicetos com a degradação de compostos poluentes vem aumentando. Davila-Vazquez *et al.* (2005) em estudo com *Phanerochaete chrysosporium* mostraram que peroxidases extracelulares, LiP e MnP oxidaram, *in vitro*, os compostos fenólicos 2,4-diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol e pentaclorofenol, produzindo 1,4-quinona correspondente. Ullah. *et al.* (2000a), Ullah. *et al.* (2000b) e Bollag *et al.* (2003) são outros exemplos de estudos com aplicação de enzimas de basidiomicetos em biorremediação.

Vem sendo propostas duas estratégias para a utilização de enzimas ligninolíticas em degradação de compostos recalcitrantes: transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos e uso de enzimas extraídas do meio de cultura. Entretanto, a escolha da melhor estratégia depende do objetivo e das condições ambientais empregadas durante o processo de biorremediação (Trupkin *et al.* 2003).

1.4.1. Peroxidase da lignina (LiP)

A primeira enzima que mostrou capacidade em atacar compostos de modelo lignina foi a peroxidase da lignina (LiP), isolada de *P. chrysosporium*, no início da década de 1980 (Tien & Kirk 1984). A LiP é a principal enzima envolvida na degradação de compostos não fenólicos da lignina, no entanto, apesar de ser uma enzima com elevado potencial redox, não é produzida por todas as espécies de fungos de podridão branca (Kirk & Farrel 1987, Schoemaker & Leisola 1990, Hatakka 1994, Evans & Hedger 2001, Gowthaman *et al.* 2001, Martínez *et al.* 2005).

LiP de diferentes fontes mostraram capacidade de mineralizar vários compostos aromáticos recalcitrantes, de oxidar numerosos policíclicos aromáticos e também compostos fenólicos (Durán & Esposito 2000), bifenilas policloradas e diversos corantes (Wesenberg *et al.* 2003).

Esta enzima é estudada em ação conjunta com outras enzimas na degradação de poluentes. Novotný *et al.* (2000) mostraram que o fungo de podridão branca *Irpex lacteus*, é capaz de degradar hidrocarbonetos poliaromáticos e ainda sugeriram que a LiP, juntamente com a lacase, podem participar da degradação, confirmando a ação conjunta dessas enzimas.

1.4.2. Peroxidase dependente do manganês (MnP)

Em 1984, Kuwahara *et al.* descobriram uma peroxidase diferente da ligninase, presente em fluído extracelular de culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium*. Esta enzima isolada mostrou

necessidade por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Mn (II) e lactato. Semelhante a peroxidase da raiz forte (HRP), outra heme-peroxidase, a MnP oxidou vermelho de fenol, *o*-dianisidina e corantes poliméricos (Kuwahara *et al.* 1984, Kirk & Farrell 1987, Hofrichter *et al.* 2001).

A peroxidase dependente de manganês é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético. As MnP participam de reações de despolimerização de ligninas sintéticas e degradação de cloroligninas, atuam também como mediador na etapa inicial da degradação de ligninas de alta massa molecular (Kirk & Farrell 1987, Hofrichter 2002, Martínez *et al.* 2005). Além disso, atuam na oxidação de unidades fenólicas da lignina, sistemas baseados na mediação por ácidos graxos insaturados e seus derivados que, por exemplo, vem sendo relacionados com a degradação de estruturas não fenólicas de lignina por MnP (Watanabe *et al.* 2000, Hofrichter 2002).

A produção de MnP está aparentemente limitada a alguns fungos basidiomicetos e outros organismos. Entretanto, a habilidade de sintetizar MnP é difundida entre grupos taxonomicamente distintos de basidiomicetos (Hofrichter 2002).

A cooperação vantajosa de MnP com outras oxiredutases é evidenciada por MnP e lacase, bem como MnP e LiP, resultando assim no crescimento da aplicação de despolimerização de lignina. Muitos derivados de lignina biogeoquimicamente modificados, bem como organopoluentes, incluindo xenobióticos persistentes, mostraram suscetibilidade ao ataque da MnP (Hofrichter *et al.* 2001, Hofrichter 2002).

Alguns autores evidenciam essa ação conjunta de MnP e lacase relacionadas à degradação. Em estudo de biorremediação em meio líquido e solo, Novotný *et al.* (2004) comentam a importância dos altos níveis dessas duas enzimas, detectadas no cultivo em solo e em culturas de *Pleurotus ostreatus*, relacionando-as às maiores taxas de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos.

Estudos de degradação de compostos orgânicos por meio da catálise enzimática da MnP estão sendo avaliados (Leontievsky *et al.* 2001, Steffen *et al.* 2003). Hofrichter *et al.* 1998, em um

estudo com MnP de *Nematoloma frowardii*, relacionaram a mineralização de compostos alifáticos e aromáticos, incluindo pentaclorofenol, com a atividade de MnP.

Durán & Espósito (2000) citam outros estudos que correlacionam a produção de MnP com a conversão e a mineralização de compostos poluentes.

1.4.3. Lacase

Lacases (benzenodiol : oxygen oxiredutases ou *p*-diphenol oxidase : oxygen oxidoreductase) são oxidases multi-cobre produzidas por microrganismos e plantas, as quais participam *in natura* de ambos os processos de biossíntese e degradação da lignina. Uma lacase polifenoloxidase foi considerada parte integrante do sistema enzimático ligninolítico de basidiomicetos, esta é uma glicoproteína, com cobre no sítio ativo, que catalisa a redução de oxigênio molecular para água com simultânea oxidação de compostos fenólicos e polifenólicos, que são seu principal substrato (Bourbonnais & Paice 1988, Tuor *et al.* 1995, Durán & Esposito 2000, Evans & Hedger 2001, Mayer & Staples 2002, Claus 2004, Moldes 2004, Baldrian 2006).

A lacase opera em conjunção com outras enzimas ligninolíticas como a LiP e a MnP. As duas enzimas recentes são mais potentes oxidantes do que a lacase. No entanto, essa última é capaz de oxidar maior número de constituintes aromáticos da lignina. Considerando que a lacase oxida diretamente somente as subunidades fenólicas, as quais são mais fáceis de oxidar, mas relativamente menos abundante. Esta enzima teve seu papel ampliado quando foi verificada sua capacidade de degradar também subestruturas não fenólicas da lignina na presença de compostos mediadores, como espécies fenólicas presentes no ambiente natural (Bourbonnais & Paice 1990, Eggert *et al.* 1996a). Esses mediadores naturais podem ser metálicos ou fragmentos da lignina gerados por outras enzimas ligninolíticas. Substâncias como ácidos fenólicos também são propostos como mediadores naturais (Durán & Esposito 2000, Novotný *et al.* 2000, D'Acunzo 2003, Claus 2004, Baldrian 2006). O mediador oxidado pode desenvolver um mecanismo de oxidação não

disponível à enzima, estendendo a oxidação a uma série de substratos que não estariam acessíveis às enzimas (Fabbrini *et al.* 2002).

A participação da lacase na degradação de compostos xenobióticos é muito estudada. Essa enzima oxida muitos substratos: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, benzopirenos, organofosforados entre outros (Durán & Esposito 2000, Baldrian 2006). Autores como Keum & Li (2004), avaliando dois gêneros de basidiomicetos, puderam verificar a degradação de bifenilas hidroxi-policloradas por lacases produzidas por estes fungos. Outros autores também mostraram lacase de fungos basidiomicetos atuando na degradação de compostos xenobióticos (Ullah *et al.* 2000a, Ullah *et al.* 2000b, Tanaka *et al.* 2001, Bollag *et al.* 2003, Rodríguez *et al.* 2004).

1.5. Uso de corantes como indicadores de atividade ligninolítica

O uso de corantes, como indicadores de atividade ligninolítica, foi sugerido a partir de evidências que corantes poliméricos atuavam como substrato de enzimas ligninolíticas. Os primeiros autores a proporem o uso de corantes poliméricos, para seleção de microrganismos ligninolíticos, foram Glenn & Gold (1983), com o objetivo de aperfeiçoar os testes. Desde então esse método é utilizado para detectar a habilidade ligninolítica de espécies de alguns fungos. Em seguida, vários autores passaram a relacionar a capacidade de descolorir corantes, poliméricos ou não, com atividade ligninolítica de diversos fungos (Soares *et al.* 2001, Machado 2003, Trupkin *et al.* 2003, Bôer *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005a, Vitali *et al.* 2006, Machado & Matheus 2006).

A utilização de corantes apresenta vantagens por serem estáveis, solúveis, de baixo custo e obtidos facilmente em sua forma pura. Além disso, têm baixa toxicidade aos microrganismos, permitem desenvolvimento de ensaios espectrofotométricos simples, rápidos e quantitativos. Também podem assegurar que as etapas iniciais da degradação sejam extracelulares, devido à sua natureza polimérica. Ademais, existe boa correlação dos corantes Azul Brilhante de Remazol R e

Poly-478 com o potencial ligninolítico (Bending *et al.* 2002, Trupkin *et al.* 2003, Palmieri *et al.* 2005, Machado & Matheus 2006).

Azul Brilhante de Remazol R (RBBR, 1-amino-9,10-dihydro-9,10-dioxo-4-[(3-{{2-(sulfooxy) ethyl} sulfonyl} phenyl) amino]-2-anthracenesulfonic acid) é um corante sintético utilizado como matéria prima na fabricação de corantes poliméricos. É derivado do antraceno, organopoluente recalcitrante, que representa uma importante classe de poluentes, muitas vezes tóxica (Soares *et al.* 2001). Trabalhos demonstram que a descoloração do corante RBBR está relacionada, pelo menos parcialmente, com a ação de enzimas ligninolíticas como a LiP, MnP e lacase (Deveci *et al.* 2004, Palmieri *et al.* 2005).

Outras enzimas descobertas mais recentemente, como a peroxidase RBBR, vêm sendo referidas como principal atividade enzimática de algumas culturas ligninolíticas, que apresentam descoloração do corante RBBR em altos níveis (Shin *et al.* 1997, Machado 2003).

Matheus *et al.* (2003) estudando a capacidade dos fungos basidiomicetos, *Psilocybe castanella* CCB444 e *Lentinus crinitus* CCB274, de colonizar solos em biorreatores, constataram que atividade enzimática produzida durante cultivo em solo, pode ser considerada um bom parâmetro para avaliar as condições fisiológicas do fungo. Além disso, a técnica de isolamento de basidiomicetos utilizando RBBR foi apropriada para indicar a presença do fungo.

Mtui & Nakamura (2004) em um trabalho de seleção de basidiomicetos, com capacidade em degradar lignina, utilizando corante RBBR, guaiacol, α -naftol e pirogallol observaram que os fungos capazes de oxidá-los produziram LiP, MnP e lacase. Correlacionaram então a descoloração do RBBR e a oxidação dos substratos orgânicos recalcitrantes utilizados com a degradação da lignina e de compostos xenobióticos.

Machado *et al.* (2005a) fizeram uma seleção de fungos basidiomicetos com potencial de aplicação em sistemas de biorremediação baseada em três etapas, sendo uma delas a capacidade de formação de halo de descoloração do corante polimérico Azul Brilhante de Remazol R, em meio sólido, comprovando que esta é uma forma rápida e prática de constatar a presença do complexo

enzimático inespecífico que atua na descoloração do corante e pode também atuar na degradação de xenobióticos, como pentaclorofenol.

1.6. Estudos de biodegradação de pentaclorofenol (PCF) utilizando basidiomicetos

O pentaclorofenol é um dos compostos organoclorados bastante estudados quanto à biodegradação por basidiomicetos (Mileski *et al.* 1988, Lamar & Dietrich 1992, Lamar *et al.* 1994, Shim & Kawamoto 2002, Law *et al.* 2003, Walter *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005b, Tortella *et al.* 2005, Walter *et al.* 2005, Marcial *et al.* 2006). É um pesticida clorofenólico, constituído de benzeno com cinco átomos de cloro substituídos e suas moléculas apresentam caráter ácido. Um sólido branco cristalino relativamente volátil e solúvel em solventes orgânicos como o metanol, acetona e benzeno, porém pouco solúvel em água (10 mg L⁻¹ a 25° C) (Shiu, 1994). Por outro lado, seu sal (pentaclorofenato de sódio) é solúvel em água, o que o torna um biocida versátil para utilização. Tem fórmula molecular C₆Cl₅OH, peso molecular 266,35 e é altamente resistente à degradação biótica e abiótica, como resultado disso permanece em níveis tóxicos no ambiente (Häggblom & Valo 1995, Mcallister 1996, Pointing 2001, Semple *et al.* 2001).

O uso do pentaclorofenol como preservativo de madeira foi responsável por boa parte da sua produção (Häggblom & Valo 1995, Pointing 2001). Esse tipo de utilização não foi considerado como uma ameaça de poluição, entretanto a contaminação do solo e águas subterrâneas, por produtos dessa aplicação, aumentou a preocupação com os problemas ambientais, já que o pentaclorofenol é um poluente comum em solo e água (Walter *et al.* 2004). Esse organoclorado, juntamente com o 2,4,6 triclorofenol, foi listado como um dos principais poluentes pelas Agências de Proteção Ambiental dos Estado Unidos e da União Européia (Meunier 2002).

Exemplo de contaminação ambiental por pentaclorofenol proveniente atividades industriais para a produção de preservativos de madeira aconteceu na Nova Zelândia, onde foram encontrados

800 locais contaminados com pentaclorofenol. Atualmente, estudos de biorremediação estão sendo desenvolvidos para descontaminação dessas áreas (Walter *et al.* 2004, Walter *et al.* 2005).

Mcallister (1996) comenta que a biodegradação do pentaclorofenol pode ocorrer por meio de transformação, degradação biótica, por plantas ou pelo consumo animal, que acabam contribuindo para a remoção desse poluente do meio ambiente. Muitos animais metabolizam e eliminam o pentaclorofenol, produzindo compostos intermediários conjugados a esse poluente, a biodegradação do pentaclorofenol pode ocorrer ainda pela ação microbiana (Mileski *et al.* 1988, Lamar & Dietrich 1992, Mcallister 1996, Ullah *et al.* 2000a, Ullah *et al.* 2000b, Leontievsky *et al.* 2001, Leontievsky *et al.* 2002, Matheus & Bononi 2002, Machado *et al.* 2005b).

Em geral, os fungos possuem grande sensibilidade ao pentaclorofenol. A maioria deles realiza hidroxilação deste composto por meio do sistema das monoxigenases, uma estratégia padrão dos eucariotos para a desintoxicação de xenobióticos. Algumas das evidências da participação das enzimas ligninolíticas no metabolismo de xenobióticos incluem o ataque inicial ao pentaclorofenol, em culturas de basidiomicetos, que parece ter sido realizado pelas enzimas extracelulares (fenoloxidasas, peroxidase da lignina, peroxidase dependente do manganês e lacase), onde LiP, MnP e lacase foram capazes de catalisar o primeiro passo, a desalogenação oxidativa de vários fenóis clorados (Mcallister 1996, Reddy & Gold 2000, Leontievsky *et al.* 2001).

Com esta ampla atividade degradativa, os fungos podem ser organismos adequados para inoculação em lugares contaminados com pentaclorofenol e em associação com outros os compostos tóxicos. Uma grande quantidade dos estudos direcionados a degradação de clorofenóis foi conduzida com fungos basidiomicetos (Shim & Kawamoto 2002, Law *et al.* 2003, Walter *et al.* 2004, Novotný *et al.* 2000, Novotný *et al.* 2004, Machado *et al.* 2005b, Walter *et al.* 2005). Algumas espécies mostraram-se capazes de degradar esse clorofenol enquanto secretaram lacase e/ou MnP em meio de cultura ligninolítico (Reddy & Gold 2000, Ullah *et al.* 2000a, Leontievsky *et al.* 2001, Pointing 2001, Rodríguez *et al.* 2004).

1.7. Inóculo Fúngico

A pesquisa em biotecnologia com fungos tem focado a produção de enzimas, metabólitos, esporos, além da aplicação da fermentação em muitos substratos sólidos diferentes, como resíduos da agricultura combinados com diferentes fungos. O cultivo de fungos em substrato sólido para produção de inóculo e outras finalidades, aproxima-se das condições do crescimento dos fungos filamentosos em ambiente natural e vem sendo muito estudada para aplicação em processos de biorremediação de solos (Gowthaman *et al.* 2001, Matheus *et al.* 2003, Hölker *et al.* 2004, Marcial *et al.* 2006).

A produção de inóculo fúngico, em larga escala, para estudos de biorremediação, utiliza a tecnologia de cultivo de cogumelos comestíveis (Bononi 1997). Entretanto, para o cultivo em grande escala se faz necessário o uso de processamento industrial, que é dificultado pelas engenharias de processo, devido ao aumento de temperatura, variações de pH e O₂, bem como variações no substrato e gradientes de mistura (Gowthaman *et al.* 2001, Lamar & White 2001).

1.7.1. Tipos de preparo de inóculo

O inóculo pode ser preparado *off site* e ser transportado para o local de tratamento, parcialmente ou totalmente colonizado. Os substratos ainda podem ser levados para o local e usados para produção do inóculo no local de interesse (*on site*). A produção do inóculo *off site* necessita de muitos cuidados para minimizar a perda do potencial biológico do inóculo durante o transporte para o local a ser utilizado. Por outro lado, a produção de inóculo *on site* pode ser extremamente dificultosa, já que as áreas contaminadas são geralmente localizadas em áreas de atividade industrial, com uma grande quantidade de contaminantes microbianos, o que dificulta a pasteurização dos substratos (Lamar & White 2001).

Em muitos casos, faz-se necessária produção comercial do inóculo *off site* e, para que haja sucesso na comercialização desse inóculo fúngico, a relação custo-benefício precisa ser favorável, a produção uniforme, além de uma aplicabilidade rápida em seu uso final (Lamar & White 2001, Schmidt *et al.* 2005).

1.7.2. Materiais lignocelulósicos utilizados como substrato

Ao escolher o substrato para produção de inóculo a ser utilizado em biorremediação, um fator importante a ser considerado é o efeito desse substrato na fisiologia do fungo em relação à degradação do xenobiótico (Lamar & White 2001). Uma grande variedade de materiais lignocelulósicos é utilizada para suportar o crescimento de fungos de podridão branca, tais como: palha, grãos enriquecidos com nutrientes misturados à serragem, polpa de beterraba, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Esse último, por exemplo, pode ser diretamente inoculado com o fungo ou composto para cogumelos colonizado com o micélio fúngico. Além disso, muitos materiais lignocelulósicos, descartados como resíduos por indústrias florestais, agrícolas e papelreira, podem ser usados na aceleração natural da degradação, favorecendo o reaproveitamento destes materiais e o não acúmulo de tais resíduos no ambiente (Lamar & White 2001, Pointing 2001, Krishna 2005).

Um dos maiores resíduos celulósicos agro-industriais é o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo fibroso de sobras do talo da cana-de-açúcar, após extração do suco. Consiste de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Quimicamente, esse resíduo contém cerca de 50% de α -celulose, 30% de pentoses e 2,4% de minerais. Na fermentação sólida com bagaço de cana-de-açúcar, esse substrato pode ser utilizado como fonte de carbono (energia) ou apenas como um suporte sólido inerte (Pandey *et al.* 2000).

Nos últimos anos, um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, está sendo utilizado em cultivo no bagaço de cana-de-açúcar. Fungos filamentosos,

especialmente os basidiomicetos foram empregados nesse tipo de cultivo, como *Lentinus crinitus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Psilocybe castanella*, *Trametes villosa*, entre outros (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Bononi 2002, Matheus *et al.* 2003, Dzul-Puc *et al.* 2005, Ballaminut & Matheus 2006, Compart *et al.* 2006). O bagaço de cana-de-açúcar pode também ser empregado como suplemento em meios para crescimento de fungos de podridão branca estimulando a produção de enzimas ligninolíticas (Pandey *et al.* 2000, Arora & Gill 2001).

1.7.3. Relação C/N do substrato

As condições de limitação de nitrogênio são naturais para os fungos de podridão branca, pois a madeira é pobre neste nutriente. Além disso, a degradação de diversos grupos de compostos por basidiomicetos, tem mostrado ser dependente do sistema que degrada lignina, que em alguns microrganismos é expresso sob condições limitantes de nutrientes (carbono, nitrogênio ou enxofre). Isso é observado em *P. chrysosporium*, onde o mecanismo que degrada a lignina ocorre durante a idiofase (metabolismo secundário), sendo desencadeado pela limitação desses nutrientes (Reddy *et al.* 1998, Reddy & Gold 2000). Assim sendo, a relação C/N do substrato utilizado como suporte para o inóculo tem papel significativo na degradação de poluentes por fungos de podridão branca (Lamar & White, 2001).

Suplementação de nitrogênio, como adição de farinha de cereais, por exemplo, pode ser feita nos substratos e dependendo do fungo estudado, podendo melhorar seu crescimento (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Bononi 2002, Matheus *et al.* 2003, Silva *et al.* 2005). Matheus & Bononi (2002) em um estudo dirigido às relações C/N do substrato utilizado para *P. castanella* e *L. crinitus*, mostraram que a suplementação do bagaço de cana-de-açúcar com farinha de soja e adição de óleo vegetal em níveis adequados interferiu, em alguns casos de forma positiva, na mineralização de ¹⁴C-hexaclorobenzeno por esses fungos.

Outros trabalhos mostraram a influência da relação C/N do substrato de crescimento na degradação de poluentes por fungos. Walter *et al.* (2004), por exemplo, avaliando o potencial biológico e a remoção do pentaclorofenol de solo, por fungos de podridão branca nativos da Nova Zelândia, constataram que houve influência da relação C/N nesses dois fatores. Esses autores observaram o melhor potencial biológico do inóculo em substrato com relação C/N 50:1 e maior remoção de pentaclorofenol com relação C/N 309:1.

1.7.4. Características dos inóculos fúngicos

Autores como Schmidt *et al.* (2005) afirmam que as propriedades do inóculo podem influenciar no crescimento fúngico em processos de biorremediação e observaram nesse estudo que o crescimento de três isolados de *Trametes versicolor*, em solo, foi dependente não só da composição do substrato utilizado para produzir o inóculo, como também da idade do inóculo utilizado no momento da inoculação em solo.

A colonização do substrato é um ponto importante na biorremediação utilizando fungos de podridão branca. Em geral ainda não existe um método quantitativo que determine quando o inóculo está em seu maior potencial para aplicação em sistemas de tratamento (Lamar & White 2001). Atualmente o inóculo, preparado em massas de substrato, é analisado experimentalmente, ou considerado como pronto para aplicação em remediação quando o substrato parece estar totalmente colonizado, avaliado de forma visual (Lamar & White 2001).

1.8. Basidiomicetos na biorremediação de solos contaminados da Baixada Santista

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, foram selecionados e isolados

fungos basidiomicetos ligninolíticos com capacidade de tolerar e degradar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Dentre os fungos, *Lentinus crinitus* CCB274, família Polyporaceae, mostrou características interessantes para sistemas de biorremediação, como remoção e mineralização de poluentes organoclorados (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Bononi 2002). Matheus (2003) em estudo com este fungo, em escala de laboratório, pôde observar que *L. crinitus* mineralizou até 25% de ^{14}C -hexaclorobenzeno.

Estudos de aperfeiçoamento de produção e do processo de incorporação do inóculo ao solo foram feitos em escala de laboratório, onde foram elaborados suportes cerâmicos para o cultivo do inóculo com *Psilocybe castanella* (Compart *et al.* 2006). Entretanto, inóculos utilizados em tratamentos com escala piloto, ainda não possuem padrão qualitativo de avaliação para que possam ser aperfeiçoados.

Apesar do aumento no número de publicações científicas relacionadas com crescimento de basidiomicetos em substrato sólido para esse fim (Matheus *et al.* 2003, Hölker *et al.* 2004), ainda não se dispõe de um conjunto de dados sobre a fisiologia destes organismos que permitam estabelecer padrões para utilização de inóculos em processos de biorremediação (Lamar & White 2001). Faz-se necessário então o estudo da fisiologia desses fungos, quando cultivados para produção de inóculos.

2. OBJETIVOS

Na busca de aperfeiçoamento da produção de inóculo de basidiomicetos para aplicação em biorremediação de solo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a melhor condição fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* CCB274 para degradação de compostos poluentes.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar o crescimento de *L. crinitus* em substrato sólido, avaliando a colonização do substrato por estimativa de biomassa;
- Determinar o crescimento de *L. crinitus* em solo contaminado, avaliando a colonização do solo por análise visual;
- Determinar a cinética de produção das atividades enzimáticas: peroxidases totais, peroxidase dependente do manganês, lacase, presentes durante o crescimento de *L. crinitus* em substrato sólido e após sua inoculação em solo contaminado;
- Determinar a atividade de descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) durante o crescimento de *L. crinitus* após sua inoculação em solo contaminado;
- Comparar inóculos de *L. crinitus* em diferentes tempos de cultivo, avaliando a produção enzimática em solo e a melhor idade fisiológica para sua atuação na degradação de pentaclorofenol presente em solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Foi utilizado o basidiomiceto *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 pertencente à Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica, IBt, São Paulo. 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 de solo contaminado (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005b). Essa linhagem vem sendo estudada em sistemas de biorremediação e foi citado por outros autores como *Lentinus zeyheri* CCB 274 (Matheus *et al.* 2000, Matheus *et al.* 2001, Matheus & Bononi 2002, Matheus 2003). A cultura foi mantida a 4° C em ágar extrato malte (MEA 2%), constituído de: extrato de malte 2 %, peptona 0,1 % e ágar 1,5 %. A Figura 1 mostra basidiomas de *L. crinitus* CCB274 frutificados em bagaço de cana-de-açúcar.



FIGURA 1: *Lentinus crinitus* CCB274 cultivado e frutificado em bagaço de cana-de-açúcar (suplementado C/N 180), laboratório de Micologia, Instituto de Botânica (Foto: Marina Capelari, 2002).

3.2. Preparo do inóculo

3.2.1. Pré inóculo

O fungo foi previamente crescido em placas de Petri contendo MEA 2 %, a 28° C, (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 previamente esterilizado e resfriado à temperatura ambiente (Ballaminut & Matheus 2006), na proporção de 1:10 (disco : g de substrato úmido), sob condições assépticas.

3.2.2. Formulação dos Substratos

O substrato foi constituído de bagaço de cana-de-açúcar picado misturado com farinha de soja e amido solúvel nas proporções adequadas para se obter relação C/N 90 e umidade ajustada para 70 % com água destilada (Matheus & Bononi 2002). Para que a relação C/N 90 fosse respeitada foram feitas determinações de carbono e nitrogênio dos constituintes utilizados no substrato. Para se obter a relação C/N 90 as quantidades de cada componente da mistura foram calculadas através da seguinte expressão, de acordo com Matheus (2003):

$$b = \frac{Q(C/N.Ns - Cs)}{C/N(Ns - Nb) + Cb - Cs}$$

$$s = Q - b$$

Onde:

Q = quantidade de substrato que se deseja produzir (peso seco)

b = quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (peso seco)

s = quantidade de suplemento do substrato (peso seco)

C/N = relação carbono/nitrogênio que se deseja obter no substrato (90)

Cb = porcentagem determinada de carbono orgânico total do bagaço de cana-de-açúcar (% peso seco)

Nb = porcentagem determinada de nitrogênio total do bagaço de cana-de-açúcar (% peso seco)

Cs = porcentagem determinada de carbono orgânico total do suplemento (% peso seco)

Ns = porcentagem determinada de nitrogênio total do suplemento (% peso seco)

3.2.2.1. Determinação do Carbono Orgânico

A determinação de carbono orgânico foi feita segundo método descrito por Kiehl (1985), no qual a matéria orgânica foi oxidada por uma mistura sulfo-crômica em uma reação exotérmica de bicromato de potássio e ácido sulfúrico. O excesso de agente oxidante, resultante da reação, foi determinado por titulação com sulfato ferroso.

Reagentes:

- Solução de bicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) 1 N,
- Ácido fosfórico a 85 %,
- Solução de difenilamina (0,5 g de difenilamina em 20 mL de água e 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado),
- Solução de sulfato ferroso 1 N (recém preparada).

Alíquotas de 0,2 g secas de cada substrato foram transferidas para frascos erlenmeyer de 500 mL, onde foram adicionados 20 mL de solução de bicromato de potássio e 40 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação por 1 min e repouso de 30 min, foram adicionados 200 mL de água destilada, 10 mL de ácido fosfórico e 1 mL solução de difenilamina. O excesso de oxidante foi titulado com solução de sulfato ferroso até ponto de viragem, que vai da cor púrpura para o verde.

O cálculo estequiométrico da porcentagem de carbono orgânico foi feito com a seguinte fórmula:

$$C\% = \frac{(V1 - V2) \times 0,003 \times 74,15}{p}$$

onde:

$C\%$ = porcentagem de carbono orgânico,

$V1$ = volume (mL) de bicromato de potássio adicionado na amostra,

V_2 = volume (mL) de sulfato ferroso gasto na titulação,

p = peso seco da alíquota (g).

3.2.2.2. Determinação do Nitrogênio Total

A determinação do nitrogênio total foi feita de acordo com Kiehl (1985), onde foi realizada digestão ácida da amostra, na presença de catalisadores, seguida de destilação do sulfato de amônio formado em meio alcalino.

3.2.2.2.1. Digestão ácida

Reagentes da mistura de digestão:

- 350 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 %,
- 14 g de sulfato de lítio monohidratado ($LiSO_4 \cdot H_2O$),
- 0,42 g de selênio em pó,
- 420 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado.

Preparo da mistura de digestão:

Todos os reagentes foram misturados em Becker de 2000 mL, exceto o ácido sulfúrico, que foi adicionado cuidadosamente, resfriando em banho de gelo.

Foram pesados 0,27 g de amostra seca de cada substrato em tubo de digestão de 100 mL, onde foram acrescentados 8 mL da mistura de digestão fria. Os tubos foram levados para um bloco de digestão (MOD 40-25) e aquecidos lentamente até 350° C. Nos primeiros 15 min de reação as amostras ficaram claras e transparentes, escurecendo em seguida e voltando a clarear quando a temperatura atingiu os 350° C. A digestão continuou por mais 30 min a partir daí. Após

resfriamento até temperatura ambiente o volume do tubo foi completado com água destilada até aproximadamente 25 mL.

3.2.2.2. Destilação

Reagentes:

- 10 mL de solução de ácido bórico (H_3BO_3) 10 %,
- 2 gotas de indicador misto (0,5 % de verde de bromo cresol + 0,1 % de vermelho de metila, 95 % de diluídos em etanol),
- 15 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 18 N
- Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,05 N, padronizado com hidróxido de sódio previamente padronizado.

O sistema de destilação foi aquecido até aproximadamente 100° C. Um frasco erlenmeyer de 150 mL, contendo 10 mL da solução de ácido bórico e 2 gotas do indicador misto foi colocado à saída do destilador (TECNAL / TE-036/1). O tubo contendo a amostra digerida foi acoplado à entrada do destilador, onde foram adicionados 15 mL de solução de hidróxido de sódio (18 N). A amostra foi destilada até que a amônia formada fosse transferida para a solução receptora de ácido bórico, triplicando o seu volume. Após a destilação, a amostra foi titulada com solução de ácido clorídrico padronizado.

3.2.3. Substrato sólido

Aliquotas de 100 g de substrato sólido foram colocadas em potes com capacidade de 900 mL, em triplicata. Em seguida foram autoclavados por 90 min a 121° C (Ballaminut & Matheus,

2006). Após resfriamento, discos de crescimento micelial do fungo foram inoculados nos potes em condições assépticas.

Os inóculos foram incubados em estufa incubadora (ELETROLAB / 101 STD) sob controle de temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$, durante até 70 dias (Figura 2). Foram determinados: proteínas totais e atividades enzimáticas até os 40 dias de incubação e aumento de biomassa (estimado por ergosterol) até 70 dias de incubação, periodicamente, aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 e 70 dias.



FIGURA 2: Inóculo de *Lentinus crinitus* CCB274 (*L. crinitus* crescendo em bagaço de cana-de-açúcar suplementado C/N 90 - Foto: Marina Bianchini de Salvi, 2005).

3.2.4. Inóculo para aplicação em solo

Após caracterização fisiológica do inóculo de *L. crinitus* CCB274, foram escolhidos diferentes tempos de incubação, de acordo com a máxima produção de atividades enzimáticas e aumento de biomassa em substrato sólido, para aplicação em solo contaminado artificialmente com pentaclorofenol.

O inóculo fúngico foi preparado em massas de 10 g de substrato sólido colonizado com o fungo por diferentes períodos de incubação, para posterior aplicação em solo contaminado. Foram utilizados substratos sólidos colonizados com o fungo com 5, 10, 15 e 20 dias de incubação, que foram inoculados em mistura de solo e gesso comercial, contaminado com pentaclorofenol.

Quando o inóculo com 5 dias de incubação foi inoculado em solo esse tratamento denominou-se tratamento 5 (T5). Os demais tempos de incubação foram denominados da mesma maneira: inóculo com 10 dias de incubação = T10, 15 dias de incubação = T15 e 20 dias de incubação = T20.

3.3. Cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol

Estudos anteriores com a mesma linhagem de *L. crinitus*, também aplicado em biorremediação de solos contaminados, utilizaram concentrações de compostos organoclorados maiores que 200 ppm e observaram que ao final de 60 dias de incubação os poluentes testados ainda não haviam sido degradados totalmente (Matheus *et al.* 2000, Matheus 2003). Isso indicou possibilidade de utilização de concentrações mais baixas para estudos de laboratório. Os ensaios de degradação aqui desenvolvidos utilizaram solo que foi contaminado artificialmente com 200 ppm de pentaclorofenol, para evitar problemas ambientais com a geração e o acúmulo de resíduos tóxicos.

À mistura foram adicionados 2,5 % de gesso comercial e homogeneizado manualmente por 30 min. Foram adicionados 200 g de pentaclorofenol P.A. Kg⁻¹ de solo e homogeneizados manualmente por 15 min. Foram separadas 5 alíquotas de 3 g para posterior determinação da quantidade de pentaclorofenol presente no solo inicialmente.

O solo contaminado foi acondicionado em saco plástico de polipropileno e levado para esterilização química em câmara vedada, substituindo-se a atmosfera interna por brometo de metila, durante 48 horas, de acordo com Moreira-Neto (2006).

O sistema de cultivo foi acondicionado em potes de tampa hermética com capacidade de 250 mL e fechados com gaze esterilizada na boca, para permitir trocas gasosas, onde foram colocados: 30 g de solo contaminado com pentaclorofenol (base seca) e 5 % de emulsão de óleo vegetal e Tween 20 (9 : 1, p.p.). O inóculo foi usado na proporção de 10 % de massa seca da mistura, seguido de homogeneização. Foram adicionados 15 % água destilada estéril, respeitando os 50 % da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) (Figura 3). A incubação foi feita a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ com correção de umidade semanal, feita pela adição de água destilada esterilizada, de acordo com a perda de peso dos frascos (Matheus 2003). Como controle foram utilizados solos nas mesmas condições, acrescidos de substrato sólido sem fungo.

Foram determinadas: análise visual da colonização do solo, as atividades enzimáticas e quantificação de proteínas totais nos tempos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias, além das quantidades remanescentes de pentaclorofenol presentes no solo aos 5, 15, 30 e 60 dias de incubação.



FIGURA 3: *Lentinus crinitus* CCB274 no cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol (Foto: Marina Bianchini de Salvi, 2006).

3.4. Atividades enzimáticas

3.4.1. Obtenção do extrato enzimático

3.4.1.1. Extrato enzimático do substrato sólido

O extrato enzimático bruto proveniente do cultivo em substrato sólido 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 papel de filtro e centrifugado a 10000 rpm por 10 min (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R). O sobrenadante recuperado foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas e proteínas totais.

3.4.1.2. Extrato enzimático do solo

O extrato enzimático bruto proveniente de cultivo em solo foi obtido como o descrito acima (item 3.4.1.1), no entanto o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur seguido de filtração em membrana Millipore de 0.45 µm (Moreira-Neto 2006 modificado).

3.4.2. Quantificação de Proteínas

Foram quantificadas proteínas totais em extratos obtidos do cultivo em solo, segundo o método de Bradford (1976). Em tubo de ensaio, 2,5 mL do reagente de Bradford (azul brilhante de Cromassie G250) foram adicionados a 50 µL de amostra e incubados por 5 min. Em seguida foi

determinada a absorbância da amostra em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A quantificação da proteína presente na amostra foi tendo albumina bovina como padrão (Anexo 1).

3.4.3. Atividades enzimáticas no extrato obtido de substrato sólido

3.4.3.1. 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 ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 10 min, em espectrofotômetro (HITACHI / U – 2001), segundo método descrito por Machado & Matheus (2006). A mistura de reação em 1 mL continha: 250 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50 μL de solução de peróxido de hidrogênio 2 mM; 100 μL de solução de ABTS 5 mM e 600 μL de extrato enzimático. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de ABTS por minuto.

3.4.3.2. Lacase

Antes da determinação de lacase foi realizado teste para detecção da presença de peróxido de hidrogênio nos extratos, segundo Machado & Matheus (2006), onde a reação em 1 mL continha: 250 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50 μL de solução de horseradish-peroxidase (17,5 U L^{-1}); 100 μL de solução de ABTS 5 mM e 600 μL de extrato enzimático. Foi feita leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm durante 10 min. Não sendo detectado peróxido de hidrogênio nos extratos enzimáticos, a determinação de atividade de lacase foi feita sem necessidade de remoção do peróxido de hidrogênio da amostra.

A mistura de reação para determinação da atividade de lacase continha em 1 mL: 250 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50 μL de água MilliQ; 100 μL de solução de ABTS 5 mM e

600 µL de extrato enzimático, de acordo com Machado & Matheus (2006). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µMol de ABTS por minuto.

3.4.3.3. Peroxidases

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

3.4.3.4. Peroxidase dependente do manganês (MnP)

Foi determinada de acordo com o descrito por Kuwahara *et al.* (1984). A reação (em 1 mL) constituiu de: 300 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 µL de solução de sulfato de manganês 2 mM, 100 µL de solução de vermelho de fenol 0,1 %, 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500 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 µL de solução de hidróxido de sódio 2 N. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 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.

3.4.4. Atividades enzimáticas no extrato obtido de solo

Foram determinadas oxidação total do ABTS, atividade de peroxidases, lacase e MnP, de acordo com o descrito acima (item 3.4.3.) para substrato sólido. Além das atividades citadas, foi

determinada também a atividade enzimática de descoloração do Azul Brilhante de Remazol R (RBBR).

3.4.4.1. Atividade de descoloração do RBBR

Essa atividade enzimática foi determinada pela descoloração do RBBR, observada pela variação de absorbância a 592 nm, segundo Machado & Matheus (2006). A mistura da reação continha em 1 mL: 250 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0; 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio 2 mM; 100 µL de solução de RBBR 0,02 % e 600 µL de extrato enzimático. A reação foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, seguida de leitura em espectrofotômetro a 592 nm. Uma unidade de atividade de descoloração foi definida como aquela capaz de reduzir 0,01 na absorbância por min, usando como controle extrato enzimático inativado por calor (fervura, 10 min).

3.5. Avaliação do crescimento fúngico

3.5.1. Crescimento fúngico no substrato sólido

O crescimento fúngico em substrato sólido foi determinado pelo aumento da biomassa estimada pela quantidade de ergosterol extraído do inóculo, de acordo com o descrito por Silva (2004).

Foram congeladas alíquotas de 5 g de cada amostra e posteriormente liofilizados por 48 horas (THERMO SAVANT – Mod. Modulyod). As amostras foram transferidas para frascos tipo Scoth, onde foram adicionados 26 mL de solução de saponificação, composta de 20 mL de álcool metílico P.A., 5 mL de álcool etílico P.A. e 2 g de hidróxido de potássio.

As amostras foram agitadas em mesa agitadora a 250 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 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 2 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 ressuspensa em metanol CLAE (MERCK MX 0488-1) e armazenada em tubos eppendorf de 2 mL de capacidade para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, VARIAN – Varian ProStar 215).

3.5.1.1. Determinação de ergosterol

Aliquotas 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 mL min⁻¹.

O tempo de retenção do ergosterol na coluna cromatográfica foi entre 6,4 e 6,5 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. Foram feitas 5 injeções de cada diluição dos padrões para determinar os pontos da curva padrão. As quantidades de ergosterol encontradas foram correlacionadas por

análise de regressão linear, determinando a equação da regressão e o respectivo coeficiente de correlação linear. (Anexo 2).

3.5.2. Crescimento fúngico em solo

Para determinação do crescimento fúngico em solo foi feita análise visual da colonização do solo pelo fungo por atribuição de notas (Machado *et al.* 2006). Para cada faixa de porcentagem de colonização foi arbitrado um valor, de acordo com a Tabela 1. Esta análise foi julgada por seis observadores, de maneira imparcial, a fim de se obter a somatória das notas para cada tempo de incubação, nos diferentes tratamentos (Ballaminut & Matheus 2006).

TABELA 1: Critério de avaliação visual de colonização do substrato

<i>Notas</i>	<i>Soma de notas</i>	<i>% de colonização do solo</i>
1	1 – 3,9	0 -20 %
2	4 – 6,9	20 -40 %
3	7 – 9,9	40 -60 %
4	10 – 12,9	60 -80 %
5	13 - 15	80 -100 %

Notas = notas atribuídas por cada observador; Soma de notas = média das somas das notas atribuídas às triplicatas.

3.6. Determinação da degradação de pentaclorofenol no solo

Depois da incubação dos tratamentos e controles, os solos contaminados com pentaclorofenol foram congelados após a extração dos extratos enzimáticos.

3.6.1. Determinação de peso seco dos solos tratados

Para a quantificação de pentaclorofenol remanescente no solo foi utilizado como referência o peso seco da amostra. Foram retiradas alíquotas de $3,0 \pm 0,5$ g do conteúdo homogeneizado do frasco de amostra para determinação de peso seco, realizado em termo-balança (MARTE, mod. ID50) a 105°C por 20 min.

3.6.2. Extração e quantificação do pentaclorofenol dos solos tratados

Foi retirada alíquota de $3,0 \pm 0,1$ g do conteúdo homogeneizado de cada frasco dos tratamentos para extração do pentaclorofenol remanescente no solo. A extração feita em microondas (Andréa *et al.* 2001 modificado), consistiu de alíquotas que foram colocadas em frascos de 24 x 65 mm com capacidade de 20 mL, com tampa de rosca e batoque onde foram adicionados 10 mL de metanol P.A. Os frascos foram aquecidos em forno de microondas por 16 ciclos de 20 segundos, a 270 watts de potência intercalado por banhos de gelo para evitar a fervura e a perda da amostra por volatilização. Após resfriamento o solvente foi removido com auxílio de pipeta Pasteur e o volume anotado. Em seguida foi retirado 1 mL de cada amostra que foram diluídas (1 : 2) em metanol CLAE, filtradas em membrana Millipore $0,45\ \mu\text{m}$ e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Alíquotas do extrato contendo pentaclorofenol foram injetadas manualmente no CLAE (Cromatógrafo Varian ProStar 215). Para a separação do pentaclorofenol foi utilizada uma coluna de fase reversa Hipersyl 4,6 x 250 mm, com R - Sil C - 18 ($10\ \mu\text{m}$) com uma fase móvel de acetonitrila : água : ácido acético (75 : 25 : 0,125) e taxa de fluxo de $0,9\ \text{mL min}^{-1}$. A detecção do pentaclorofenol foi em comprimento de onda de 254 nm e o tempo de retenção na coluna cromatográfica foi entre 7 e 7,4 min da injeção da amostra.

As quantidades de pentaclorofenol dos extratos foram estimadas com base em uma curva padrão estabelecida, construída com concentrações conhecidas de pentaclorofenol diluído em metanol CLAE. Foram feitas 3 injeções de cada diluição dos padrões para determinar os pontos da curva padrão. As quantidades de pentaclorofenol encontradas foram correlacionadas por análise de regressão linear, determinando a equação da regressão e o respectivo coeficiente de correlação linear (Anexo 3A).

3.6.2.1. Teste de solventes para a extração do pentaclorofenol

Antes da extração do pentaclorofenol dos tratamentos foi testada a eficácia de diferentes solventes para utilização na extração do pentaclorofenol, empregando apenas solo contaminado artificialmente (200 ppm). Foram feitas até 5 extrações consecutivas para que fosse determinado também o número de extrações necessárias para recuperação do pentaclorofenol presente no solo.

Foram testados os seguintes solventes: 1) acetona / hexano (25 : 75 v/v) em 3 extrações e também em 5 extrações consecutivas; 2) metanol P.A. em 3 extrações consecutivas. Em seguida as amostras teste foram evaporadas em rota-evaporador (QUIMIS Mod 344B1) a 40° C. O pentaclorofenol foi ressuspenso em 1 mL de metanol CLAE (MERCK MX 0488-1) e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas mesmas condições descritas acima (item 3.6.2), utilizando curva de concentrações conhecidas de pentaclorofenol (Anexo 3B).

Foi então testado metanol P.A. em 3 extrações consecutivas e o extrato obtido foi diluído em metanol CLAE (1 : 2) seguido de quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência nas mesmas condições descritas acima (item 3.6.2). A quantificação do pentaclorofenol teve como padrão uma curva de concentrações conhecidas (Anexo 3A).

3.6.2.2. Teste de eficiência do método de extração do pentaclorofenol

Após a escolha do solvente adequado foi feito teste de eficiência do método de extração, com 2 extrações consecutivas, utilizando solo contaminado com pentaclorofenol (200 ppm), substrato sólido não inoculado e todos os outros constituintes do sistema de cultivo descritos no item 3.3. Foram testadas diferentes combinações de tempos e de potências para extração do pentaclorofenol em forno microondas, de acordo com Andréa *et al.* 2001.

Alíquotas de $3,0 \pm 0,1$ g do sistema de cultivo utilizando substrato sólido não inoculado foram transferidas para frascos de 24 x 65 mm com capacidade de 20 mL, com tampa de rosca e batoque onde foram adicionados 10 mL de metanol P.A. Os frascos foram aquecidos em forno de microondas nas seguintes combinações de tempo e potência: por 16 ciclos de 60 segundos, a 180 watts de potência; por 16 ciclos de 20 segundos, a 180 watts de potência; por 16 ciclos de 20 segundos, a 270 watts de potência. A cada ciclo os frascos foram resfriados em banho de gelo para evitar a fervura e a perda da amostra por volatilização. Após resfriamento o solvente foi removido com auxílio de pipeta Pasteur e o volume anotado. Em seguida as amostras foram diluídas analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência nas mesmas condições cromatográficas descritas acima (item 3.6.2), o pentaclorofenol recuperado foi quantificado utilizando curva padrão de concentrações conhecidas de pentaclorofenol como padrão (Anexo 3A) e a eficiência foi calculada com base na quantidade conhecida de pentaclorofenol incorporado inicialmente ao solo.

3.7. Análise estatística dos dados

Os dados foram avaliados pelo programa estatístico MiniTab versão Release 14. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey sempre protegida por análise de variância (ANOVA) ($\alpha \leq 0,1$).

Os dados percentuais foram transformados na expressão a seguir, de acordo com Vieira e Hoffmann (1989).

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

Onde:

arcsen = arcoseno

valor % = valor percentual de pentaclorofenol recuperado

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividades enzimáticas e crescimento fúngico em substrato sólido (inóculo)

As determinações da produção de atividades enzimáticas e do aumento de biomassa, estimada por ergosterol, foram feitos para caracterização fisiológica do inóculo fúngico a ser utilizado na biodegradação de pentaclorofenol.

Atividades de peroxidases foram detectadas em extratos enzimáticos de *Lentinus crinitus* CCB274, cultivado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado até, pelo menos, 30 dias de incubação, com cerca de $2,50 \text{ U L}^{-1}$ e no máximo $0,09 \text{ U g}^{-1}$ de proteína (Figura 4A), não apresentando diferença significativa entre os tempos de incubação ($P = 0,081$). Atividades enzimáticas de lacase e de peroxidase dependente do manganês foram observadas nos primeiros dias de cultivo, sendo máxima aos 10 dias com $17,59 \text{ U L}^{-1}$ (cerca de $0,26 \text{ U g}^{-1}$ de proteína) e $53,09 \text{ U L}^{-1}$ (cerca de $0,77 \text{ U g}^{-1}$ de proteína), respectivamente (Figura 4B e 4C). Houve diferença altamente significativa da atividade de lacase ($P < 0,01$) e de MnP ($P < 0,01$), entre os tempos de incubação (Anexos 4, 5 e 6).

Foi observado aumento de biomassa de *L. crinitus* durante cultivo em substrato sólido, com diferença altamente significativa entre os tempos de incubação ($P < 0,01$). Foram observadas cerca de 75 mg de ergosterol g^{-1} de massa seca no 5º dia de incubação e cerca de 106 mg de ergosterol g^{-1} de massa seca entre 50º e o 70º dia de incubação (Figura 4D). No entanto, entre o 15º e o 20º dia houve diminuição da quantidade de ergosterol recuperada e esses dois tempos não apresentaram diferença significativa entre si ($P = 0,9109$) (Anexo 7). Essa diminuição também foi observada por Silva (2004) e Ballaminut & Matheus (2006) em culturas da mesma linhagem de *L. crinitus* e também *Psilocybe castanella* CCB444, sendo associada pelos autores às variações na taxa de ergosterol durante crescimento dos fungos, que pode levar a uma subestimação da quantidade de biomassa estimada por este marcador bioquímico, nesta fase do crescimento.

Ao que parece, a síntese e distribuição de esteróis nas células de fungos variam com os estágios de crescimento. Como os esteróis livres estão relacionados com a estruturação das membranas plasmáticas dos fungos, no crescimento exponencial as divisões celulares ocorrem com muita frequência, por esta razão, o ergosterol é encontrado em maior proporção nessa fase do crescimento (Silva 2004).

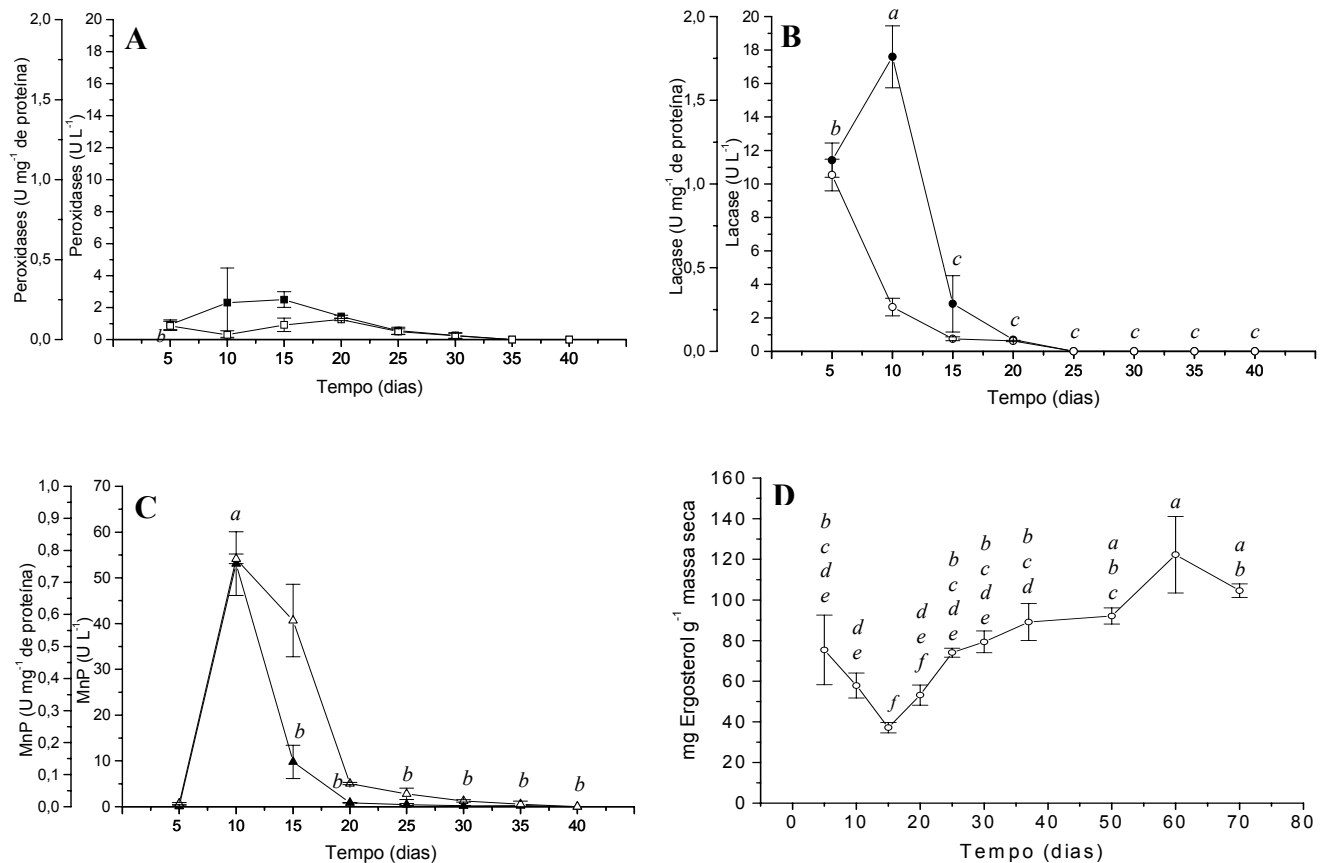


FIGURA 4: A: atividade enzimática (U L⁻¹) (■) e atividade específica (U mg⁻¹ de proteína) (□) de peroxidases, B: atividade enzimática (●) e atividade específica (○) de lacase e C: atividade enzimática (▲) e atividade específica (Δ) de MnP produzidas por *Lentinus crinitus* CCB274 durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar suplementado C/N 90; D: biomassa fúngica estimada por ergosterol (○) expressa em miligramas de ergosterol por gramas de biomassa seca (Barras de erro ± desvio médio. Letras diferentes indicam diferença estatística – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$).

Silva *et al.* (2005) também utilizaram esses mesmos parâmetros (atividade enzimática e determinação de biomassa por quantificação de ergosterol) para avaliar a idade fisiológica de *Lentinula edodes*, aplicado para cultivo em substrato sólido. Esses autores sugeriram que a correlação observada entre o crescimento fúngico e a produção enzimática pode ser um bom parâmetro para avaliar o período entre a inoculação do substrato e a frutificação.

Fungos da família Polyporaceae são conhecidos por produzir diferentes enzimas do sistema ligninolítico (Bending *et al.* 2002), como foi observado em *L. crinitus* CCB274, espécie pertencente a essa família.

Com a quantificação das atividades enzimáticas ligninolíticas, foi possível observar que a produção enzimática de *L. crinitus*, quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado C/N90, ocorre nos primeiros 20 dias de incubação. Ballaminut & Matheus (2006) em estudo com *P. castanella* e com a mesma linhagem de *L. crinitus*, cultivados também em bagaço de cana-de-açúcar suplementado, observaram maiores atividades enzimáticas na primeira quinzena de incubação para ambos os fungos.

A produção enzimática ligninolítica pode ocorrer durante o metabolismo primário, como observado também em outros basidiomicetos (Rodríguez *et al.* 2004, Moreira Neto 2006), diferente da produção de atividades enzimáticas em *Phanerochaete chrysosporium*, que está associada ao metabolismo secundário em cultura líquida (Reddy *et al.* 1998, Reddy & Gold 2000). Em estudo com *Fomes sclerodermeus*, cultivado em substrato sólido, Papinutti *et al.* (2003) puderam verificar que o aumento da atividade de MnP e de lacase ocorreu durante a tropofase, até os 18 dias, paralelamente ao crescimento, sugerindo que estas enzimas, produzidas por esse basidiomiceto, não são metabólitos secundários, mas parecem ser dependentes do crescimento. Vikineswary *et al.* (2006) em um estudo com *Pycnoporus sanguineus*, cultivado em substratos sólidos diferentes, também observaram atividade de lacase na primeira quinzena de incubação, em todos os substratos testados.

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.* 2006, Moreira-Neto 2006, Ballaminut & Matheus 2006). 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 2004).

4.2. Atividades enzimáticas e crescimento fúngico em solo

Com base nos resultados obtidos com o cultivo em substrato sólido, observou-se que o período favorável para a aplicação do inóculo de *L. crinitus*, em biorremediação, seria entre os primeiros 20 dias de incubação, já que nesse período foram observadas maiores produções de enzimas ligninolíticas, que podem estar envolvidas na degradação de xenobióticos. Por essa razão, foram escolhidos inóculos com idades fisiológicas próximas à idade de produção máxima de atividades enzimáticas: 5, 10 e 15 dias. Além dessas idades, foi utilizado também inóculo com 20 dias, tempo de cultivo utilizado atualmente para aplicação de inóculos fúngicos em biorremediação (Lamar & White 2001, Matheus *et al.* 2003, Machado *et al.* 2005b, Moreira-Neto 2006, Ballaminut & Matheus 2006). Os inóculos com diferentes idades foram aplicados em solo contaminado com pentaclorofenol, para os estudos de degradação, produção de atividades enzimáticas em solo na presença do poluente e análise da colonização do solo.

4.2.1 Atividades enzimáticas de peroxidases, lacase e peroxidase dependente do manganês (MnP)

Foram observadas atividades enzimáticas durante todo o período de cultivo de *L. crinitus* em solo contaminado. Na Figura 5 estão apresentadas atividades específicas de peroxidases, lacase, MnP e também atividade de descoloração do RBBR, observadas no tratamento 5 (T5). Atividade de peroxidases foi observada durante todo o período de cultivo, com cerca de 0,04 de atividade específica (U mg^{-1} de proteína), sem diferença significativa entre os tempos ($P = 0,326$) (Anexo 8A). A maior atividade de lacase foi observada no 25º dia com 0,56 de atividade específica, apresentando diferença altamente significativa desse tempo para os demais tempos ($P < 0,01$) (Anexo 9). Atividade de MnP foi observada durante todo período de cultivo, variando de 0,014 a 0,046 de atividade específica, sem diferença significativa do 5º ao 40º dia, período significativamente maior que as atividades do 50º e 60º dia ($P < 0,05$) (Anexo 10). Do 15º a 25º dia ocorreu maior descoloração do RBBR pelo sistema enzimático, sendo máxima de $9,7 \text{ U min}^{-1}$, com diferença significativa desses tempos para os demais tempos de cultivo ($P < 0,1$) (Anexo 11).

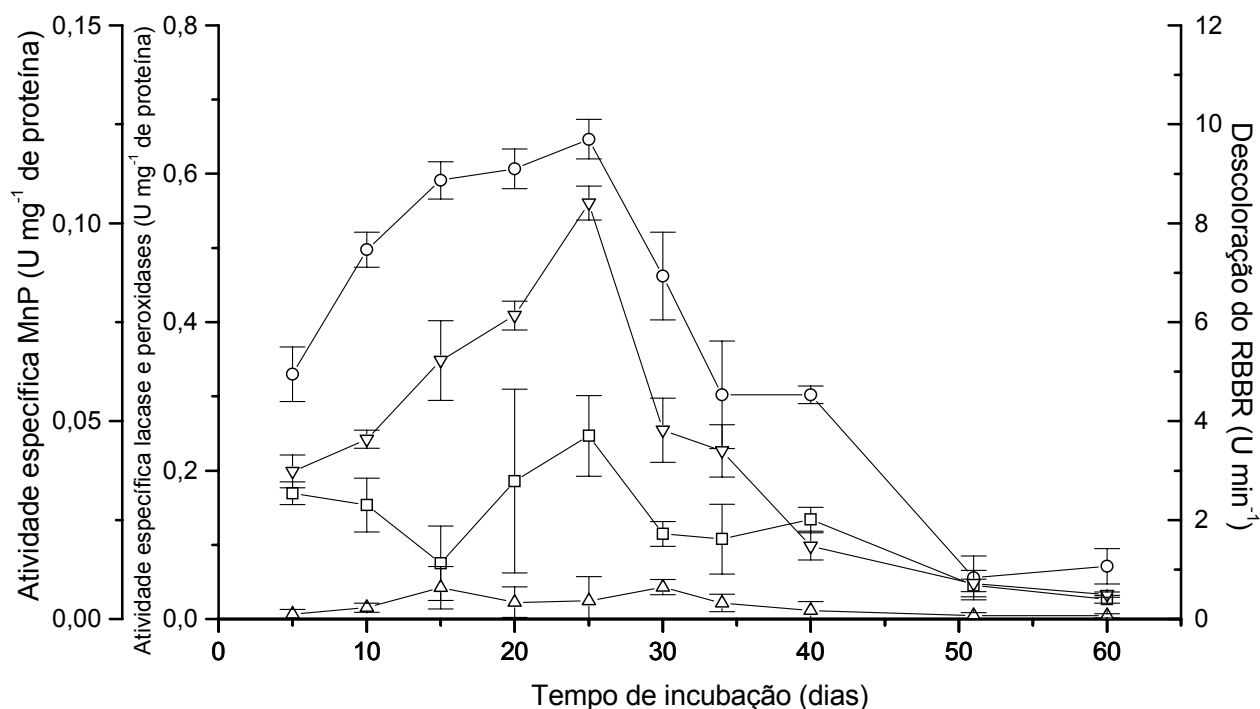


FIGURA 5: atividade específica de peroxidases (Δ), lacase (∇) e MnP ($\square$), atividade de descoloração do corante RBBR ($\circ$) pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCB274 (inóculo de 5 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol (Barras de erro $\pm$ desvio médio).

Na Figura 6 estão apresentadas atividades específicas de peroxidases, lacase, MnP e a descoloração do RBBR observadas no tratamento 10 (T10). Não houve diferença significativa entre os tempos de cultivo para a atividade de peroxidases produzida nesse tratamento ($P = 0,270$) (Anexo 8B), que foi de cerca de 0,05 de atividade específica. Do 20º ao 30º dia foi observada maior atividade de lacase, com até 0,57 de atividade específica (25º dia). Entre 25º e o 30º dia foi observada também maior atividade de MnP (cerca de 0,07 U mg⁻¹ de proteína). O sistema enzimático envolvido na oxidação do RBBR promoveu maior descoloração do corante entre o 15º e o 30º dia, com até 10,9 U min⁻¹. Houve diferença altamente significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,01$) para a atividade de lacase (Anexo 12), para atividade de MnP (Anexo 13) e para descoloração do RBBR (Anexo 14).

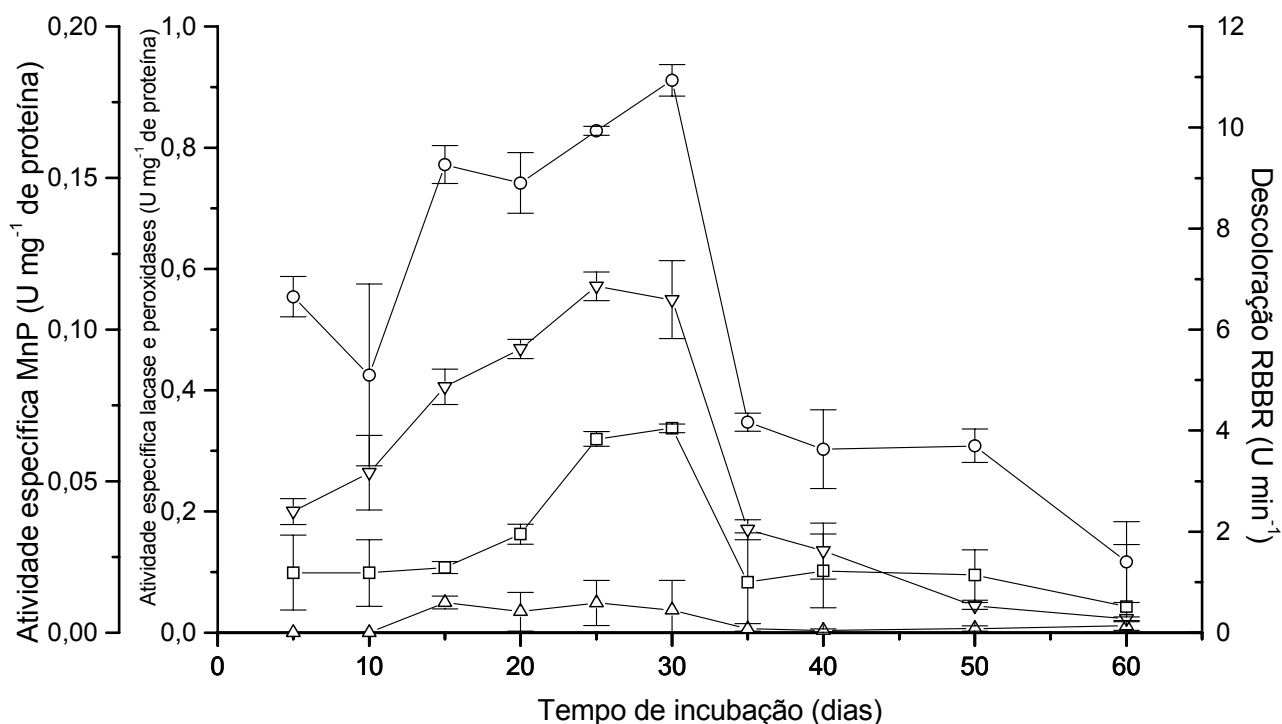


FIGURA 6: atividade específica de peroxidases (Δ), lacase (∇) e MnP ($\square$), atividade de descoloração do corante RBBR ($\circ$) pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCB274 (inóculo de 10 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol (Barras de erro $\pm$ desvio médio).

Na Figura 7 estão apresentadas atividades específicas detectadas no tratamento 15 (T15), o qual foi observada atividade de peroxidases durante todo o período de cultivo (cerca de $0,06 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína), sem diferença significativa entre os tempos ($P = 0,351$) (Anexo 8C). Entre 15º e o 35º dia de cultivo foi observada atividade máxima de lacase, com até $0,53$ de atividade específica e diferença altamente significativa entre os tempos ($P < 0,01$) (Anexo 15). Do 20º a 40º dia foi observada atividade máxima de MnP, com até $0,02$ de atividade específica e diferença significativa entre os tempos ($P = 0,004$) (Anexo 16), embora, com níveis muito menores que os observados nos tratamentos T5 e T10. Maior descoloração do RBBR ocorreu entre o 25º e o 35º dia, com até $13,7 \text{ U min}^{-1}$ e diferença altamente significativa entre os tempos ($P < 0,01$) (Anexo 17).

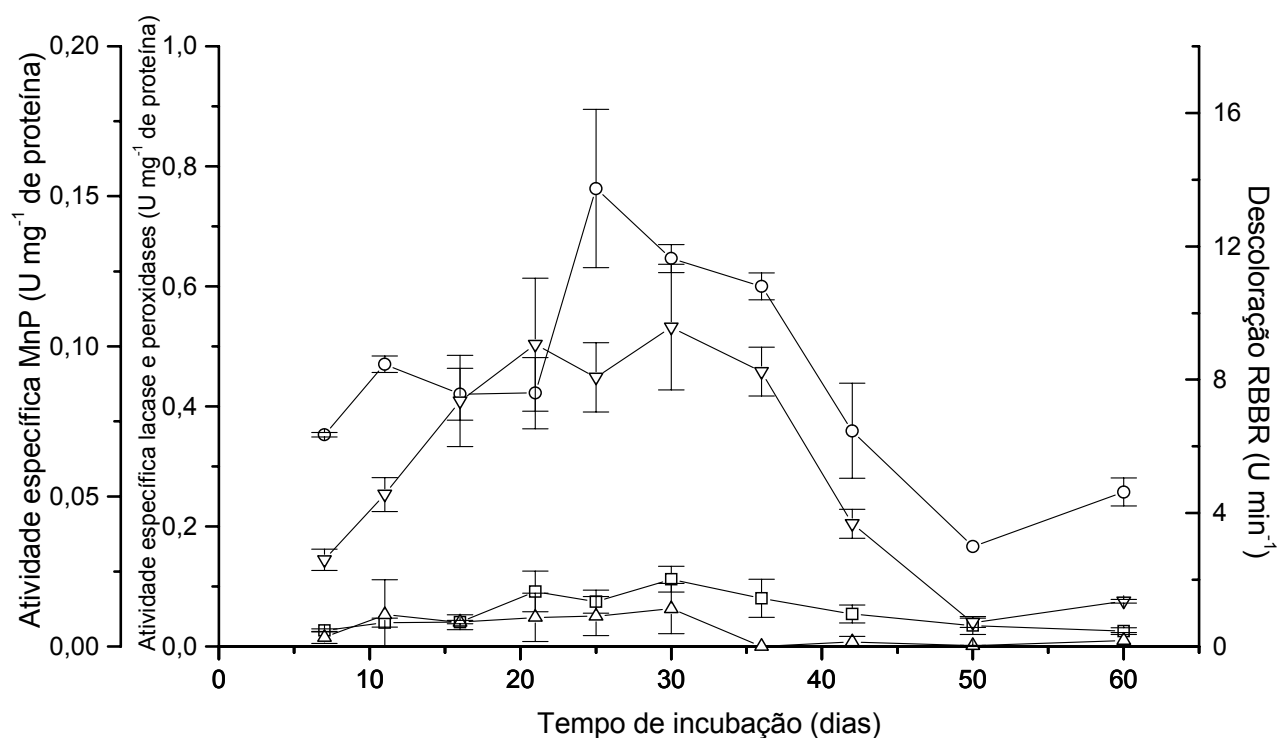


FIGURA 7: atividade específica de peroxidases (Δ), lacase (∇) e MnP ($\square$), atividade de descoloração do corante RBBR ($\circ$) pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCB274 (inóculo de 15 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol (Barras de erro $\pm$ desvio médio).

Na Figura 8 estão apresentadas atividades específicas observadas durante incubação no tratamento 20 (T20). Nesse tratamento foram detectadas peroxidases durante todo o período de cultivo (cerca de $0,04 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína) sem diferença significativa entre os tempos ($P = 0,290$) (Anexo 8D). Entre o 15º e o 35º dia foi observada maior atividade de lacase, com até 0,38 de atividade específica e diferença altamente significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,01$) (Anexo 18). Atividade de MnP foi observada durante quase todo período de cultivo com cerca de 0,006 de atividade específica e diferença significativa entre os tempos ($P = 0,043$) (Anexo 19), com níveis ainda menores que os observados nos tratamentos T5, T10 e T15. Do 5º ao 35º dia o sistema enzimático promoveu maior descoloração do RBBR, com até $8,50 \text{ U min}^{-1}$ e diferença altamente significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,01$) (Anexo 20).

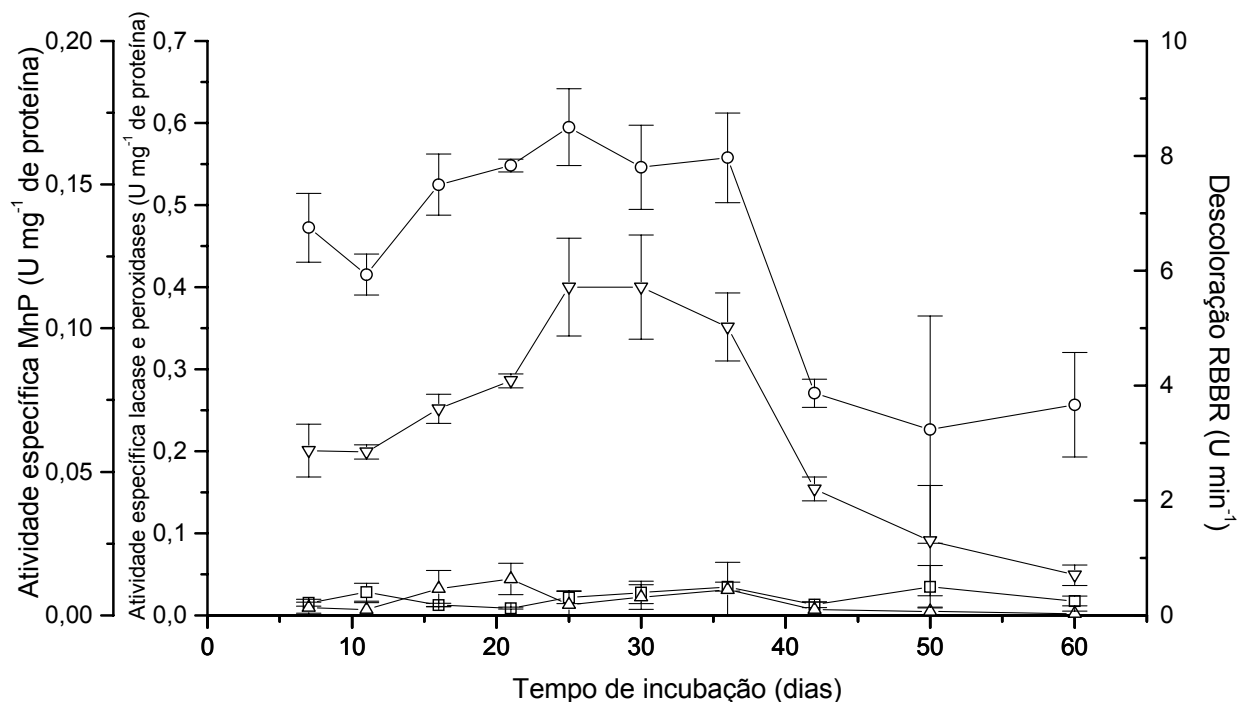


FIGURA 8: atividade específica de peroxidases (Δ), lacase (∇) e MnP ($\square$), atividade de descoloração do corante RBBR ($\circ$) pelo sistema enzimático de *Lentinus crinitus* CCB274 (inóculo de 20 dias) durante crescimento em solo contaminado com pentaclorofenol (Barras de erro $\pm$ desvio médio).

A capacidade de descoloração do RBBR foi observada durante cultivo de *L. crinitus* em solo. Os tempos de cultivo onde foram observadas maiores atividades de descoloração do RBBR também foram observadas maiores atividades de lacase e de MnP, sugerindo um grande potencial degradativo desse fungo.

Trabalhos anteriores de descoloração do RBBR, com a mesma linhagem de *L. crinitus*, sugeriram que esse basidiomiceto seria capaz de degradar xenobióticos durante o crescimento. Machado *et al.* (1998) observaram que essa linhagem de *L. crinitus*, família Polyporaceae, apresentou maior taxa de descoloração do RBBR do que *P. chrysosporium* (Phanerochaetaceae).

Essa capacidade em descolorir corantes sintéticos, utilizada como método de detecção da presença do sistema enzimático ligninolítico, também vem sendo associada à capacidade

degradativa de basidiomicetos por outros autores. Trupkin *et al.* (2003) em estudo com *Trametes trogii*, em culturas submersas, observaram que o filtrado bruto da cultura, com alta atividade enzimática e produção de peróxido de hidrogênio, foi capaz de descolorir os diferentes corantes testados. Palmieri *et al.* (2005) estudando a capacidade de descoloração do corante RBBR por *Pleurotus ostreatus*, em meio sólido e líquido, sugeriram correlação entre descoloração e detoxificação do corante, comentando a importância das propriedades enzimáticas desse fungo. Em ambos os estudos, os autores sugeriram a utilização desses fungos para biorremediação de efluentes têxteis, dado o grande potencial de descoloração desses basidiomicetos.

Além disso, estudos utilizando substratos sólidos também mostraram resultados significativos. Deveci *et al.* (2004) observaram descoloração do corante RBBR pelo extrato enzimático bruto de *Funalia trogi*, obtido durante crescimento em substrato sólido, a base de grão de trigo e resíduo de soja, e sugeriram que a lacase foi responsável pela atividade de descoloração do corante utilizado. Machado & Matheus (2006) avaliando o potencial de degradação do RBBR por extratos de *Pleurotus ostreatus*, obtidos de substratos sólidos colonizados, observaram degradação de altas concentrações desse corante e sugeriram que esse fungo poderia ser utilizado em processos de degradação de poluentes.

Ainda outros autores, como Vitali *et al.* (2006), estudando fungos filamentosos do gênero *Eupenicillium* observaram altas porcentagens de descoloração do corante RBBR pelas espécies estudadas. Testaram então essas espécies na degradação de ^{14}C -hexaclorobenzeno e observam redução de cerca de 24 %, mostrando também a possibilidade da utilização de fungos filamentosos em biorremediação, seguindo o mesmo critério de seleção usado com basidiomicetos.

A fim de detectar o período de maior atividade enzimática, as atividades de peroxidases, lacase, MnP (U L^{-1}) e atividade de descoloração do RBBR (U min^{-1}) produzidas em cada tratamento, foram comparadas entre os diferentes tempos de cultivo de *L. crinitus* em solo (Tukey, $P \leq 0,1$).

Não houve diferença significativa entre os tempos para as atividades de peroxidases em nenhum dos quatro tratamentos ($P > 0,1$) (Anexo 21A, 21B, 21C e 21D). No tratamento com inóculo de 5 dias a atividade de peroxidases foi máxima com $16,98 \text{ U L}^{-1}$, no tratamento com inóculo de 10 dias com $14,10 \text{ U L}^{-1}$, no tratamento com inóculo de 15 dias com $24,69 \text{ U L}^{-1}$ e no tratamento com inóculo de 20 dias com $16,17 \text{ U L}^{-1}$.

Na Tabela 2 estão apresentadas atividades enzimáticas de lacase de cada tratamento durante cultivo em solo. No tratamento 5 (T5) o período de maior produção de lacase foi observado entre o 20º e o 25º dia, sendo máxima de $181,80 \text{ U L}^{-1}$. No tratamento 10 (T10) o período de maior produção de lacase ficou isolado entre o 15º e o 30º dia, com até $150,32 \text{ U L}^{-1}$. No tratamento 15 (T15) o período de maior produção de lacase ficou isolado entre o 25º a 35º dia de cultivo, com no máximo $211,44 \text{ U L}^{-1}$. No tratamento 20 (T20) o pico enzimático ficou entre o 20º e o 35º dia, com no máximo $143,84 \text{ U L}^{-1}$. Houve diferença altamente significativa entre os tempos de cultivo para a atividade de lacase em todos os tratamentos ($P < 0,01$) (Anexos 22, 23, 24 e 25). O intervalo de tempo onde ocorreu maior produção da atividade de lacase parece não estar diretamente relacionado com a idade fisiológica do inóculo.

TABELA 2: Atividades de lacase produzidas nos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274 durante cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol.

Tempo (dias)	Tratamentos							
	T5		T10		T15		T20	
	U L ⁻¹	Tukey*	U L ⁻¹	Tukey*	U L ⁻¹	Tukey*	U L ⁻¹	Tukey*
5	54,5311	e, f, g	59,2640	e, f	47,6376	f	84,5747	c, d, e, f
10	64,6142	e, f, g	73,0511	e, f	86,0151	d, e, f	77,3724	c, d, e, f, g
15	132,7267	b, c	115,0298	a, b, c, d	119,8656	c, d, e	95,1079	b, c, d, e
20	155,5680	a, b	122,2320	a, b, c	138,1283	c, d	104,5608	a, b, c, d
25	181,8047	a	146,6167	a, b	211,4367	a	141,6780	a, b
30	98,1560	d	150,3207	a	208,3500	a, b	143,8387	a
35	71,8164	d, e	53,0907	e, f, g	179,6440	a, b, c	121,1517	a, b, c
40	30,7895	g, h	42,2873	e, f, g, h	83,0313	d, e, f	50,6213	e, f, g, h
50	15,4128	h	16,1021	g, h	18,3142	f, g	35,0337	g, h
60	10,9577	h	9,8773	h	30,0950	f, g	18,5200	h

* Letras iguais indicam igualdade estatística por coluna – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$. Partes amarelas indicam períodos de maiores atividades de lacase. T5 = inóculo com 5 dias de incubação, T10 = inóculo com 10 dias de incubação, T15 = inóculo com 15 dias de incubação, T20 = inóculo com 20 dias de incubação.

Na tabela 3 estão apresentadas as atividades de MnP produzidas pelos quatro tratamentos, durante cultivo em solo. No tratamento 5 (T5), o intervalo de tempo onde foi observada maior atividade de MnP, ficou entre o 20º e o 25º dia, com no máximo 14,84 U L⁻¹. No tratamento 10 (T10) o pico enzimático ficou entre o 25º e o 30º dia, com no máximo 18,44 U L⁻¹. O intervalo de maior produção dessa atividade enzimática para o tratamento 15 (T15) foi entre o 20º e o 40º dia, com no máximo 8,79 U L⁻¹ e para o tratamento 20 (T20) não houve período definido, já que a produção dessa atividade enzimática foi observada em quantidades baixas durante todo o cultivo em solo, com no máximo 4,98 U L⁻¹. Houve diferença significativa entre os tempos de incubação para a atividade de MnP nos quatro tratamentos ($P < 0,1$) (Anexos 26, 27, 28 e 29). A idade fisiológica do inóculo fúngico interfere na quantidade de atividade de MnP produzida durante o cultivo em solo contaminado, bem como no intervalo de tempo onde ocorre máxima produção dessa enzima, mostrando que quando utilizam-se inóculos mais jovens (5 e 10 dias), o pico enzimático acontece em menor intervalo de tempo, dentro do período de incubação, com atividade de MnP mais elevada que nos tratamentos com inóculos mais velhos (15 e 20 dias).

TABELA 3: Atividades de MnP produzidas nos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274 durante cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol.

Tempo (dias)	Tratamentos							
	T5		T10		T15		T20	
	U L ⁻¹	Tukey*	U L ⁻¹	Tukey*	U L ⁻¹	Tukey*	U L ⁻¹	Tukey*
5	4,2364	c, d, e, f	5,7152	c	1,7879	c, d	1,8364	a, b
10	7,6486	c	5,4819	c	2,7031	b, c, d	3,1576	a, b
15	4,9091	c, d, e	6,0637	c	2,2909	b, c, d	1,3576	a, b
20	10,1395	a, b	9,7092	c	3,7000	a, b, c, d	0,9030	b
25	14,8395	a	16,3638	a, b	7,1758	a, b,	2,3152	a, b
30	8,3031	c	18,4396	a, b	8,7880	a	2,9818	a, b
35	6,3455	c, d	5,2546	c	6,4122	a, b, c	4,9758	a
40	7,9880	c	6,3819	c	4,3031	a, b, c, d	1,2182	b
50	2,7485	c, d, e, g	6,9395	c	3,2606	b, d	3,6243	a, b
60	1,6606	d, g	3,6485	c	2,0849	b, d	1,8788	a, b

* Letras iguais indicam igualdade estatística por coluna – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$. Partes amarelas indicam períodos de maiores atividades de MnP. T5 = inóculo com 5 dias de incubação, T10 = inóculo com 10 dias de incubação, T15 = inóculo com 15 dias de incubação, T20 = inóculo com 20 dias de incubação.

Na Tabela 4 estão apresentadas atividades enzimáticas de descoloração do RBBR, produzidas pelos quatro tratamentos durante cultivo em solo. Como o relatado acima, no tratamento 5 (T5) o pico enzimático ficou entre o 15º e o 25º dia e no tratamento 10 (T10) o pico enzimático ficou entre o 15º e o 30º dia. Para o tratamento 15 (T15) o pico enzimático ficou entre o 25º e o 35º dias e no tratamento 20 (T20) o pico enzimático ficou entre o 5º e o 35º dia. Houve diferença altamente significativa entre os tempos de cultivo para atividade de descoloração do RBBR em todos os tratamentos ($P < 0,01$) (Anexos 11, 14, 17 e 20). A idade fisiológica interfere no período onde ocorre a maior atividade de descoloração do RBBR. Os tratamentos com inóculos mais jovens (T5, T10 e T15) tiveram picos enzimáticos mais definidos.

TABELA 4: Atividades enzimáticas de descoloração do RBBR nos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274 durante cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol.

Tempo (dias)	Tratamentos							
	T5		T10		T15		T20	
	U min ⁻¹	Tukey*	U min ⁻¹	Tukey*	U min ⁻¹	Tukey*	U min ⁻¹	Tukey*
5	4,9500	e, f	6,6500	b, c	6,3500	d, e, f	6,7500	a, b, c
10	7,4667	b, c, d	5,1000	c, d	8,4667	b, c, d	5,9333	a, b, c, d
15	8,8667	a, b, c	9,2667	a, b	7,5667	c, d, e	7,5000	a, b
20	9,1000	a, b	8,9000	a, b	7,6000	c, d, e	7,8333	a, b
25	9,7000	a	9,9333	a	13,7333	a	8,5000	a
30	6,9333	c, d, e	10,9333	a	11,6333	a, b	7,8000	a, b
35	4,5333	f	4,1667	d, e	10,8000	a, b, c	7,9667	a, b
40	4,5333	f, g	3,6333	d, e, f	6,4667	d, e, f	3,8667	c, d
50	0,8333	h	3,7000	d, e, f	3,0000	f	3,2333	d
60	1,0667	h	1,4000	f	4,6333	f	3,6667	d

* Letras iguais indicam igualdade estatística por coluna – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$. Partes amarelas indicam períodos de maiores atividades de descoloração do Azul Brilhante de Remazol R (RBBR). T5 = inóculo com 5 dias de incubação, T10 = inóculo com 10 dias de incubação, T15 = inóculo com 15 dias de incubação, T20 = inóculo com 20 dias de incubação.

Após identificação dos períodos das máximas produções enzimáticas, as atividades máximas de lacase, MnP e de descoloração do RBBR produzidas foram comparadas entre os diferentes tratamentos (Tukey, $P < 0,1$) (Tabela 5).

T15 apresentou atividade de lacase ($199,81 \text{ U L}^{-1}$) significativamente maior que nos demais tratamentos ($P < 0,1$). T5 e T10 apresentaram atividades máximas de MnP (cerca de 17 U L^{-1} cada) significativamente maiores que os demais tratamentos ($P < 0,01$) e não apresentaram diferença significativa entre si ($P = 0,9927$). Maior atividade de descoloração do RBBR foi observada no T15 ($12,1 \text{ U min}^{-1}$), com diferença altamente significativa dos demais tratamentos ($P < 0,01$) (Anexos 30, 31 e 32). As maiores atividades enzimáticas foram observadas em tratamentos que utilizaram inóculos mais jovens (T5, T10 e T15), isso mostra que a idade fisiológica interfere na quantidade das atividades enzimáticas detectadas.

TABELA 5: Atividades enzimáticas, nos períodos de máxima produção, de *L. crinitus* CCB274 durante cultivo em solo contaminado com pentaclorofenol, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Atividade enzimática nos períodos de produção máxima								
	Lacase			MnP			Descoloração do RBBR		
	Tempo (dias)	U L ⁻¹	Tukey*	Tempo (dias)	U L ⁻¹	Tukey*	Tempo (dias)	U min ⁻¹	Tukey*
T5	20-25	168,69	b	20-25	17,01	a, b	15-25	9,2	b, c
T10	15-30	133,55	c	25-30	17,40	a	15-30	9,8	b
T15	25-35	199,81	a	20-40	6,34	c	25-35	12,1	a
T20	20-35	127,81	c	5-60	2,77	d	5-35	7,5	d

*Letras iguais indicam igualdade estatística por coluna – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$. Partes amarelas indicam períodos de maiores atividades enzimáticas. T5 = inóculo com 5 dias de incubação, T10 = inóculo com 10 dias de incubação, T15 = inóculo com 15 dias de incubação, T20 = inóculo com 20 dias de incubação.

Atividades enzimáticas foram máximas nos primeiros 40 dias de cultivo em solo diminuindo a partir daí, para os quatro tratamentos, diferente do comportamento de maior produção enzimática desse fungo, quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado, onde o período de máxima produção enzimática foi observado nos primeiros 25 dias de incubação.

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.

Shimidt *et al.* (2005) observaram relação entre a idade fisiológica do inóculo de três isolados de *T. versicolor* e a produção de lacase, quando aplicados em biorremediação de solo. Observaram relação inversa da atividade de lacase com a idade do inóculo, mostrando que quanto mais jovem o inóculo, maiores as quantidades de lacase detectadas. No estudo aqui apresentado com *L. crinitus* não foi observada nenhuma relação da idade fisiológica do inóculo com a produção de lacase. A maior produção dessa atividade enzimática foi observada no T15, onde o pico de lacase no substrato sólido já havia sido observado antes da aplicação em solo (Figura 4).

A MnP vem sendo citada por alguns autores como potente conversor biocatalítico de organopoluentes. Haas *et al.* (2004) confirmam essa característica da MnP em estudo de degradação *in vitro* com *Nematoloma frowardii*, onde observaram a bioconversão de um composto organoclorado por essa enzima. Outros autores comentam a ação conjunta e a importância dos altos níveis de lacase e MnP relacionando-as às maiores taxas de degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos, como o estudo de Novotný *et al.* (2004) no cultivo de *Pleurotus ostreatus* em solo e em culturas.

No estudo com *L. crinitus*, as maiores produções de MnP foram observadas em tratamentos com aplicação de inóculos jovens (T5 e T10, seguidos do T15), acompanhadas da atividade de lacase, mostrando maior potencial para promover degradação de poluentes.

A atividade de descoloração do RBBR além de ser um método indicativo simples da presença do sistema enzimático ligninolítico, pode ser usada como ferramenta em estudos de biodegradação de xenobióticos, como indicador das condições fisiológicas do basidiomiceto durante o processo de biorremediação (Machado *et al.* 2005a). No cultivo de *L. crinitus* em solo foi observada atividade de descoloração do RBBR em todos os tratamentos e durante todo o período de cultivo, mostrando que as condições fisiológicas do basidiomiceto utilizado estavam adequadas para a condução dos ensaios, principalmente em tratamentos que utilizaram inóculos mais jovens, que apresentaram maiores quantidades dessa atividade enzimática.

4.2.2. Crescimento fúngico por análise visual

As notas atribuídas por cada observador, durante o tempo de incubação, foram somadas e as médias dessa soma foram relacionadas às porcentagens de colonização estabelecidas na Tabela 1 (item 3.5.2) (Tabela 6).

TABELA 6: Media da soma de notas atribuídas, pelos seis observadores, para as triplicatas de cada tempo de incubação de *Lentinus crinitus* CCB274 em solo e suas porcentagens de colonização correspondente.

Tempo (dias)	Tratamento							
	T5		T10		T15		T20	
	Soma	%	Soma	%	Soma	%	Soma	%
5	3,4	0-20	3,0	0-20	3,2	0-20	3,8	0-20
10	3,3	0-20	4,8	20-40	5,6	20-40	5,5	20-40
15	4,0	20-40	6,4	20-40	6,0	20-40	5,2	20-40
20	5,2	20-40	6,0	20-40	5,0	20-40	8,3	40-60
25	6,0	20-40	6,4	20-40	7,0	40-60	8,0	40-60
30	5,8	20-40	7,0	40-60	7,0	40-60	9,3	40-60
35	8,0	40-60	9,7	60-80	11,0	60-80	9,0	40-60
40	9,7	60-80	11,8	60-80	11,3	60-80	9,7	60-80
50	11,3	60-80	11,0	60-80	12,4	60-80	12,3	60-80
60	13,0	80-100	13,0	80-100	13,2	80-100	15,0	80-100

* T5 = inóculo com 5 dias de incubação, T10 = inóculo com 10 dias de incubação, T15 = inóculo com 15 dias de incubação, T20 = inóculo com 20 dias de incubação. Soma = média de soma das notas atribuídas; % = porcentagem correspondente à colonização do solo.

A colonização do solo pelo fungo foi mais rápida nos T10, T15 e T20. Essa diferença de velocidade na colonização do solo entre os tratamentos foi mantida até 35 dias de incubação. A partir de 40 dias não foi observada diferença de velocidade entre os tratamentos, que colonizaram totalmente o solo ao final de 60 dias de incubação (Figura 9). Isto aconteceu, provavelmente,

porque a colonização do substrato pelo micélio fúngico no inóculo, no momento da incubação, era diferente, proporcionalmente maior com o aumento do tempo de incubação, favorecendo maior velocidade de crescimento nos inóculos com maior idade fisiológica. Essa diferença na velocidade de colonização, quando avaliada visualmente, pode estar relacionada ao modo de crescimento do fungo, que coloniza primeiramente o substrato por adesão, formando uma película branca na superfície, somente em seguida as hifas fúngicas penetram no substrato, então o micélio libera enzimas que se difundem no próprio substrato hidrolisando os polissacarídeos (Gowthaman *et al.* 2001). Quanto maior o período de incubação do inóculo, maior velocidade do micélio fúngico para colonizar o solo, já que a massa de substrato estará colonizada em toda sua porção, não apenas superficialmente.

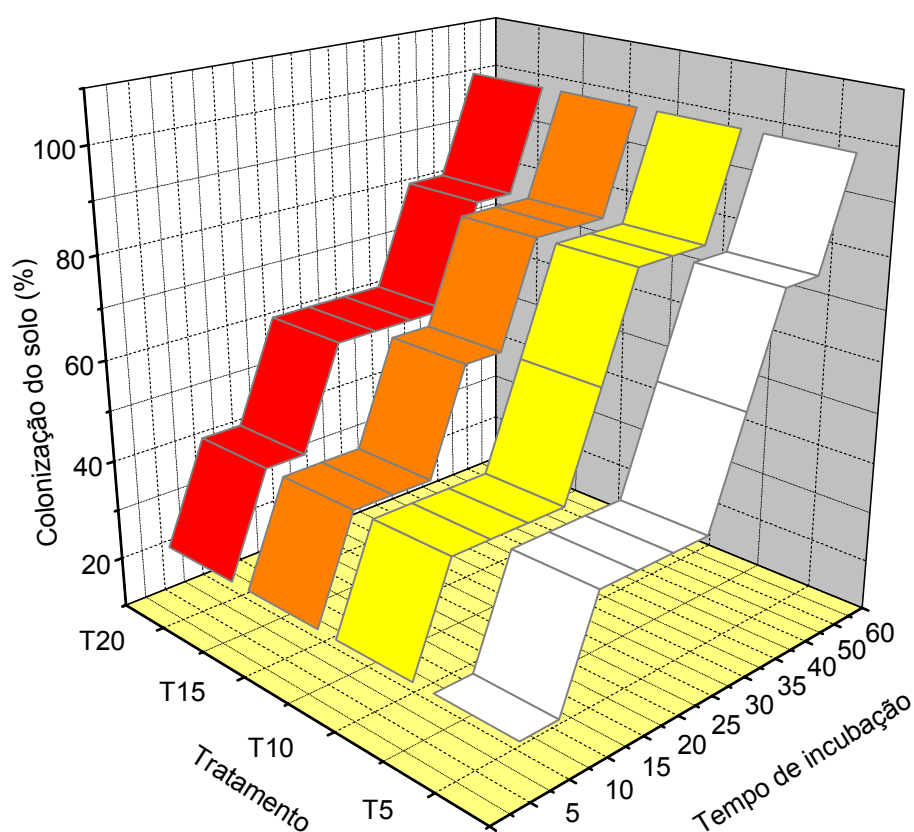


FIGURA 9: Colonização do solo contaminado com pentaclorofenol por *L. crinitus* CCB274 aplicado com diferentes idades fisiológicas: T5 (5 dias de incubação), T10 (10 dias de incubação), T15 (15 dias de incubação) e T20 (20 dias de incubação).

Ballaminut & Matheus (2006) em estudo de caracterização de inóculos fúngicos, determinando o crescimento por análise visual e quantificação de biomassa por ergosterol, observaram que a velocidade de colonização do substrato por *L. crinitus* avaliada por análise visual superestima a colonização, uma vez que o fungo coloniza o substrato mais rapidamente pela superfície do que na parte interna da massa de substrato.

A Figura 10 mostra colonização total do solo pelo micélio de *L. crinitus* CCB274 ao final do período de incubação (60 dias).



FIGURA 10: Solo contaminado com pentaclorofenol totalmente colonizado pelo micélio fúngico de *Lentinus crinitus* CCB274 (Foto: Marina Bianchini de Salvi, 2006).

4.3. Degradação de pentaclorofenol em solos por *L. crinitus* CCB274 com inóculos de diferentes idades fisiológicas

4.3.1. Testes de eficácia e eficiência de extração do pentaclorofenol do solo

A recuperação do pentaclorofenol presente no solo com os solventes testados foi de 60,33 % do pentaclorofenol inicial quando se utilizou acetona / hexano (25 : 75 v/v) em 3 extrações e 67,09 % em 5 extrações consecutivas, seguidas de evaporação.

Com metanol P.A. seguido de evaporação, a recuperação do pentaclorofenol foi de 73,09 % em 3 extrações consecutivas. Com metanol P.A. seguido de diluição em metanol CLAE a

recuperação foi de 91,55 % do pentaclorofenol contido nas amostras de solo contaminado, comprovando a eficácia desse solvente em uma única extração.

O método adotado para extração do pentaclorofenol no sistema de incubação do fungo no solo teve eficiência de 87,26 % em uma única extração. Esse valor foi utilizado como referência para correção nos cálculos de recuperação do pentaclorofenol das amostras testadas.

4.3.2. Biodegradação de pentaclorofenol em solo por *L. crinitus* CCB274

A concentração de pentaclorofenol (PCF) inicial no solo foi determinada em $277,139 \pm 28,739 \text{ mg Kg}^{-1}$.

Na Figura 11 estão apresentadas as porcentagens de degradação do pentaclorofenol aos 60 dias de incubação nos tratamentos com inóculos de diferentes idades fisiológicas. A degradação do pentaclorofenol foi completa ao final do período de incubação, não sendo observado resíduo do produto em níveis detectáveis. Foram feitos controles com substrato sólido não inoculado para cada tratamento e foi observada redução abiótica do pentaclorofenol de 3 % a 37 % com 60 dias de incubação.

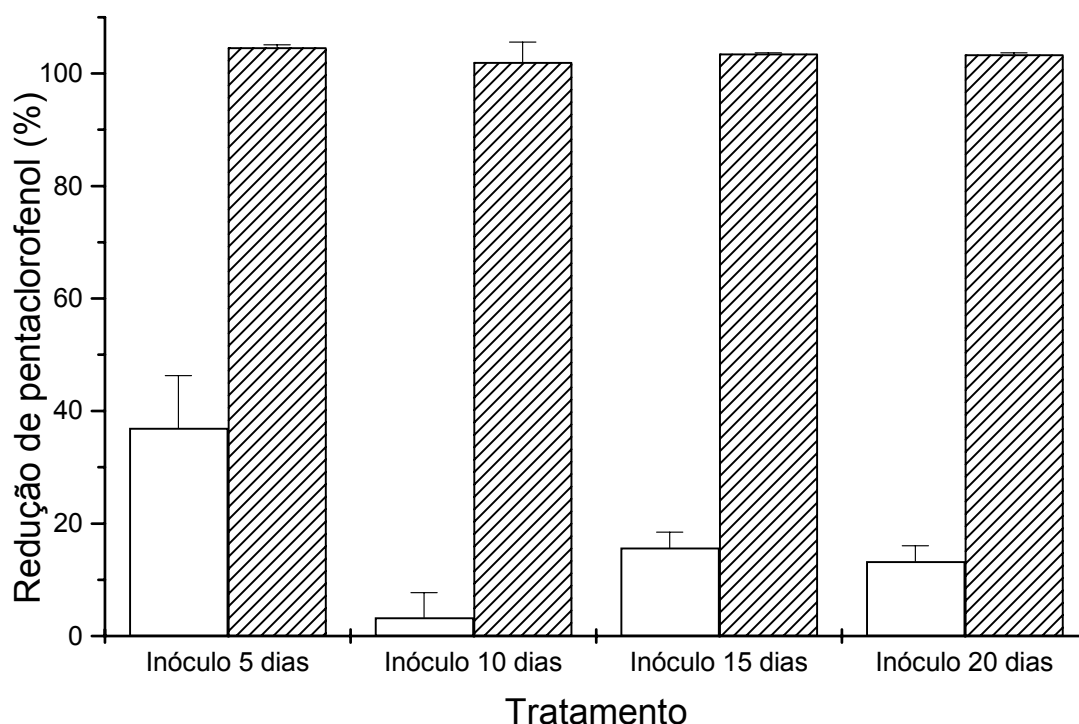


FIGURA 11: Redução porcentual de pentaclorofenol do solo controle (□) e do solo inoculado com *L. crinitus* CCB274 (///) aos 60 dias de incubação (Barras de erro $\pm$ desvio médio).

A maior redução observada nos controles do tratamento T5 pode estar relacionada à ação de fatores abióticos, bem como à presença de fungos mitospóricos contaminantes observados em algumas das réplicas dos controles deste tratamento. Existem relatos de que tais fungos também podem degradar alguns organoclorados (Vitali *et al.* 2006). Uma vez observada a contaminação decorrente do manuseio dos frascos para a correção da umidade, tal procedimento passou a ser feito apenas nos tratamentos com basidiomiceto para evitar contaminações nos demais tratamentos (T10, T15 e T20).

Autores como Lamar & Dietrich (1992) observaram perdas abióticas, incluindo a absorção à matriz sólida, de cerca de 43 %. Lamar *et al.* (1994) em estudos de degradação de pentaclorofenol e creosoto em solo, com inóculo de *Phanerochaete sordida* cultivado em mistura de grãos de trigo e serragem, também observaram redução abiótica de pentaclorofenol de cerca de 26 %. Matheus *et al.*

(2000) em estudo de degradação com basidiomicetos observaram redução abiótica de até 13 % nos tratamentos controle sem fungo, para *Psilocybe castanella*. Machado *et al.* (2005b) em estudo de biodegradação de pentaclorofenol por basidiomicetos, observaram redução abiótica de cerca de 27 a 43 %. Outros autores observaram perdas que foram atribuídas a fatores abióticos de até 48 % (Lamar *et al.* 1990; Lamar & Dietrich 1990; Okeke *et al.* 1993, Okeke *et al.* 1997).

Na Figura 12 estão apresentadas porcentagens de redução do pentaclorofenol do solo durante incubação com *L. crinitus* CCB274. Com 5 dias de incubação, o tratamento com inóculo de 10 dias reduziu 98,7 % do pentaclorofenol presente no solo, sendo recuperado apenas 3,55 µg PCF g⁻¹ solo. Os tratamentos com inóculos de 5 e 15 dias reduziram 95,5 e 94,2 % do poluente, sendo recuperado 12,56 e 16,17 µg PCF g⁻¹ solo, respectivamente. O tratamento com inóculo de 20 dias promoveu a menor redução, 78,5 %, correspondente à recuperação de 59,71 µg PCF g⁻¹ solo, diferindo significativamente dos demais tratamentos que promoveram maiores porcentagens de degradação no mesmo tempo de incubação ($P < 0,05$) (Anexo 33). Aos 15 dias de incubação todos os tratamentos degradaram 100 % do pentaclorofenol presente no solo, não apresentando diferenças entre si nesse período ($P = 0,441$) (Anexo 37). Esta rápida degradação do poluente pode ter ocorrido em razão de alguns fatores, tais como: a grande eficiência do basidiomiceto em degradar o poluente empregado e a concentração de pentaclorofenol utilizado no experimento.

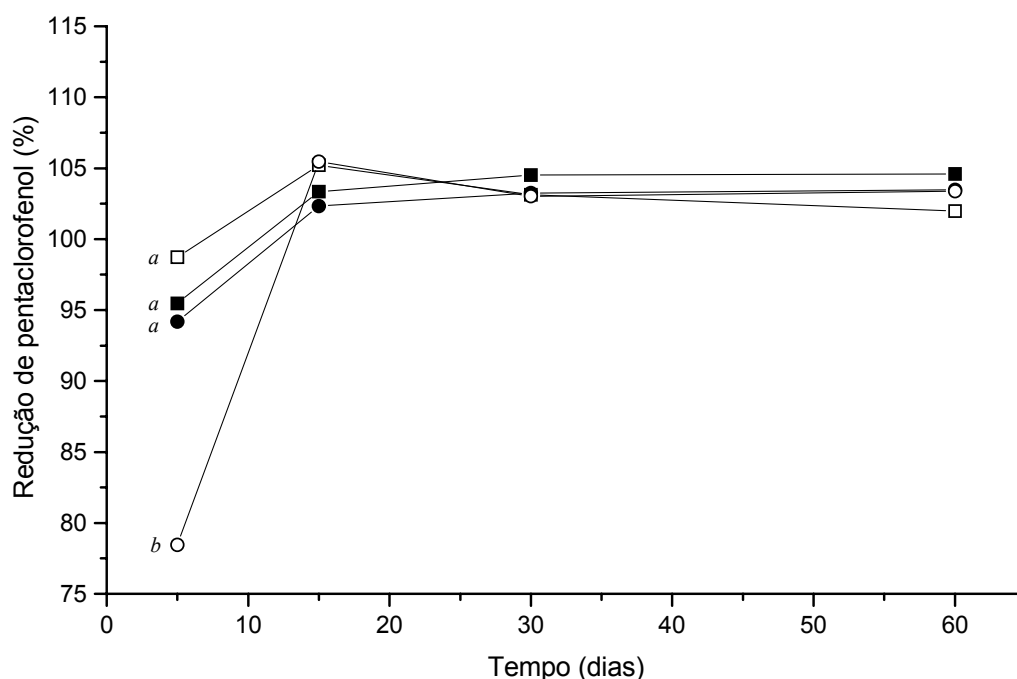


FIGURA 12: Acompanhamento da redução de pentaclorofenol nos tratamentos com inóculo de *L. crinitus* CCB274 em diferentes tempos de incubação: inóculo de 5 dias (■), inóculo de 10 dias (□), inóculo de 15 dias (●) e inóculo de 20 dias (○) durante crescimento em solo.

Estudos prévios mostraram a grande capacidade de *L. crinitus* CCB274 em degradar compostos organoclorados. Matheus & Bononi (2002) e Matheus (2003), em estudos de biorremediação, observaram altas taxas de mineralização de ^{14}C -hexaclorobenzeno em solo utilizando inóculo de *L. crinitus* CCB274, quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado e com adição de óleo vegetal.

A concentração de pentaclorofenol de 200 ppm aqui proposta, apesar de estar cerca de 1250 vezes maior do que o valor de prevenção do pentaclorofenol estipulado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB (São Paulo 2005), ainda não foi suficiente para que a degradação pudesse ser avaliada por todo o período de incubação, pois o poluente foi degradado totalmente em 15 dias.

Outros estudos utilizando basidiomicetos na degradação de compostos clorados, também mostraram alta porcentagem de degradação em até 5 dias de incubação, entretanto, em concentrações muito mais baixas que às utilizadas em nosso estudo. Leontievsky *et al.* (2001) observaram 90 % de remoção de 50 ppm de 2,4,6-triclorofenol, aos 5 dias de crescimento, das culturas líquidas de *Panus tigrinus* e *Coriolus versicolor*.

Lamar & Dietrich (1990) em estudo de degradação de pentaclorofenol em solo, com aplicação de espécies de *Phanerochaete*, cultivados em substratos sólidos, observaram redução de 88 a 91 % de 250 a 400 ppm de pentaclorofenol contido no solo, esterilizado também com brometo de metila, no entanto, em um período de até 6,5 semanas.

Ahn *et al.* (2002) em um estudo com aplicação de lacase de *Trametes villosa* livre e imobilizada, no tratamento de 1000 ppm de 2,4 diclorofenol em solo, observaram que ambas foram capazes de reduzir até 88 % do poluente em 1 dia de incubação e o composto desapareceu completamente aos 14 dias de incubação, assim como os sistemas de cultivo de *L. crinitus* CCB274, no estudo aqui apresentado.

Já outros autores encontraram dificuldades em trabalhar com concentrações maiores que 200 ppm de pentaclorofenol dada à sensibilidade do basidiomiceto em contato com o poluente. Walter *et al.* (2004) em trabalho de biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes versicolor* concluíram que as concentrações acima de 200 ppm foram inviáveis para avaliação da biodegradação nos ensaios desenvolvidos, diferente dos resultados obtidos no presente estudo.

4.4. Atividades enzimáticas ligninolíticas e degradação de pentaclorofenol em solos com diferentes inóculos

Na Figura 13 estão apresentadas atividades enzimáticas, bem como a degradação do pentaclorofenol nos diferentes tratamentos, no 5º dia de cultivo. A maior degradação foi observada nos tratamentos com inóculos mais jovens, T5, T10 e T15, sem diferença significativa entre si ($P >$

0,1), entretanto diferiram do T20 ($P \leq 0,05$) (Anexo 33). A atividade de MnP foi maior no T10 (5,72 U L⁻¹) seguido do T5 (4,91 U L⁻¹), que não apresentaram diferença significativa entre si ($P = 0,9286$) (Anexo 34). T15 e T20 produziram menores atividades de MnP sem diferença significativa entre si ($P = 1,000$) (Anexo 34). A produção de lacase diferiu entre os tratamentos ($P = 0,023$) (Anexo 35), sendo maior no T20 (84,57 U L⁻¹), seguido do T10 (59,26 U L⁻¹). A descoloração do RBBR apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,047$), não diferindo nos tratamentos T10, T15 e T20 no qual chegou ao máximo de 6,75 U min⁻¹ (Anexo 36).

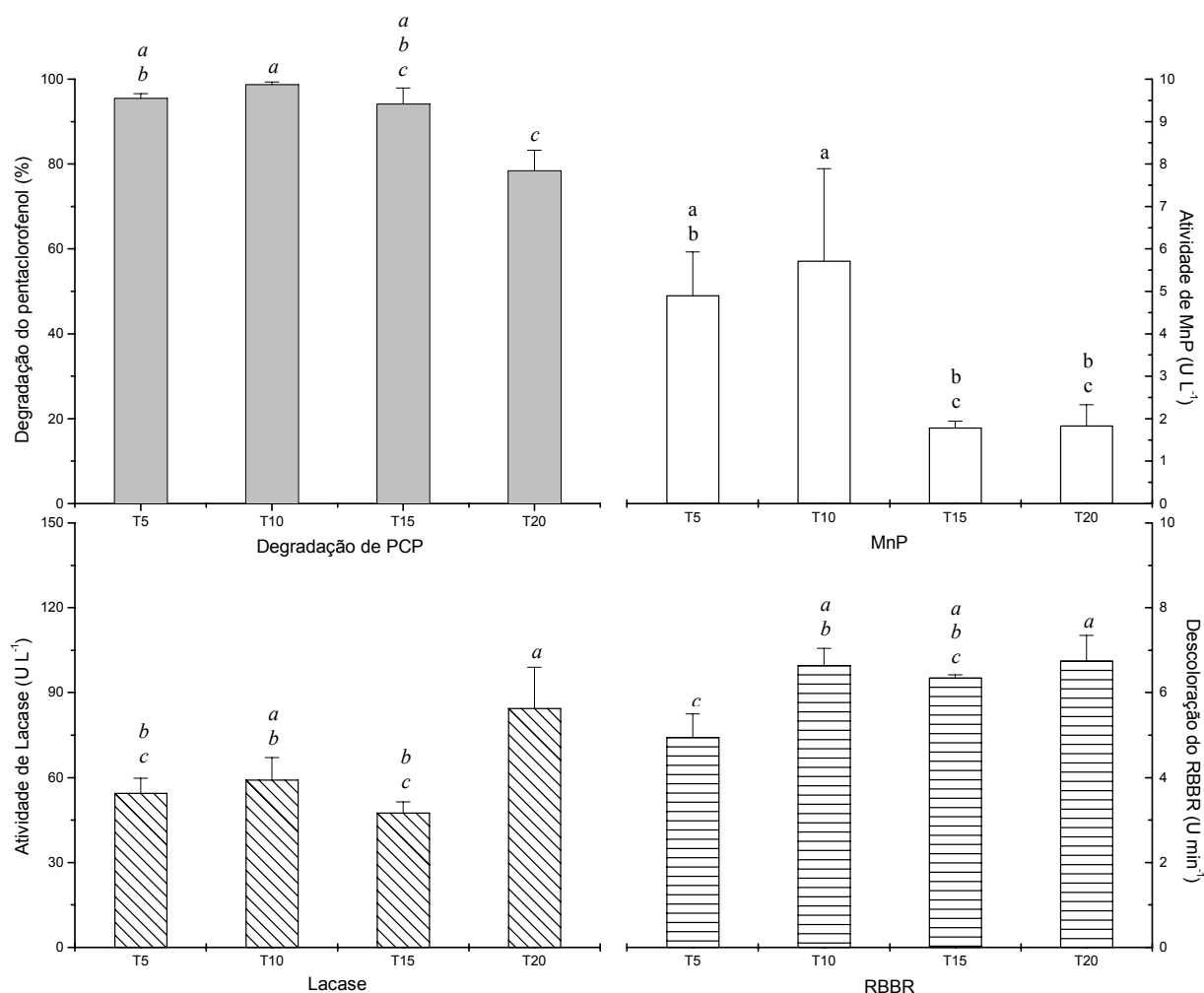


FIGURA 13: Degradação do pentaclorofenol presente no solo (■), atividade enzimática de MnP (□), de lacase (\\) e de descoloração (≡) produzidas no 5º dia de cultivo, pelos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274. T5 = inóculo de 5 dias, T10 = inóculo de 10 dias, T15 = inóculo de 15 dias e T20 = inóculo de 20 dias. (Barras de erro ± desvio médio. Letras diferentes indicam diferença estatística – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$).

Na figura 14 estão apresentadas atividades enzimáticas produzidas, bem como a degradação do pentaclorofenol nos diferentes tratamentos, no 15º dia de cultivo. Não houve diferença significativa da degradação entre os tratamentos ($P = 0,441$) (Anexo 37). Houve diferença significativa das atividades de MnP entre os tratamentos ($P = 0,009$) (Anexo 38), sendo maior no T10 ($6,08 \text{ U L}^{-1}$), seguido do T5 ($4,91 \text{ U L}^{-1}$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a atividade de lacase ($P = 0,243$) (Anexo 39). Foi observada diferença significativa para descoloração do RBBR entre os tratamentos ($P = 0,039$), sendo maior nos tratamentos T5 e T10, com $9,27 \text{ U min}^{-1}$ (Anexo 40).

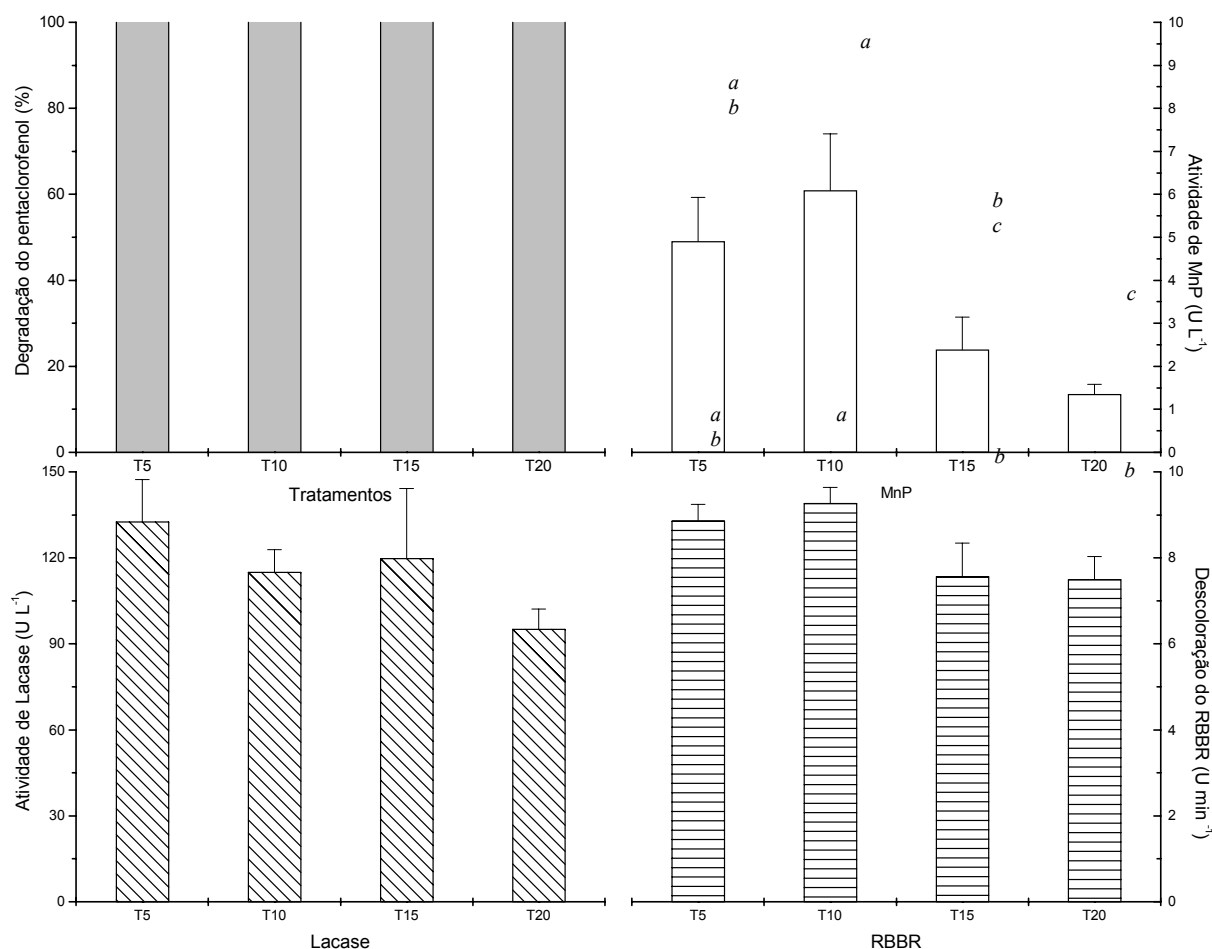


FIGURA 14: Degradação do pentaclorofenol presente no solo (■), atividade enzimática de MnP (□), de lacase (\\) e de descoloração (≡) produzidas no 15º dia de cultivo, pelos diferentes tratamentos com inóculos de *Lentinus crinitus* CCB274. T5 = inóculo de 5 dias, T10 = inóculo de 10 dias, T15 = inóculo de 15 dias e T20 = inóculo de 20 dias. (Barras de erro ± desvio médio. Letras diferentes indicam diferença estatística – Teste de Tukey, $P \leq 0,1$).

A comparação de atividades enzimáticas e da degradação entre os tratamentos não mostrou nenhuma relação das produções enzimáticas com a degradação do pentaclorofenol nos tempo de cultivo avaliados. Entretanto, parece existir relação das atividades de lacase com a descoloração do RBBR no 5º dia e da MnP com a descoloração do RBBR no 15º dia.

A capacidade de basidiomicetos de degradar clorofenóis já está bem relatada na literatura, em diferentes tratamentos. Outros autores também mostraram que outros basidiomicetos são

capazes de degradar clorofenóis extensivamente, inclusive o pentaclorofenol. Ullah *et al.* (2000a) observaram que extratos de lacase, provenientes de culturas sólidas de *Coriolus versicolor*, removeram 100 % de 50 ppm 2,4 diclorofenol em 5 horas e 75 – 80 % de 50 ppm de pentaclorofenol em 24 horas. Observaram também que pellets colonizados por esse fungo, quando adicionados a biorreatores contendo de 200 - 4000 mL de solução com clorofenóis, removeram cerca de 90 % dos poluentes em 100 min. Ullah *et al.* (2000b) em estudos com lacase purificada de *C. versicolor*, puderam observar que 100 unidades de lacase foram capazes de remover 100 % de 25 ppm e 60 % de 200 ppm de pentaclorofenol, em 72 horas de incubação.

Seradati *et al.* (2003) também observaram grandes taxas de redução de organoclorados em culturas imobilizadas de *Trametes versicolor*, remoção de 85 % de 2000 ppm de 2,4 diclorofenol e 70 % de 3400 ppm de pentaclorofenol, por transformação enzimática de lacase e MnP.

Outros basidiomicetos cultivados em substrato sólido também apresentaram altas taxas de degradação juntamente com a maior produção atividades enzimáticas. Okeke *et al.* (1997), utilizaram *Lentinula edodes* cultivado em substrato sólido, aplicado na degradação de pentaclorofenol e observaram altas taxas de degradação após a segunda semana de incubação, tempo também onde foram detectadas maiores atividades enzimáticas, incluindo MnP.

As atividades enzimáticas de lacase e de MnP foram quantificadas no momento da inoculação em solo para cada tratamento. No T5 foi feita quantificação das atividades enzimáticas no inóculo de 5 dias de incubação. No T10 no inóculo com 10 dias, T15 no inóculo com 15 dias e T20 com 20 dias. Após cultivo em solo foram quantificadas as atividades enzimáticas no 5º e no 15º dia, para cada tratamento (Figura 15). Foi possível observar, que após aplicação dos inóculos em solo, *L. crinitus* foi capaz de sustentar grandes quantidades de atividade de lacase, aumentando com o tempo de incubação. As atividades de MnP também foram bem sustentadas durante cultivo em solo, porém em quantidades menores do que o observado em substrato sólido, para T10 e T15. Para T5 e T20 houve um aumento das quantidades de MnP de 97 e 54 %, respectivamente, em 5 dias de cultivo em solo. Entretanto, foram os tratamentos com inóculos mais jovens (T5 e T10) que

produziram maiores atividades de MnP no cultivo em solo, em relação aos outros tratamentos (T10 com 5,72 U L⁻¹ e T5 com 4,91 U L⁻¹), além de promoverem maior degradação do pentaclorofenol, juntamente com T15.

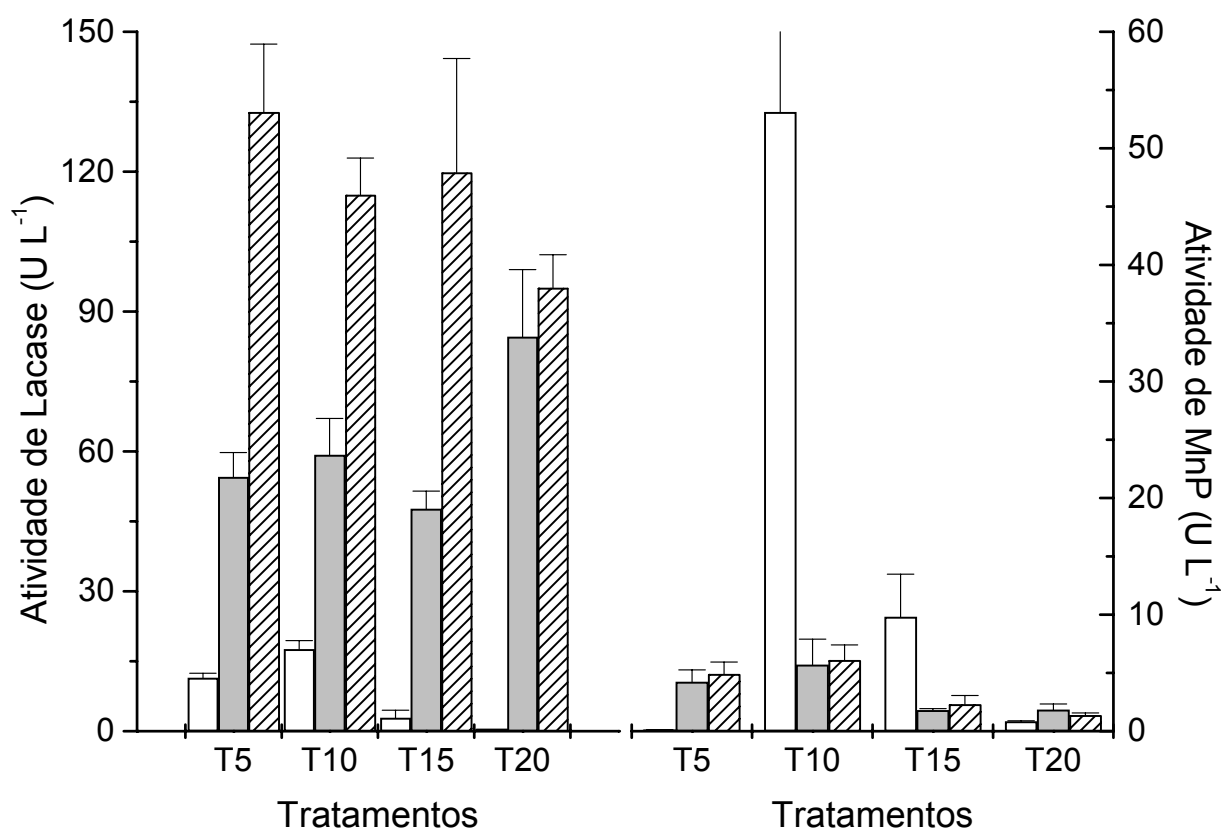


FIGURA 15: Atividades enzimáticas de lacase (eixo da esquerda) e MnP (eixo da direita), em substrato sólido e em solo. Atividades enzimáticas em substrato sólido no momento da inoculação em solo (□), atividades enzimáticas em solo, 5º dia (■) e 15º dia (///), produzidas por *L. crinitus* CCB274 nos diferentes tratamentos. T5 = inóculo de 5 dias, T10 = inóculo de 10 dias, T15 = inóculo de 15 dias e T20 = inóculo de 20 dias (Barras de erro $\pm$ desvio médio).

O envolvimento de enzimas ligninolíticas na degradação de poluentes também já está bem relatado. Reddy & Gold (2000) em um estudo fisiológico de *Phanerochaete chrysosporium*, atuando na degradação de pentaclorofenol, propuseram que a oxidação inicial do pentaclorofenol é catalizada pela MnP e pela LiP. Rodríguez *et al.* (2004) estudando espécies de *Pleurotus* na

degradação de 2,4-diclorofenol e benzo(α)pireno concluíram que as enzimas ligninolíticas secretadas por esses fungos participam do processo de degradação.

Observando estudos com outros membros da família Polyporaceae, autores como Leontievsky *et al.* (2000) e Leontievsky *et al.* (2001) também sugeriram que o sistema enzimático ligninolítico tenha participado do processo de degradação de 2,4,6-triclorofenol, por *Panus tigrinus* (= *Lentinus tigrinus*) e *Coriolus versicolor* (= *Trametes versicolor*), já que verificaram maior oxidação do composto em meio deficiente de nitrogênio. Esses autores observaram que a oxidação primária do organoclorado estudado é desempenhada pela MnP para *P. tigrinus* e pela lacase por *C. versicolor*.

Lentinus crinitus, pertencente ao mesmo subgrupo de *Lentinus tigrinus*, no presente estudo mostrou capacidade de produzir atividade de MnP, juntamente com lacase, durante cultivo em solo contaminado. Pode-se sugerir então que as atividades de MnP e lacase produzidas por *L. crinitus* podem estar relacionadas à degradação do pentaclorofenol, já que os tratamentos que apresentaram maiores atividades de MnP em solo (T5 e T10, seguidos de T15), também apresentaram maiores porcentagens de degradação do pentaclorofenol (T5, T10 e T15). Além disso, a atividade de lacase também foi produzida em quantidades significativas pelo fungo durante cultivo em solo contaminado.

4.5. Critérios qualitativos para caracterização do inóculo fúngico

É difícil definir qual fator é preponderante na qualidade do inóculo de *L. crinitus* para promover maior degradação de organoclorados em solo, uma vez que, como visto acima, são vários os fatores envolvidos na degradação dos poluentes.

Para qualificação do inóculo fúngico a ser utilizado em biorremediação foram avaliados alguns critérios qualitativos propostos, com base nos dados obtidos com os testes realizados em

substrato sólido e em solo (Tabela 7). Os dados sugerem que os níveis enzimáticos presentes no inóculo, no momento de sua inoculação no solo, é fator relevante na qualidade deste inóculo.

TABELA 7: Critérios qualitativos utilizados para seleção da melhor idade fisiológica do inóculo fúngico de *L. crinitus* CCB274 empregado em biorremediação de solo contaminado com pentaclorofenol.

Critérios qualitativos	Tratamentos			
	T5	T10	T15	T20
1. Maior atividade de lacase no inóculo ao ser aplicado no solo		X		
2. Maior atividade de MnP no inóculo ao ser aplicado no solo		X		
3. Inóculo com maior biomassa ao ser aplicado no solo		X	X	X
4. Maior atividade de lacase no 5º dia de cultivo em solo		X		X
5. Maior atividade de MnP no 5º dia de cultivo em solo	X	X		
6. Maior descoloração do RBBR no 5º dia de cultivo em solo		X	X	X
7. Atividade de lacase mais elevada durante cultivo em solo			X	
8. Atividade de MnP mais elevada durante cultivo em solo	X	X		
9. Descoloração do RBBR mais elevada durante cultivo em solo			X	
10. Maior velocidade de colonização do solo		X	X	X
11. Maior porcentagem de degradação do pentaclorofenol	X	X	X	

T5 = inóculo de 5 dias, T10 = inóculo de 10 dias, T15 = inóculo de 15 dias e T20 = inóculo de 20 dias.

Importante destacar que o inóculo que ainda não havia atingido o máximo de sua produção enzimática (T5), também teve bom desempenho na degradação.

De acordo com os critérios qualitativos avaliados, pode-se afirmar que os inóculos mais jovens (T5, T10 e T15) foram mais eficientes na degradação do pentaclorofenol do que o inóculo com maior idade fisiológica (T20), utilizado até então como padrão em tratamentos de biorremediação. Entretanto, os tratamentos que podem ser considerados melhores para aplicação em biorremediação são T10 e T15, pois se enquadraram em mais de 50% dos critérios apresentados.

Dzul-Puc *et al.* (2005) em um estudo com *Phanerochaete chrysosporium*, crescido em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de pinheiro, também avaliaram a interferência da idade fisiológica, além do substrato utilizado na redução de benzo(α)pireno e concluíram que a remoção

do contaminante foi mais efetiva no inóculo mais jovem, com 5 dias de incubação, crescido em bagaço de cana-de-açúcar.

No entanto, alguns autores chamam atenção para desvantagens do uso de inóculo fúngico jovem em aplicações de campo, pois a colonização do substrato ainda não é total, prejudicando a colonização do solo contaminado, que requer mais biomassa micelial do que o solo controle, por exemplo, além de ter velocidade de colonização bem mais lenta (Shimidt *et al.* 2005, Walter *et al.* 2005). Uma alternativa para esse tipo de problema é a produção de inóculo em pellets, que por ter uma superfície de contato menor, acaba tendo colonização mais rápida do substrato, além de ter reduzida a perda de massa micelial com o atrito da mistura no solo. Autores como Lestan & Lamar (1996), em estudo de inóculos fúngicos produzidos em grânulos de substrato sólido cobertos por alginato, observaram que tais inóculos levaram até 8 dias para colonizar completamente os grânulos e ainda assim, possuíam vigor para o manejo e aplicação destes em solo, sem alterações em sua consistência mecânica. Observaram ainda, que os inóculos fúngicos promoveram remoção de pentaclorofenol de cerca de 80 a 90 % em quatro semanas, confirmando a eficiência de sua aplicação.

O tamanho dos grânulos é outro aspecto que também deve ser avaliado, já que alguns autores observaram, em outras condições, interferência desse fator na produção de biomassa e atividades enzimáticas. Zmak *et al.* (2006), em estudo de avaliação da interferência do tamanho de pellets de *Phanerochaete chrysosporium*, produzido em cultura líquida, no crescimento fúngico e na produção de atividade enzimática de LiP, observaram que existe relação entre esses fatores. Quanto maior o tamanho do pellet menor o aumento de biomassa fúngica e menor a produção atividade de LiP.

Nos testes aqui apresentados, apesar da eficácia na degradação do pentaclorofenol, pelos diferentes tratamentos utilizando *L. crinitus*, há ainda necessidade de aperfeiçoamento da produção do inóculo fúngico, para melhorar a eficiência em seu emprego para tratamentos de biorremediação de solos. Sugere-se então, que sejam feitos testes de produção de inóculo peletizado, com avaliação

de tamanhos adequados para aplicação em solo, que favoreçam uma colonização mais rápida do solo a ser tratado e também mantenham a viabilidade do inóculo.

5. CONCLUSÕES

- A descoloração de RBBR em solo foi bom indicador da produção de atividade enzimática ligninolítica e da capacidade de degradação de pentaclorofenol por *L. crinitus* em solo;
- Atividades de lacase e de MnP podem estar envolvidas na descoloração do RBBR e na degradação do pentaclorofenol por ação conjunta;
- Inóculo com 20 dias de incubação não é o melhor para aplicação em solo, diferente do preconizado até então por vários autores. A velocidade com que ocorreu a degradação, aliado ao tempo de produção do inóculo, mostrou que o emprego de inóculo de 20 dias poderá prolongar o processo de biorremediação do solo, podendo inviabilizá-lo.
- Inóculo com idade fisiológica de 5 dias possui colonização lenta quando aplicado em escala de laboratório. Existe então a possibilidade da colonização do solo ser prejudicada pela baixa velocidade, quando aplicado em escala de campo, já que o inóculo possui pouca massa micelial.
- Inóculos com idade entre 10 e 15 dias de incubação parecem ser os indicados para aplicação em biorremediação de solo. Entretanto, a demanda de tempo na produção de inóculo interfere nos processos de biorremediação na prática. Sendo assim, quanto menor o tempo para a produção do inóculo mais rápido torna-se o processo, mostrando a necessidade em se avaliar inóculos com idades fisiológicas entre esse período.
- A definição do perfil de atividade enzimática do inóculo fúngico é importante para determinação da melhor idade fisiológica de aplicação de mesmo, permitindo estabelecer o momento que propicia maior eficiência na biodegradação do poluente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, M. Y., Dec, J., Kim, J. E. & Bollag, J. M.** 2002. Treatment of 2,4-Dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase. *Journal of Environmental Quality* 31: 1509-1515.
- Andréa, M. M., Papini, S. & Nakagawa, L. E.** 2001. Optimization microwave-assisted solvent extration of pesticides from soil. *Journal of Environmental Science and Health B36* (1): 87-93.
- Arora, D. S. & Gill, P. K.** 2001. Effects of various media and supplements on lacase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology* 77: 89-91.
- Atlas, R. M.** 1993. Management of the environment through biotechnology. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 9: 493-494.
- Aust, S. D.** 1990. Degradation of enviromental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology* 20:197-209.
- Aust, S. & Bumpus, J. A.** 1987. Biodegradation of halogenated hydrocarbons. *Environmental Research Brief*. EPA 600/M-87/012.
- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters* 30: 215-242.
- Ballaminut, N & Matheus, D. R.** 2006. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology In Press*.
- Barr, D. P. & Aust, S. D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology* 28 (2): 78-87.
- Bending, G. D., Friloux, M. & Walker, A.** 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters* 212: 59-63.
- 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 Technolog.* 94: 107–112.

- Bollag, J. M., Chu, H. L., Rao, M. A. & Gianfreda, L.** 2003. Enzymatic Oxidative Transformation of Chlorophenol Mixtures. *Journal of Environmental Quality* 32: 63–69.
- Bononi, V. L. R.** 1997. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. *In*: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (eds.). *Microbiologia Ambiental*, Jaguariúna, Embrapa – CNPMA, 440 p.
- Boopathy, R.** 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Bourbonnais, R. & Paice, M. G.** 1988. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemical Journal* 255: 445-450.
- 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., Kropp, B. R. & Reid, I. D.** 1992. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3217-3224.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.
- Brasil, Comissão Nacional de Segurança Química – CONASQ.** 2003. Perfil Nacional da gestão de substâncias químicas. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 382p.
- Castillo, M. P., Andersson, A., Ander, P., Stenström, J. & Torstensson, L.** 2001. Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 627-633.
- Claus, H.** 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.
- Compart, L. C. A., Machado, K. M. G., Matheus, D. R. & Cardoso, A. V.** 2006. Immobilization of *Psilocybe castanella* on ceramic (slate) supports and its potential for soil bioremediation. *In Press*.

- D'Acunzo, F. & Galli, C.** 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry* 270: 3634–3640.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Leonardi, V., Quarantino, D., Mincione, E. & Petruccioli, M.** 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* 90 (6): 723–731.
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R.** 2005. Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 223–231.
- 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.
- Dodor, D. E., Hwang, H. & Ekunwe, S. I. N.** 2004. Oxidation of anthracene and benzo[α]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 210–217.
- Duran, R., Deschler, C., Precigou, S. & Goulas, P.** 2002. Degradation of chlorophenols by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of 3,4-dichlorophenol on extracellular peroxidase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 284–288.
- Durán, N. & Esposito, E.** 2000. Review: Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 83–99.
- Dzul-Puc, J. D., Esparza-García, F., Barajas-Aceves, M. & Rodríguez-Vaáquez R.** 2005. Benzo[α]pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere* 58: 1–7.
- Eash, N. S., Stahl, P. D., Parkin, T. B. & Karlen, D. L.** 1996. A simplifield 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., Dean, J. F. D. & Eriksson, K. E. L.** 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391: 144-148.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K. E. L.** 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (4): 1151-1158.
- Evans, C. S. & Hedger, J. N.** 2001. Degradation of plant cell wall polymers. *In*. Fungi in bioremediation, Gadd, G. M. (ed.). University Press, Cambridge, British Mycological Society, 1-24.
- Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231-240.
- 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.
- Glenn, J. K. & Gold, M. H.** 1983. Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 45 (6): 1741-1747.
- 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.
- Haas, R., Tsvunchyk, O., Steinbach, K., Löw, E. V., Scheibner & K. Hofrichter, M.** 2004. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 564–566.

- Häggbloom, M. M.** 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.
- Häggbloom, M. M. & Valo, R. J.** 1995. Bioremediation of chlorophenol wastes. *In*: Young, L. Y. & Cerninglia, C. E. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. 389-434.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135.
- Higuchi, T.** 2004. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Jpn. Acad. Ser B* 80: 204-214.
- Hofrichter, M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Hofrichter, M. Lundell, T. & Hatakka, A.** 2001. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10): 4588-4593.
- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneega, I., & Fritsche, W.** 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology* 399-404.
- Hölker, U. Höfer, M. & Lenz, J.** 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 175-186.
- 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.
- Keum, Y. S. & Li, Q. X.** 2004. Fungal laccase-catalysed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56: 23-30.
- 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.
- Krishna, C.** 2005. Solid-state fermentation systems - an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 1–30.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. & Gold, M. H.** 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169: 247-250.
- Lamar, R. T., Davis, M. K., Dietrich, D. M. & Glaser, J. A.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry* 26 (12): 1603-1611.
- Lamar, R. T. & Dietrich, D. M.** 1990. *In situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (10): 3093-3100.
- Lamar, R. T. & Dietrich, D. M.** 1992. Use of lignin-degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol-treated wood. *Journal of Industrial Microbiology* 9: 181-191.
- Lamar, R. T., Glaser, J. A. & Kirk, T. K.** 1990. Fate of pentachlorophenol (PCP) in sterile soils inoculated with the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: mineralization, volatilization and depletion of PCP. *Soil Biology and Biochemistry* 22 (4): 433-440.
- 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, 3v, pp. 263-278.
- Law, W. M., Lau, W. N., Lo, K. L., Wai, L. M. & Chiu, S. W.** 2003. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere* 52: 1531–1537.

- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* 39: 1183-1191.
- 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., Baskunov, B. P., Evans, C. S. & Golovleva, L. A.** 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* 11: 331–340.
- Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Golovleva, L. A., Bucke, C. & Evans, C. S.** 2001. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 85-91.
- 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.
- Lestan, D. & Lamar, R. T.** 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (6): 2045-2052.
- Litchfield, C.** 2005. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioScience* 55 (3): 273-279.
- Machado, C. F.** 2003. Influência do nitrogênio e do óleo de soja na atividade ligninolítica de *Trametes villosa* CCB176 e *Psilocybe castanella* CCB444. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 100p.
- Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R.** 1998. Screening of basidiomycetes for xenobiotic degradation. LABS 3 Paper N° 53.
- 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., & Bononi, V. L. R.** 2005a. 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., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005b. 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.
- Marcial, J., Barrios-Gonzalez, J. & Tomasini, A.** 2006. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochemistry* 41: 496–500.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & del Río, J. C.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- 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.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ¹⁴C-hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Monterey, CA, Paper 2B-10.*

- 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. M., Bononi, V. L. R., Machado, K. M. G. & Silva, R. R. & Rodrigues, T. A.** 2003. Growing basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. *In: Magar, V. S. & Kelley, M. E. (eds.). In Situ and On-Site Bioremediation. Proceedings of the Seventh. International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium.* Orlando, Battelle Press, Paper G5.
- 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.
- Mayer, A. M. & Staples, R. C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Mcallister, K. A., Lee, H. & Trevors, J. T.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7: 1-40.
- Meunier, B.** 2002. Catalytic degradation of chlorinated phenols. *Science* 296: 270-271.

- Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A. & Aust, S. D.** 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 54 (12): 2885-2889.
- Moldes, D., Lorenzo, M. & Ángeles Sanromán, M.** 2003. Degradation or polymerisation of phenol red dye depending to the catalyst system used. Process Biochemistry. 39: 1811-1815.
- Moore-Landecher,** 1996. Fundamentals of the Fungi. 14^a ed. Brasil: Prence-Hall. Cap 9, p. 251-278.
- 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.
- Morgan, P., Lee, S. A., Lewis, S. T., Sheppard, A. N. & Watkin, R. J.** 1993. Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil. Soil Biology and Biochemistry 25 (2): 219-281.
- Mtui, G. & Nakamura, Y.** 2004. Lignin-degrading enzymes from mycelial cultures of basidiomycete fungi isolated in Tanzania. Journal of Chemical Engineering of Japan 37 (1): 113-118.
- 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., 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.
- 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 Microbiology and Biotechnology 48: 563-569.

- Okeke, B. C., Smith, J. E., Paterson, A. & Watson-Craik, I. A.** 1993. Aerobic metabolism of pentachlorophenol by spent sawdust culture of “shitake” mushroom (*Lentinus edodes*) in soil. *Biotechnology Letters* 15 (10): 1077-1080.
- 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.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P. & Soccol, V. T.** 2000. Biotechnological potencial of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 74: 69-80.
- Papinutti, V. L., Diorio, L. A. & Forchiassin, F.** 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 157-160.
- Pazarlioglu, N. K., Urek, R. O. & Ergun, F.** 2005. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 40: 1923–1929.
- Pletsch, M., Araujo, B. S. & Charlwood, B. V.** 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology Advances* 17: 679–687.
- 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.
- 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.

- Reddy, G. V. B. & Gold, M. H.** 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. Microbiology 146: 405–413.
- Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A. T. & Martínez, M. J.** 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biology and Biochemistry 36: 909–916.
- São Paulo, Estado.** Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB). Decisão de Diretoria nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, 4p.
- Schmidt, K. R., Chand, S., Gostomski, P. A., Boyd-Wilson, K. S. H., Ford, C. & Walter, M.** 2005. Fungal inoculum properties and its effect on growth and enzyme activity of *Trametes versicolor* in soil. Biotechnology Progress 21: 377-385.
- Schoemaker, H. E. & Leisola, M. S. A.** 1990. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Biotechnology 13: 101-109.
- 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.
- Seradati, M. R., Keshavarz, T., Leontievsky, A. A., Evans, C. S.** 2003. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. Electronic Journal of Biotechnology 6 (2): 106-114.
- Shannon, M.J. R. & Uterman, R.** 1993. Evaluating Bioremediation: Distinguishing Fact from Fiction. Annual Review Microbiology. 47: 715-738.
- Shim, S. S. & Kawamoto, K.** 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. Water Research 36: 4445–4454.
- Shin, K., Oh, I. & Kim, C.** 1997. Production and purification of Remanzol Brilliant Blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 63 (5): 1744-1748.

- Shiu, W. Y.** Chemosphere, 29: 1155-1224, *apud* Nascimento, N. R., Nicola, S. M. C., Lupinacci, C., Mendes, I. A. & Bertagna, S. M. Contaminação dos solos e das águas de superfície por hexaclorobenzeno e pentaclorofenol – Bacia do Rio Mariana – São Vicente-SP, 1996, 51p. Relatório técnico-científico (Convênio entre Prefeitura Municipal de São Vicente e UNESP e termo aditivo com UNESP/DPR/CEPEL e FUNDUNESP) – Universidade Estadual Paulista, 1996.
- Silva, C. M. M. S. & Fay, E. F.** 1997. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. *In*: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador 3: 67-105.
- Silva, E. M., Machuca, A. & Milagres, A. M. F.** 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. Letters in Applied Microbiology 1-6.
- Silva, R. R.** 2004. Ergosterol para a determinação de biomassa de fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 108p.
- Soares, G. M. B., Costa Ferreira, M. & Amorim, P.** 2001. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. Bioresource Technology 79: 171-177.
- Steffen, K. T., Hatakka, A. & Hofrichter, M.** 2003. Degradation of benzo[*a*]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. Applied and Environmental Microbiology 69 (7): 3957–3964.
- 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.
- Tanaka, T., Tanosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fijii, T. & Taniguchi, M.** 2001. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemical with

- laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: (4): 312-316.
- Tien, M. & Kirk, T. K.** 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science* 81: 2280-2284.
- 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.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itävaara, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- Tuor, U., Winterhalter, K. & Fiechter, A.** 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* 41: 1-17.
- Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F. & Viale, A.** 2003. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 682-690.
- 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.
- Ullah, M. A., Bedford, C. T. & Evans, C. S.** 2000b. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 230-234.
- Vieira, S. & Hoffmann, R.** *Estatística Experimental*. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A. & Jones, E.B.G.** 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology* 97: 171–177.
- Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andréa, 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.
- Walter, M., Boyd-Wilson, K. B., Boul, L, Ford, C., McFadden, D., Chong, B. & Pinfold, J.** 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 51–57.
- 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.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S. N.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161–187.
- Zmak. P. M., Podgornik, A., Podgornik, H. & Koloini, T.** 2006. Impact of pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1243–1249.

RESUMO

Lentinus crinitus CCB274 está sendo avaliado em biorremediação de solo, devido a sua capacidade de mineralizar organoclorados. O presente estudo teve como objetivo avaliar a melhor condição fisiológica do inóculo fúngico para degradação de poluentes, uma vez que avaliação visual da colonização tem sido o único critério de qualidade adotado na produção de inóculo. Bagaço de cana-de-açúcar, suplementado para C/N 90, foi utilizado para produção do inóculo. Crescimento fúngico em substrato sólido foi estimado por ergosterol e foram determinadas atividades de peroxidases, lacase e peroxidase dependente de manganês (MnP). Peroxidases foram detectadas em substrato sólido pelo menos até 30 dias de incubação, com cerca de $2,50 \text{ U L}^{-1}$. Atividades de lacase e MnP foram máximas aos 10 dias com $17,59$ e $53,09 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente. Houve aumento significativo de biomassa fúngica durante o período de incubação (de 75 para 106 mg de ergosterol g^{-1} de massa seca). Com base nos dados observados em substrato sólido foram escolhidas diferentes idades de inóculo (5, 10, 15 e 20 dias de incubação) para avaliar a produção de atividades enzimáticas, crescimento fúngico por análise visual e degradação de pentaclorofenol em solo. Maior atividade de lacase foi observada no tratamento com inóculo de 15 dias de incubação (T15), entre o 25º e o 35º dia de cultivo. Maiores atividades de MnP ocorreram nos tratamentos com inóculos de 5 (T5) e 10 (T10) dias de incubação, entre o 20º e o 30º dia de cultivo. Maior descoloração do RBBR foi observada no T15, entre o 25º e o 35º dia de cultivo. O crescimento em solo foi mais rápido nos T10, T15 e T20, até 40 dias de cultivo. Ao final do período de incubação (60 dias) todos os tratamentos colonizaram 100% do solo. Maiores porcentagens de degradação do pentaclorofenol foram observadas nos T5, T10 e T15. Concluiu-se que a melhor idade fisiológica de inóculo de *L. crinitus* para aplicação em biorremediação foi entre os 10 e 15 dias de incubação, por apresentar rápida colonização do solo, alta porcentagem de degradação e produção de grandes quantidades de atividades enzimáticas, incluindo a lacase e MnP, que parecem estar envolvida na degradação do pentaclorofenol.

Palavras-chave: inóculo fúngico, biorremediação, pentaclorofenol, atividades enzimáticas.

ABSTRACT

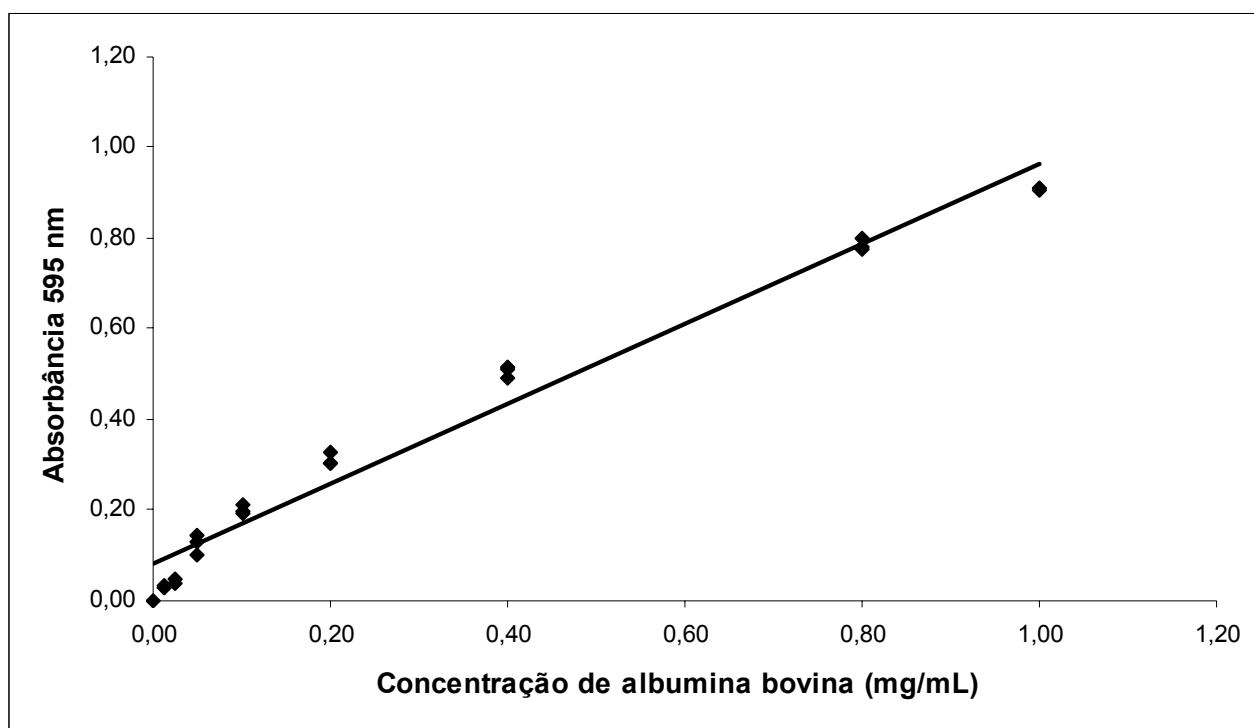
Lentinus crinitus CCB274 has been evaluated in soil bioremediation, due its ability to mineralize organochlorinates. The present study has as objective evaluate the best physiological condition of the fungal inoculum to pollutants degradation once that the colonization's visual evaluation has been the only quality criterion adopted on the inoculum's production. Sugarcane bagasse, supplemented to C/N 90, was utilized to the inoculum's production. Fungal growth in solid substratum was estimated by ergosterol and activities of peroxidases, lacase and Mn-dependent peroxidase were determinated. Peroxidases were detected in solid substratum at least up to 30 days of incubation, with about 2,50 U L⁻¹. Activities of lacase and Mn-dependent peroxidase were maximum by 10 days with 17,59 and 53,09 U L⁻¹, respectively. There was a significant increase of the fungal biomass during the incubation period (from 75 to 106 mg of ergosterol g⁻¹ of dry mass). Based on the observed data in solid substratum different ages of inoculum were chosen (5, 10,15 and 20 days of incubation) to evaluate the production of enzymatic activities, fungal growth by visual analysis and pentachlorophenol's degradation in soil. Higher lacase's activity was observed on the treatment with inoculum of 15 days of incubation (T15), between the 25° and the 35° day of culture. Higher activities of Mn- dependent peroxidase had occurred on the treatments with inoculums of 5 (T5) and 10 (T10) days of incubation, between the 20° and the 30° day of culture. Higher RBBR's decolorization was observed on T15, between the 25° and the 35° day of culture. The growth in soil was faster on T10, T15 and T20, up to 40 days of culture. To the end of the incubation period (60 days) all the treatments had colonized 100% of the soil. Higher percentages of pentachlorophenol's degradation were observed on T5, T10 and T15. It was concluded that the best *L. crinitus* inoculum's physiological age for application in bioremediation was between the 10 and 15 days of incubation, for presenting rapid soil colonization, high percentage of degradation and production of great amounts of enzymatic activities, including the lacase and Mn-dependent peroxidase, that may seem to be involved on pentachlorophenol's degradation.

Key-words: fungal inoculum, bioremediation, pentachlorophenol, enzymatic activities.

ANEXO 1

Curva padrão de concentrações conhecidas de albumina bovina, utilizada para quantificação de proteínas.

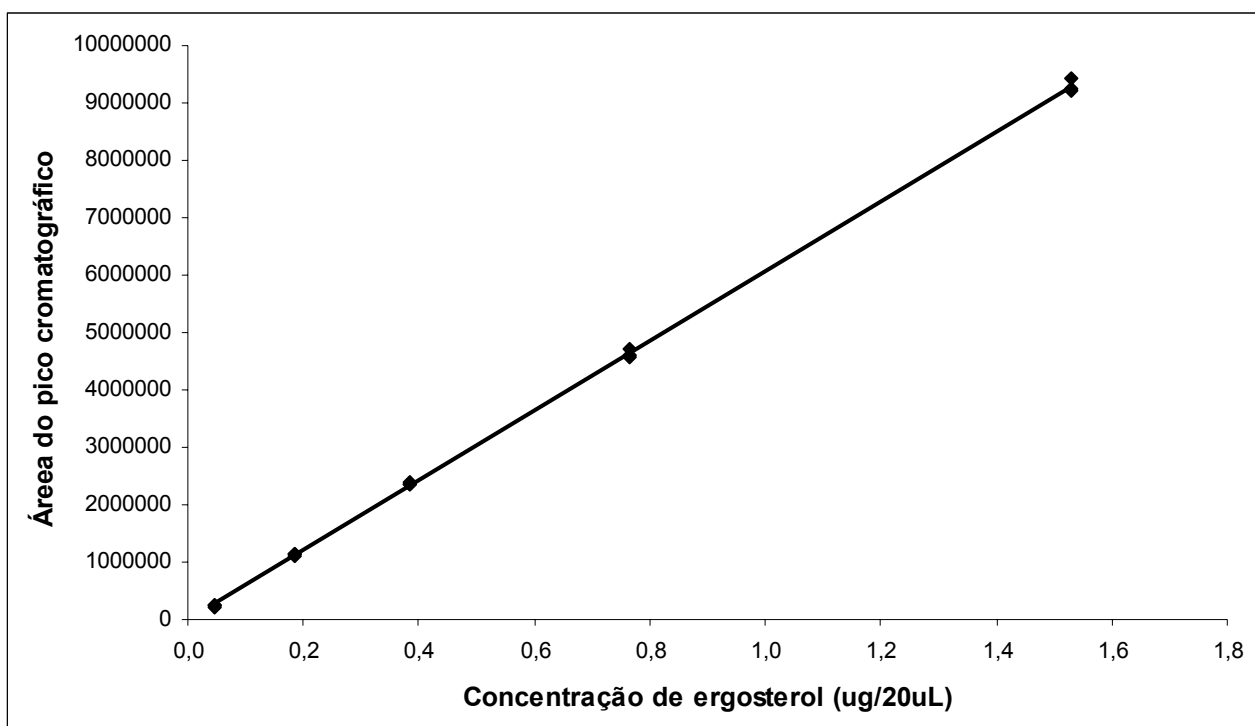
Equação da reta $y = 0,8815x + 0,0828$, $r^2 = 0,972$.



ANEXO 2

Curva padrão de concentrações conhecidas de ergosterol, utilizada para quantificação de ergosterol recuperado.

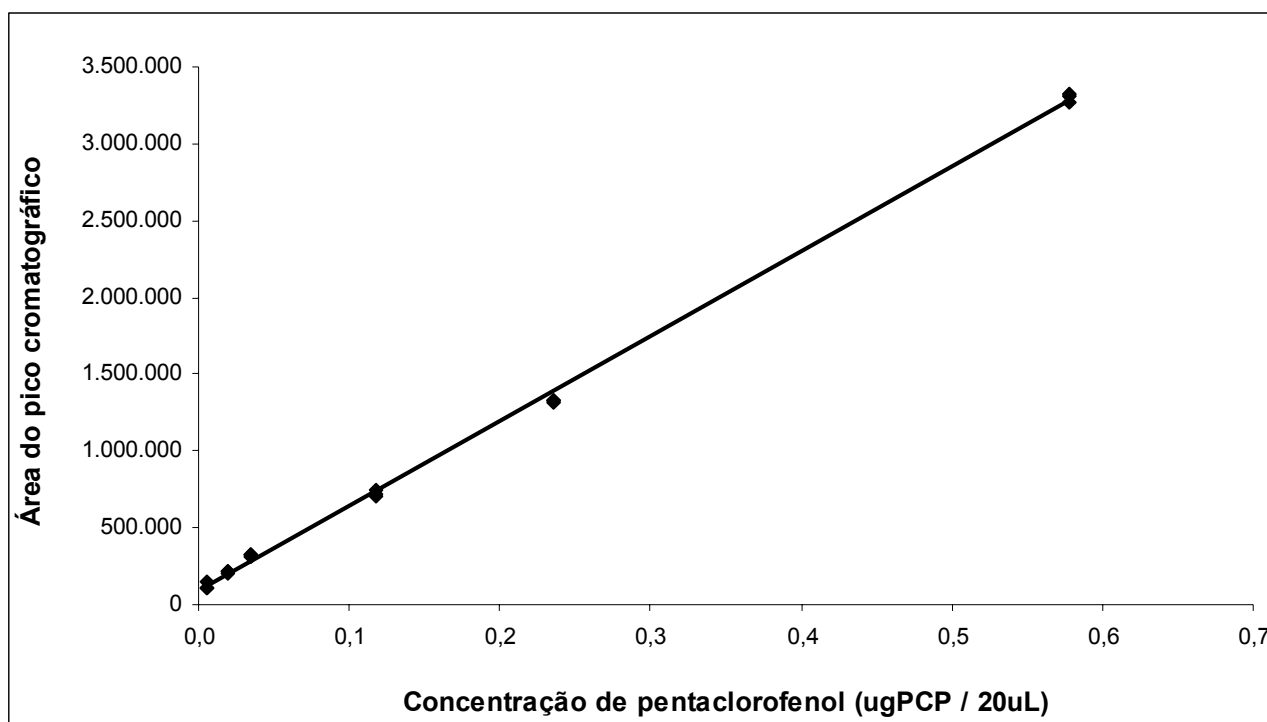
Equação da reta $y = 6000000x$, $r^2 = 0,9997$.



ANEXO 3

A: Curva padrão com concentrações conhecidas de pentaclorofenol, utilizada para quantificação de pentaclorofenol recuperado.

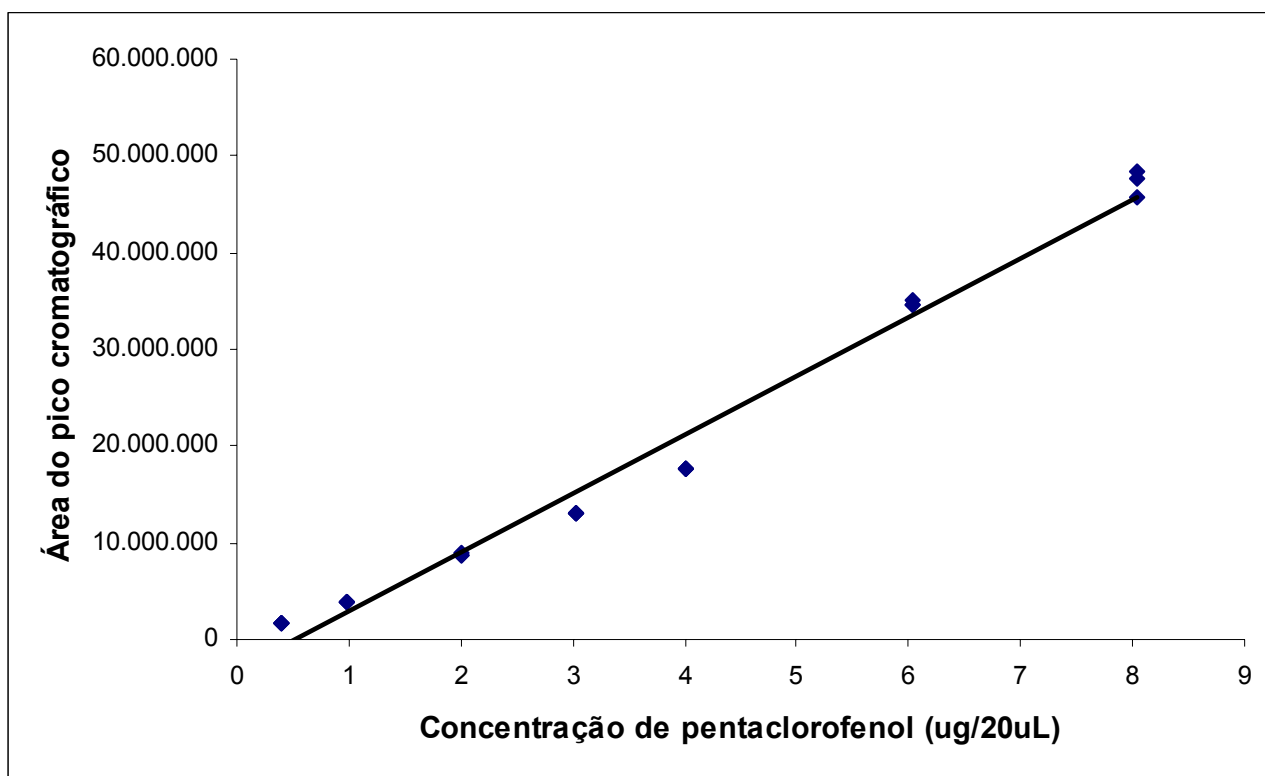
Equação da reta $y = 6000000x + 92782$, $r^2 = 0,999$.



Continuação

B: Curva padrão com concentrações conhecidas de pentaclorofenol, utilizada para quantificação de pentaclorofenol recuperado.

Equação da reta $y = 6000000x - 3000000$, $r^2 = 0,9822$.



ANEXO 4

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Peroxidasas (substrato sólido) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	8	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASES (SUBSTRATO SÓLIDO), USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor- <i>P</i>
Tempo	7	19,782	19,782	2,826	2,32	0,081
Erro	15	18,267	18,267	1,218		
Total	22	38,049				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: PEROXIDASE (SUBSTRATO SÓLIDO) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor- <i>P</i>
5	10	1,3890	0,9010	0,7751
	15	1,5742	0,9010	0,6603
	20	0,5402	0,9010	0,9983
	25	-0,3704	0,9010	0,9999
	30	-0,6636	0,9010	0,9941
	35	-0,9260	0,9010	0,9624
	40	-0,9260	1,0074	0,9792
10	15	0,185	0,9010	1,0000
	20	-0,849	0,9010	0,9762
	25	-1,759	0,9010	0,5397
	30	-2,053	0,9010	0,3638
	35	-2,315	0,9010	0,2399
	40	-2,315	1,0074	0,3542
15	20	-1,034	0,9010	0,9350
	25	-1,945	0,9010	0,4248
	30	-2,238	0,9010	0,2726
	35	-2,500	0,9010	0,1738
	40	-2,500	1,0074	0,2733
20	5	-0,911	0,9010	0,9655
	30	-1,204	0,9010	-0,8713
	35	-1,466	0,9010	0,7288
	40	-1,466	1,0074	0,8183
25	30	-0,2932	0,9010	1,0000
	35	-0,5556	0,9010	0,9980
	40	-0,5556	1,0074	0,9990
30	35	-0,2624	0,9010	1,0000
	40	-0,2624	1,0074	1,0000
35	40	0,0000	1,007	1,0000

ANEXO 5

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Lacase (substrato sólido) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	8	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE (SUBSTRATO SÓLIDO), USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor- <i>P</i>
Tempo	7	930,37	930,37	132,91	80,28	0,000***
Erro	15	24,83	24,83	1,66		
Total	22	955,20				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: LACASE (SUBSTRATO SÓLIDO) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor- <i>P</i>
5	10	6,17	1,051	0,0006***
	15	-8,58	1,051	0,0000***
	20	-10,70	1,051	0,0000***
	25	-11,42	1,051	0,0000***
	30	-11,42	1,051	0,0000***
	35	-11,42	1,051	0,0000***
	40	-11,42	1,175	0,0000***
10	15	-14,75	1,051	0,0000***
	20	-16,87	1,051	0,0000***
	25	-17,59	1,051	0,0000***
	30	-17,59	1,051	0,0000***
	35	-17,59	1,051	0,0000***
	40	-17,59	1,175	0,0000***
15	20	-2,114	1,051	0,5051
	25	-2,840	1,051	0,1949
	30	-2,840	1,051	0,1949
	35	-2,840	1,051	-0,1949
	40	-2,840	1,175	0,2999
20	25	-0,7254	1,051	0,9960
	30	-0,7254	1,051	0,9960
	35	-0,7254	1,051	0,9960
	40	-0,7254	1,175	0,9980
25	30	-0,0000	1,051	1,0000
	35	-0,0000	1,051	1,0000
	40	0,0000	1,175	1,0000
30	35	-0,0000	1,051	1,0000
	40	0,0000	1,175	1,0000
35	40	0,0000	1,175	1,0000

ANEXO 6

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP (substrato sólido) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	8	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MnP (SUBSTRATO SÓLIDO), USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	7	7115,8	7115,8	1016,5	61,66	0,000***
Erro	15	247,3	247,3	16,5		
Total	22	7363,1				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: MnP (SUBTRATO SÓLIDO) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	52,9854	3,315	0,0000***
	15	9,7062	3,315	0,1351
	20	0,7333	3,315	1,0000
	25	0,3485	3,315	1,0000
	30	0,0909	3,315	1,0000
	35	-0,0242	3,315	1,0000
	40	-0,1061	3,707	1,0000
10	15	-43,28	3,315	0,0000***
	20	-52,25	3,315	0,0000***
	25	-52,64	3,315	0,0000***
	30	-52,89	3,315	0,0000***
	35	-53,01	3,315	0,0000***
	40	-53,09	3,707	0,0000***
15	20	-8,973	3,315	0,1939
	25	-9,358	3,315	0,1608
	30	-9,615	3,315	0,1414
	35	-9,730	3,315	0,1335
	40	-9,812	3,707	0,2128
20	25	-0,3849	3,315	1,0000
	30	-0,6424	3,315	1,0000
	35	-0,7576	3,315	1,0000
	40	-0,8394	3,707	1,0000
25	30	-0,2576	3,315	1,0000
	35	-0,3727	3,315	1,0000
	40	-0,4545	3,707	1,0000
30	35	-0,1152	3,315	1,0000
	40	-0,1970	3,707	1,0000
35	40	-0,08182	3,707	1,0000

ANEXO 7

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **mg ergosterol g⁻¹ massa seca (substrato sólido) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	10; 15; 20; 25; 30; 37; 5; 50; 60; 70

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA mg ERGOSTEROL g⁻¹ MASSA SECA (SUBSTRATO SÓLIDO), USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	16410,0	16410,0	1823,3	11,62	0,000***
Erro	18	2824,1	2824,1	156,9		
Total	27	19234,1				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: mg ERGOSTEROL g⁻¹ MASSA SECA (SUBSTRATO SÓLIDO) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
10	15	-20,75	10,23	0,5921
	20	-4,70	11,43	1,0000
	25	16,18	10,23	0,8405
	30	21,45	10,23	0,5507
	37	31,24	10,23	0,1347
	5	17,50	11,43	0,8630
	50	34,22	10,23	0,0791*
	60	64,35	10,23	0,0002***
	70	46,68	10,23	0,0069***
15	20	16,05	11,43	0,9109
	25	36,92	10,23	0,0477**
	30	42,20	10,23	0,0170**
	37	51,99	10,23	0,0024***
	5	38,25	11,43	0,0792*
	50	54,96	10,23	0,0013***
	60	85,10	10,23	0,0000***
	70	67,42	10,23	0,0001***
20	25	20,88	11,43	0,7129
	30	26,15	11,43	0,4404
	37	35,94	11,43	0,1150
	5	22,20	12,53	0,7431
	50	38,92	11,43	0,0710*
	60	69,05	11,43	0,0004***
	70	51,38	11,43	0,0080***
25	30	5,273	10,23	0,9999
	37	15,064	10,23	0,8862

Continuação

	5	1,325	11,43	1,0000
	50	18,040	10,23	0,7478
	60	48,173	10,23	0,0051***
	70	30,501	10,23	0,1528
30	37	9,791	10,23	0,9914
	5	-3,948	11,43	1,0000
	50	12,767	10,23	0,9533
	60	42,900	10,23	0,0148**
	70	25,229	10,23	0,3460
37	5	-13,74	11,43	0,9627
	50	2,98	10,23	1,0000
	60	33,11	10,23	0,0968*
	70	15,44	10,23	0,8718
5	50	16,71	11,43	0,8904
	60	46,85	11,43	0,0180**
	70	29,18	11,43	0,3061
50	60	30,13	10,23	0,1626
	70	12,46	10,23	0,9595
60	70	-17,67	10,23	0,7675

ANEXO 8

A: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Peroxidases - tratamento com inóculo de 5 dias (T5) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASES T5, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0054069	0,0054069	0,0006008	1,24	0,326
Erro	20	0,0096815	0,0096815	0,0004841		
Total	29	0,0150884				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P<0,1$).

B: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Peroxidases - tratamento com inóculo de 10 dias (T10) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASES T10, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0112202	0,0112202	0,0012467	1,36	0,270
Erro	20	0,0183392	0,0183392	0,0009170		
Total	29	0,0295595				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P<0,1$).

C: Delineamento experimental inteiramente casualizado

Continuação

General Linear Model: **Peroxidases - tratamento com inóculo de 15 dias (T15) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASES T15, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,016012	0,016012	0,001779	1,19	0,351
Erro	20	0,029802	0,029802	0,001490		
Total	29	0,045815				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P<0,1$),

D: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Peroxidases - tratamento com inóculo de 20 dias (T20) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PEROXIDASES T20, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0055947	0,0055947	0,0006216	1,31	0,290
Erro	20	0,0094635	0,0094635	0,0004732		
Total	29	0,0150582				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 9

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de Lacase - tratamento com inóculo de 5 dias (T5)**

versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T5, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,735277	0,735277	0,081697	54,67	0,000***
Erro	20	0,029885	0,029885	0,001494		
Total	29	0,765162				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T5 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,0434	0,03156	0,9217
	15	0,1495	0,03156	0,0039***
	20	0,2102	0,03156	0,0001***
	25	0,3616	0,03156	0,0000***
	30	0,0555	0,03156	0,7522
	35	0,0279	0,03156	0,9953
	40	-0,1011	0,03156	0,0975*
	50	-0,1511	0,03156	0,0035***
	60	-0,1659	0,03156	0,0013***
10	15	0,1061	0,03156	0,0716*
	20	0,1668	0,03156	0,0012***
	25	0,3182	0,03156	0,0000***
	30	0,0121	0,03156	1,0000
	35	-0,0155	0,03156	1,0000
	40	-0,1444	0,03156	0,0055***
	50	-0,1945	0,03156	0,0002***
	60	-0,2093	0,03156	0,0001***
15	20	0,0607	0,03156	0,6546
	25	0,2121	0,03156	0,0001***
	30	-0,0940	0,03156	0,1476
	35	-0,1216	0,03156	0,0263**
	40	-0,2505	0,03156	0,0000***
	50	-0,3006	0,03156	0,0000***
	60	-0,3154	0,03156	0,0000***
20	25	0,1514	0,03156	0,0034***
	30	-0,1547	0,03156	0,0027***

Continuação

	35	-0,1823	0,03156	0,0004***
	40	-0,3113	0,03156	0,0000***
	50	-0,3613	0,03156	0,0000***
	60	-0,3761	0,03156	0,0000***
25	30	-0,3061	0,03156	0,0000***
	35	-0,3337	0,03156	0,0000***
	40	-0,4626	0,03156	0,0000***
	50	-0,5127	0,03156	0,0000***
	60	-0,5275	0,03156	0,0000***
30	35	-0,0276	0,03156	0,9957
	40	-0,1565	0,03156	0,0024***
	50	-0,2066	0,03156	0,0001***
	60	-0,2214	0,03156	0,0001***
35	40	-0,1289	0,03156	0,0160**
	50	-0,1790	0,03156	0,0005***
	60	-0,1938	0,03156	0,0002***
40	50	-0,05003	0,03156	0,8403
	60	-0,06487	0,03156	0,5746
50	60	-0,01483	0,03156	1,0000

ANEXO 10

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de MnP - tratamento com inóculo de 5 dias (T5)**

versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA MnP T5, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0042413	0,0042413	0,0004713	2,98	0,020**
Erro	20	0,0031601	0,0031601	0,0001580		
Total	29	0,0074015				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T5 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-0,00300	0,01026	1,0000
	15	-0,01763	0,01026	0,7737
	20	0,00300	0,01026	1,0000
	25	0,01450	0,01026	0,9092
	30	-0,01027	0,01026	0,9888
	35	-0,01153	0,01026	0,9760
	40	-0,00663	0,01026	0,9996
	50	-0,02323	0,01026	0,4501
	60	-0,02680	0,01026	0,2743
10	15	-0,01463	0,01026	0,9048
	20	0,00600	0,01026	0,9998
	25	0,01750	0,01026	0,7807
	30	-0,00727	0,01026	0,9991
	35	-0,00853	0,01026	0,9970
	40	-0,00363	0,01026	1,0000
	50	-0,02023	0,01026	0,6259
	60	-0,02380	0,01026	0,4189
15	20	0,020633	0,01026	0,6021
	25	0,032133	0,01026	0,1116
	30	0,007367	0,01026	0,9990
	35	0,006100	0,01026	0,9998
	40	0,011000	0,01026	0,9823
	50	-0,005600	0,01026	0,9999
	60	-0,009167	0,01026	0,9949
20	25	0,01150	0,01026	0,9764
	30	-0,01327	0,01026	0,9441

Continuação

	35	-0,01453	0,01026	0,9081
	40	-0,00963	0,01026	0,9928
	50	-0,02623	0,01026	0,2987
	60	-0,02980	0,01026	0,1686
25	30	-0,02477	0,01026	0,3683
	35	-0,02603	0,01026	0,3076
	40	-0,02113	0,01026	0,5722
	50	-0,03773	0,01026	0,0379**
	60	-0,04130	0,01026	0,0183**
30	35	-0,00127	0,01026	1,0000
	40	0,00363	0,01026	1,0000
	50	-0,01297	0,01026	0,9510
	60	-0,01653	0,01026	0,8283
35	40	0,00490	0,01026	1,0000
	50	-0,01170	0,01026	0,9737
	60	-0,01527	0,01026	0,8820
40	50	-0,01660	0,01026	0,8252
	60	-0,02017	0,01026	0,6299
50	60	-0,00356	0,01026	1,0000

ANEXO 11

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de descoloração do RBBR - tratamento com inóculo de 5 dias**

(T5) versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T5, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	270,966	270,966	30,107	52,04	0,000***
Erro	19	10,992	10,992	0,579		
Total	28	281,958				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T5 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	2,517	0,6943	0,0442**
	15	3,917	0,6943	0,0007***
	20	4,150	0,6943	0,0003***
	25	4,750	0,6943	0,0001***
	30	1,983	0,6943	0,1860
	35	-0,417	0,6943	0,9998
	40	-0,417	0,6943	0,9998
	50	-4,117	0,6943	0,0004***
	60	-3,883	0,6943	0,0007***
10	15	1,400	0,6210	0,4570
	20	1,633	0,6210	0,2690
	25	2,233	0,6210	0,0467**
	30	-0,533	0,6210	0,9961
	35	-2,933	0,6210	0,0045***
	40	-2,933	0,6210	0,0045***
	50	-6,633	0,6210	0,0000***
	60	-6,400	0,6210	0,0000***
15	20	0,233	0,6210	1,0000
	25	0,833	0,6210	0,9305
	30	-1,933	0,6210	0,1182
	35	-4,333	0,6210	0,0001***
	40	-4,333	0,6210	0,0001***
	50	-8,033	0,6210	0,0000***
	60	-7,800	0,6210	0,0000***
20	25	0,600	0,6210	0,9910
	30	-2,167	0,6210	0,0578*

Continuação

	35	-4,567	0,6210	0,0000***
	40	-4,567	0,6210	0,0000***
	50	-8,267	0,6210	0,0000***
	60	-8,033	0,6210	0,0000***
25	30	-2,767	0,6210	0,0079***
	35	-5,167	0,6210	0,0000***
	40	-5,167	0,6210	0,0000***
	50	-8,867	0,6210	0,0000***
	60	-8,633	0,6210	0,0000***
30	35	-2,400	0,6210	0,0271**
	40	-2,400	0,6210	0,0271**
	50	-6,100	0,6210	0,0000***
	60	-5,867	0,6210	0,0000***
35	40	0,000	0,6210	1,0000
	50	-3,700	0,6210	0,0004***
	60	-3,467	0,6210	0,0007***
40	50	-3,700	0,6210	0,0004***
	60	-3,467	0,6210	0,0007***
50	60	0,2333	0,6210	1,0000

ANEXO 12

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de Lacase - tratamento com inóculo de 10 dias**

(T10) versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T10, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	1,11026	1,11026	0,12336	51,90	0,000***
Erro	20	0,04754	0,04754	0,00238		
Total	29	1,15780				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T10 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,0641	0,03981	0,8290
	15	0,2058	0,03981	0,0015***
	20	0,2683	0,03981	0,0001***
	25	0,3717	0,03981	0,0000***
	30	0,3494	0,03981	0,0000***
	35	-0,0298	0,03981	-0,9986
	40	-0,0653	0,03981	0,8135
	50	-0,1556	0,03981	0,0233**
	60	-0,1767	0,03981	0,0075***
10	15	0,1417	0,03981	0,0481**
	20	0,2042	0,03981	0,0017***
	25	0,3077	0,03981	0,0000***
	30	0,2853	0,03981	0,0000***
	35	-0,0939	0,03981	0,3975
	40	-0,1294	0,03981	0,0889*
	50	-0,2197	0,03981	0,0007***
	60	-0,2407	0,03981	0,0002***
15	20	0,0625	0,03981	0,8476
	25	0,1659	0,03981	0,0134**
	30	0,1436	0,03981	0,0437**
	35	-0,2356	0,03981	0,0003***
	40	-0,2711	0,03981	0,0001***
	50	-0,3614	0,03981	0,0000***
	60	-0,3825	0,03981	0,0000***
20	25	0,1035	0,03981	0,2795
	30	0,0811	0,03981	0,5850

Continuação

	35	-0,2981	0,03981	0,0000***
	40	-0,3336	0,03981	0,0000***
	50	-0,4239	0,03981	0,0000***
	60	-0,4449	0,03981	0,0000***
25	30	-0,0223	0,03981	0,9999
	35	-0,4015	0,03981	0,0000***
	40	-0,4371	0,03981	0,0000***
	50	-0,5274	0,03981	0,0000***
	60	-0,5484	0,03981	0,0000***
30	35	-0,3792	0,03981	0,0000***
	40	-0,4147	0,03981	0,0000***
	50	-0,5050	0,03981	0,0000***
	60	-0,5261	0,03981	0,0000***
35	40	-0,0355	0,03981	0,9950
	50	-0,1258	0,03981	0,1054*
	60	-0,1469	0,03981	0,0369**
40	50	-0,0903	0,03981	0,4473
	60	-0,1113	0,03981	0,2027
50	60	-0,02103	0,03981	0,9999

ANEXO 13

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de MnP - tratamento com inóculo de 10 dias (T10)**

versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T10, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0110254	0,0110254	0,0012250	16,16	0,000***
Erro	20	0,0015160	0,0015160	0,0000758		
Total	29	0,0125413				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T10 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,00020	0,007109	1,0000
	15	0,00163	0,007109	1,0000
	20	0,01267	0,007109	0,7385
	25	0,04410	0,007109	0,0002***
	30	0,04757	0,007109	0,0001***
	35	-0,00313	0,007109	1,0000
	40	0,00060	0,007109	1,0000
	50	-0,00083	0,007109	1,0000
	60	-0,01120	0,007109	0,8447
10	15	0,00183	0,007109	1,0000
	20	0,01287	0,007109	0,7224
	25	0,04430	0,007109	0,0002***
	30	0,04777	0,007109	0,0001***
	35	-0,00293	0,007109	1,0000
	40	0,00080	0,007109	1,0000
	50	-0,00063	0,007109	1,0000
	60	-0,01100	0,007109	0,8572
15	20	0,01103	0,007109	0,8552
	25	0,04247	0,007109	0,0003***
	30	0,04593	0,007109	0,0001***
	35	-0,00477	0,007109	0,9994
	40	-0,00103	0,007109	1,0000
	50	-0,00247	0,007109	1,0000
	60	-0,01283	0,007109	0,7251
20	25	0,03143	0,007109	0,0078***
	30	0,03490	0,007109	0,0027***

Continuação

	35	-0,01580	0,007109	0,4738
	40	-0,01207	0,007109	0,7847
	50	-0,01350	0,007109	0,6698
	60	-0,02387	0,007109	0,0722*
25	30	0,00347	0,007109	1,0000
	35	-0,04723	0,007109	0,0001***
	40	-0,04350	0,007109	0,0002***
	50	-0,04493	0,007109	0,0001***
	60	-0,05530	0,007109	0,0000***
30	35	-0,05070	0,007109	0,0000***
	40	-0,04697	0,007109	0,0001***
	50	-0,04840	0,007109	0,0001***
	60	-0,05877	0,007109	0,0000***
35	40	0,003733	0,007109	0,9999
	50	0,002300	0,007109	1,0000
	60	-0,008067	0,007109	0,9744
40	50	-0,00143	0,007109	1,0000
	60	-0,01180	0,007109	0,8041
50	60	-0,01037	0,007109	0,8931

ANEXO 14

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de descoloração do RBBR - tratamento com inóculo de 10 dias (T10) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T10, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	283,125	283,125	31,458	30,46	0,000***
Erro	20	20,653	20,653	1,033		
Total	29	303,779				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T10 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-1,800	0,8297	0,5053
	15	2,367	0,8297	0,1843
	20	2,000	0,8297	0,3697
	25	3,033	0,8297	0,0396**
	30	4,033	0,8297	0,0030***
	35	-2,733	0,8297	0,0817*
	40	-3,267	0,8297	0,0220**
	50	-3,200	0,8297	0,0261**
	60	-5,500	0,8297	0,0001***
10	15	4,167	0,8297	0,0021***
	20	3,800	0,8297	0,0055***
	25	4,833	0,8297	0,0004***
	30	5,833	0,8297	0,0001***
	35	-0,933	0,8297	0,9758
	40	-1,467	0,8297	0,7465
	50	-1,400	0,8297	0,7901
	60	-3,700	0,8297	0,0072***
15	20	-0,367	0,8297	1,0000
	25	0,667	0,8297	0,9977
	30	1,667	0,8297	0,6031
	35	-5,100	0,8297	0,0002***
	40	-5,633	0,8297	0,0001***
	50	-5,567	0,8297	0,0001***
	60	-7,867	0,8297	0,0000***
20	25	1,033	0,8297	0,9549
	30	2,033	0,8297	0,3491

Continuação

	35	-4,733	0,8297	0,0005***
	40	-5,267	0,8297	0,0001***
	50	-5,200	0,8297	0,0002***
	60	-7,500	0,8297	0,0000***
25	30	1,000	0,8297	0,9629
	35	-5,767	0,8297	-0,0001***
	40	-6,300	0,8297	0,0000***
	50	-6,233	0,8297	0,0000***
	60	-8,533	0,8297	0,0000***
30	35	-6,767	0,8297	0,0000***
	40	-7,300	0,8297	0,0000***
	50	-7,233	0,8297	0,0000***
	60	-9,533	0,8297	0,0000***
35	40	-0,533	0,8297	0,9996
	50	-0,467	0,8297	0,9999
	60	-2,767	0,8297	0,0755*
40	50	0,067	0,8297	1,0000
	60	-2,233	0,8297	0,2413
50	60	-2,300	0,8297	0,2113

ANEXO 15

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de Lacase - tratamento com inóculo de 15 dias (T15) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T15, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,92128	0,92128	0,10236	14,90	0,000***
Erro	20	0,13740	0,13740	0,00687		
Total	29	1,05868				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T15 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,1090	0,06768	0,8284
	15	0,2649	0,06768	0,0231**
	20	0,3586	0,06768	0,0012***
	25	0,3041	0,06768	0,0066***
	30	0,3876	0,06768	0,0005***
	35	0,3138	0,06768	0,0049***
	40	0,0603	0,06768	0,9950
	50	-0,1045	0,06768	-0,8587
	60	-0,0689	0,06768	0,9874
10	15	0,1559	0,06768	0,4277
	20	0,2496	0,06768	0,0370**
	25	0,1951	0,06768	0,1747
	30	0,2786	0,06768	0,0150**
	35	0,2048	0,06768	0,1353
	40	-0,0487	0,06768	0,9990
	50	-0,2135	0,06768	0,1067*
	60	-0,1779	0,06768	0,2668
15	20	0,0937	0,06768	0,9182
	25	0,0393	0,06768	0,9998
	30	0,1227	0,06768	0,7206
	35	0,0490	0,06768	0,9990
	40	-0,2045	0,06768	0,1364
	50	-0,3694	0,06768	0,0008***
	60	-0,3338	0,06768	0,0026***
20	25	-0,0545	0,06768	0,9976
	30	0,0290	0,06768	1,0000

Continuação

	35	-0,0448	0,06768	0,9995
	40	-0,2983	0,06768	0,0080***
	50	-0,4631	0,06768	0,0001***
	60	-0,4275	0,06768	0,0002***
25	30	0,0834	0,06768	0,9576
	35	0,0097	0,06768	1,0000
	40	-0,2438	0,06768	0,0442**
	50	-0,4086	0,06768	0,0003***
	60	-0,3730	0,06768	0,0007***
30	35	-0,0737	0,06768	0,9803
	40	-0,3272	0,06768	0,0032***
	50	-0,4921	0,06768	0,0000***
	60	-0,4565	0,06768	0,0001***
35	40	-0,2535	0,06768	0,0329**
	50	-0,4183	0,06768	0,0002***
	60	-0,3827	0,06768	0,0005***
40	50	-0,1648	0,06768	0,3567
	60	-0,1292	0,06768	0,6635
50	60	0,03560	0,06768	0,9999

ANEXO 16

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de MnP - tratamento com inóculo de 15 dias (T15)**

versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T15, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0009604	0,0009604	0,0001067	4,09	0,004***
Erro	20	0,0005218	0,0005218	0,0000261		
Total	29	0,0014821				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T15 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,002633	0,004170	0,9996
	15	0,002733	0,004170	0,9995
	20	0,012933	0,004170	0,1179
	25	0,009500	0,004170	0,4419
	30	0,017033	0,004170	0,0161**
	35	0,010600	0,004170	0,3052
	40	0,005433	0,004170	0,9416
	50	0,001600	0,004170	1,0000
	60	-0,000300	0,004170	1,0000
10	15	0,000100	0,004170	1,0000
	20	0,010300	0,004170	0,3396
	25	0,006867	0,004170	0,8109
	30	0,014400	0,004170	0,0597*
	35	0,007967	0,004170	0,6631
	40	0,002800	0,004170	0,9994
	50	-0,001033	0,004170	1,0000
	60	-0,002933	0,004170	0,9992
15	20	0,010200	0,004170	0,3516
	25	0,006767	0,004170	0,8227
	30	0,014300	0,004170	0,0627**
	35	0,007867	0,004170	0,6775
	40	0,002700	0,004170	0,9996
	50	-0,001133	0,004170	1,0000
	60	-0,003033	0,004170	0,9989
20	25	-0,00343	0,004170	0,9972
	30	0,00410	0,004170	0,9901

Continuação

	35	-0,00233	0,004170	0,9999
	40	-0,00750	0,004170	0,7291
	50	-0,01133	0,004170	0,2313
	60	-0,01323	0,004170	0,1030*
25	30	0,007533	0,004170	0,7245
	35	0,001100	0,004170	1,0000
	40	-0,004067	0,004170	-0,9906
	50	-0,007900	0,004170	0,6727
	60	-0,009800	0,004170	0,4019
30	35	-0,00643	0,004170	0,8593
	40	-0,01160	0,004170	0,2080
	50	-0,01543	0,004170	0,0361**
	60	-0,01733	0,004170	0,0138**
35	40	-0,00517	0,004170	0,9563
	50	-0,00900	0,004170	0,5121
	60	-0,01090	0,004170	0,2732
40	50	-0,003833	0,004170	0,9938
	60	-0,005733	0,004170	0,9214
50	60	-0,001900	0,004170	1,0000

ANEXO 17

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de descoloração do RBBR - tratamento com inóculo de 15 dias (T15) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T15, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	288,148	288,148	32,016	18,00	0,000***
Erro	20	35,580	35,580	1,779		
Total	29	323,728				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T15 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	2,167	1,089	0,6149
	15	1,267	1,089	0,9702
	20	1,300	1,089	0,9650
	25	7,433	1,089	0,0001***
	30	5,333	1,089	0,0028***
	35	4,500	1,089	0,0145**
	40	0,167	1,089	1,0000
	50	-3,300	1,089	0,1344
	60	-1,667	1,089	0,8645
10	15	-0,900	1,089	0,9971
	20	-0,867	1,089	0,9978
	25	5,267	1,089	0,0031***
	30	3,167	1,089	0,1674
	35	2,333	1,089	0,5214
	40	-2,000	1,089	0,7070
	50	-5,467	1,089	0,0021***
	60	-3,833	1,089	0,0522*
15	20	0,033	1,089	1,0000
	25	6,167	1,089	0,0005***
	30	4,067	1,089	0,0337**
	35	3,233	1,089	0,1501
	40	-1,100	1,089	0,9881
	50	-4,567	1,089	0,0127**
	60	-2,933	1,089	0,2405
20	25	6,133	1,089	0,0006***
	30	4,033	1,089	0,0359**

Continuação

	35	3,200	1,089	0,1585
	40	-1,133	1,089	0,9854
	50	-4,600	1,089	0,0119**
	60	-2,967	1,089	0,2288
25	30	-2,10	1,089	0,6522
	35	-2,93	1,089	0,2405
	40	-7,27	1,089	0,0001***
	50	-10,73	1,089	0,0000***
	60	-9,10	1,089	0,0000***
30	35	-0,833	1,089	0,9984
	40	-5,167	1,089	0,0038***
	50	-8,633	1,089	0,0000***
	60	-7,000	1,089	0,0001***
35	40	-4,333	1,089	0,0201**
	50	-7,800	1,089	0,0000***
	60	-6,167	1,089	0,0005***
40	50	-3,467	1,089	0,1011*
	60	-1,833	1,089	0,7921
50	60	1,633	1,089	0,8771

ANEXO 18

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de Lacase - tratamento com inóculo de 20 dias**

(T20) versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T20, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,365460	0,365460	0,040607	14,62	0,000***
Erro	20	0,055554	0,055554	0,002778		
Total	29	0,421013				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LACASE T20 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-0,0016	0,04303	1,0000
	15	0,0510	0,04303	0,9664
	20	0,0851	0,04303	0,6222
	25	0,1756	0,04303	0,0162**
	30	0,1797	0,04303	0,0132**
	35	0,1506	0,04303	0,0545*
	40	-0,0467	0,04303	0,9807
	50	-0,1097	0,04303	0,3014
	60	-0,1516	0,04303	0,0518*
10	15	0,0526	0,04303	0,9597
	20	0,0867	0,04303	0,5998
	25	0,1772	0,04303	0,0150**
	30	0,1812	0,04303	0,0122**
	35	0,1521	0,04303	0,0506**
	40	-0,0452	0,04303	-0,9846
	50	-0,1082	0,04303	0,3184
	60	-0,1501	0,04303	0,0558*
15	20	0,0341	0,04303	0,9979
	25	0,1246	0,04303	0,1710
	30	0,1286	0,04303	0,1448
	35	0,0995	0,04303	0,4222
	40	-0,0978	0,04303	0,4453
	50	-0,1608	0,04303	0,0335**
	60	-0,2027	0,04303	0,0041***
20	25	0,0905	0,04303	0,5449
	30	0,0946	0,04303	0,4886

Continuação

	35	0,0655	0,04303	0,8683
	40	-0,1318	0,04303	0,1264
	50	-0,1948	0,04303	0,0062***
	60	-0,2367	0,04303	0,0008***
25	30	0,0040	0,04303	1,0000
	35	-0,0251	0,04303	0,9998
	40	-0,2224	0,04303	0,0015***
	50	-0,2854	0,04303	0,0001***
	60	-0,3273	0,04303	0,0000***
30	35	-0,0291	0,04303	0,9994
	40	-0,2264	0,04303	0,0013***
	50	-0,2894	0,04303	0,0001***
	60	-0,3313	0,04303	0,0000***
35	40	-0,1973	0,04303	0,0054***
	50	-0,2603	0,04303	0,0002***
	60	-0,3022	0,04303	0,0001***
40	50	-0,0630	0,04303	0,8910
	60	-0,1049	0,04303	0,3557
50	60	-0,0419	0,04303	0,9907

ANEXO 19

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade específica de MnP - tratamento com inóculo de 20 dias (T20)**

versus Tempo de incubação

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T20, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	0,0003536	0,0003536	0,0000393	2,49	0,043**
Erro	20	0,0003159	0,0003159	0,0000158		
Total	29	0,0006694				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE ESPECÍFICA DE MnP T20 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,003733	0,003245	0,9721
	15	-0,000767	0,003245	1,0000
	20	-0,001900	0,003245	0,9998
	25	0,001867	0,003245	0,9998
	30	0,003633	0,003245	0,9765
	35	0,010100	0,003245	0,1154
	40	-0,000700	0,003245	1,0000
	50	0,005300	0,003245	0,8174
	60	0,000633	0,003245	1,0000
10	15	-0,004500	0,003245	0,9177
	20	-0,005633	0,003245	0,7640
	25	-0,001867	0,003245	0,9998
	30	-0,000100	0,003245	1,0000
	35	0,006367	0,003245	0,6316
	40	-0,004433	0,003245	0,9240
	50	0,001567	0,003245	1,0000
	60	-0,003100	0,003245	0,9919
15	20	-0,001133	0,003245	1,0000
	25	0,002633	0,003245	0,9975
	30	0,004400	0,003245	0,9271
	35	0,010867	0,003245	0,0734*
	40	0,000067	0,003245	1,0000
	50	0,006067	0,003245	0,6875
	60	0,001400	0,003245	1,0000
20	25	0,003767	0,003245	0,9705
	30	0,005533	0,003245	0,7806

Continuação

	35	0,012000	0,003245	0,0363**
	40	0,001200	0,003245	1,0000
	50	0,007200	0,003245	0,4760
	60	0,002533	0,003245	0,9981
25	30	0,001767	0,003245	0,9999
	35	0,008233	0,003245	0,3073
	40	-0,002567	0,003245	0,9979
	50	0,003433	0,003245	0,9837
	60	-0,001233	0,003245	1,0000
30	35	0,006467	0,003245	0,6128
	40	-0,004333	0,003245	0,9329
	50	0,001667	0,003245	0,9999
	60	-0,00300	0,003245	0,9935
35	40	-0,01080	0,003245	0,0764*
	50	-0,00480	0,003245	0,8852
	60	-0,00947	0,003245	0,1645
40	50	0,006000	0,003245	0,6996
	60	0,001333	0,003245	1,0000
50	60	-0,004667	0,003245	0,9004

ANEXO 20

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de descoloração do RBBR - tratamento com inóculo de 20 dias (T20) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T20, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	108,640	108,640	12,071	9,78	0,000***
Erro	20	24,680	24,680	1,234		
Total	29	133,320				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE DESCOLORAÇÃO DO RBBR T20 POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-0,767	0,9070	0,9966
	15	0,800	0,9070	0,9954
	20	1,133	0,9070	0,9541
	25	1,800	0,9070	0,6179
	30	1,100	0,9070	0,9615
	35	1,267	0,9070	0,9146
	40	-2,833	0,9070	0,1130
	50	-3,467	0,9070	0,0280**
	60	-3,033	0,9070	0,0741*
10	15	1,567	0,9070	0,7688
	20	1,900	0,9070	0,5504
	25	2,567	0,9070	0,1916
	30	1,867	0,9070	0,5729
	35	2,033	0,9070	0,4627
	40	-2,067	0,9070	0,4416
	50	-2,700	0,9070	0,1480
	60	-2,267	0,9070	0,3253
15	20	0,333	0,9070	1,0000
	25	1,000	0,9070	0,9787
	30	0,300	0,9070	1,0000
	35	0,467	0,9070	0,9999
	40	-3,633	0,9070	0,0190**
	50	-4,267	0,9070	0,0042***
	60	-3,833	0,9070	0,0118**
20	25	0,667	0,9070	0,9988
	30	-0,033	0,9070	1,0000

Continuação

	35	0,133	0,9070	1,0000
	40	-3,967	0,9070	0,0086***
	50	-4,600	0,9070	0,0019***
	60	-4,167	0,9070	0,0053***
25	30	-0,700	0,9070	0,9983
	35	-0,533	0,9070	0,9998
	40	-4,633	0,9070	0,0017***
	50	-5,267	0,9070	0,0004***
	60	-4,833	0,9070	0,0011***
30	35	0,167	0,9070	1,0000
	40	-3,933	0,9070	0,0093***
	50	-4,567	0,9070	0,0020***
	60	-4,133	0,9070	0,0058***
35	40	-4,100	0,9070	0,0063***
	50	-4,733	0,9070	0,0014***
	60	-4,300	0,9070	0,0039***
40	50	-0,6333	0,9070	0,9992
	60	-0,2000	0,9070	1,0000
50	60	0,4333	0,9070	1,0000

ANEXO 21

A: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Peroxidases T5 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE PEROXIDASES T5 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	887,97	887,97	98,66	1,60	0,183
Erro	20	1236,09	1236,09	61,80		
Total	29	2124,07				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P<0,1$).

B: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Peroxidases T10 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE PEROXIDASES T10 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	768,95	768,95	85,44	1,30	0,295
Erro	20	1309,91	1309,91	65,50		
Total	29	2078,85				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P<0,1$).

C: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Peroxidases T15 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Continuação

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE PEROXIDASES T15 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	2407,1	2407,1	267,5	1,38	0,259
Erro	20	3863,8	3863,8	193,2		
Total	29	6270,9				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$).

D: Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Perioxidases T20 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE PEROXIDASES T20 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	725,11	725,11	80,57	1,35	0,273
Erro	20	1190,92	1190,92	59,55		
Total	29	1916,03				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 22

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Lacase T5 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE T5 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	94410	94410	10490	63,70	0,000***
Erro	20	3294	3294	165		
Total	29	97704				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE LACASE T5 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	10,08	10,48	0,9914
	15	78,20	10,48	0,0000***
	20	101,04	10,48	0,0000***
	25	127,27	10,48	0,0000***
	30	43,62	10,48	0,0136**
	35	17,29	10,48	0,8093
	40	-23,74	10,48	0,4488
	50	-39,12	10,48	0,0337**
	60	-43,57	10,48	0,0137**
10	15	68,11	10,48	0,0001***
	20	90,95	10,48	0,0000***
	25	117,19	10,48	0,0000***
	30	33,54	10,48	0,0977*
	35	7,20	10,48	0,9993
	40	-33,82	10,48	0,0928*
	50	-49,20	10,48	0,0043***
	60	-53,66	10,48	0,0017***
15	20	22,8	10,48	0,4991
	25	49,1	10,48	0,0044***
	30	-34,6	10,48	0,0809*
	35	-60,9	10,48	0,0004***
	40	-101,9	10,48	0,0000***
	50	-117,3	10,48	0,0000***
	60	-121,8	10,48	0,0000***
20	25	26,2	10,48	0,3230
	30	-57,4	10,48	0,0008***
	35	-83,8	10,48	0,0000***
	40	-124,8	10,48	0,0000***
	50	-140,2	10,48	0,0000***

Continuação

	60	-144,6	10,48	0,0000***
25	30	-83,6	10,48	0,0000***
	35	-110,0	10,48	0,0000***
	40	-151,0	10,48	0,0000***
	50	-166,4	10,48	0,0000***
	60	-170,8	10,48	0,0000***
30	35	-26,34	10,48	0,3183
	40	-67,37	10,48	0,0001***
	50	-82,74	10,48	0,0000***
	60	-87,20	10,48	0,0000***
35	40	-41,03	10,48	0,0230**
	50	-56,40	10,48	0,0010***
	60	-60,86	10,48	0,0004***
40	50	-15,38	10,48	0,8897
	60	-19,83	10,48	0,6737
50	60	-4,455	10,48	1,0000

ANEXO 23

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Lacase T10 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE T10 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	72008,9	72008,9	8001,0	36,26	0,000***
Erro	20	4412,8	4412,8	220,6		
Total	29	76421,7				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE LACASE T10 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	13,80	12,13	0,9740
	15	55,77	12,13	0,0053***
	20	62,93	12,13	0,0015***
	25	87,33	12,13	0,0000***
	30	91,07	12,13	0,0000***
	35	-6,17	12,13	0,9999
	40	-17,00	12,13	0,9129
	50	-43,17	12,13	0,0482**
	60	-49,40	12,13	0,0165**
10	15	41,97	12,13	0,0589*
	20	49,13	12,13	0,0173**
	25	73,53	12,13	0,0002***
	30	77,27	12,13	0,0001***
	35	-19,97	12,13	0,8110
	40	-30,80	12,13	0,3062
	50	-56,97	12,13	0,0043***
	60	-63,20	12,13	0,0014***
15	20	7,2	12,13	0,9998
	25	31,6	12,13	0,2779
	30	35,3	12,13	0,1665
	35	-61,9	12,13	0,0018***
	40	-72,8	12,13	0,0003***
	50	-98,9	12,13	0,0000***
	60	-105,2	12,13	0,0000***
20	25	24,4	12,13	0,6012
	30	28,1	12,13	0,4185
	35	-69,1	12,13	0,0005***
	40	-79,9	12,13	0,0001***

Continuação

	50	-106,1	12,13	0,0000***
	60	-112,3	12,13	0,0000***
25	30	3,7	12,13	1,0000
	35	-93,5	12,13	0,0000***
	40	-104,3	12,13	0,0000***
	50	-130,5	12,13	0,0000***
	60	-136,7	12,13	0,0000***
30	35	-97,2	12,13	0,0000***
	40	-108,1	12,13	0,0000***
	50	-134,2	12,13	0,0000***
	60	-140,5	12,13	0,0000***
35	40	-10,83	12,13	0,9949
	50	-37,00	12,13	0,1294
	60	-43,23	12,13	0,0477**
40	50	-26,17	12,13	0,5125
	60	-32,40	12,13	0,2493
50	60	-6,233	12,13	0,9999

ANEXO 24

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Lacase T15 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE T15 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	136905	136905	15212	21,53	0,000***
Erro	20	14132	14132	707		
Total	29	151037				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE LACASE T15 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	38,37	21,70	0,7465
	15	72,20	21,70	0,0767**
	20	90,50	21,70	0,0134**
	25	163,80	21,70	0,0000***
	30	160,73	21,70	0,0000***
	35	132,00	21,70	0,0002***
	40	35,43	21,70	0,8178
	50	-29,33	21,70	0,9284
	60	-17,53	21,70	0,9976
10	15	33,83	21,70	0,8522
	20	52,13	21,70	0,3741
	25	125,43	21,70	0,0004***
	30	122,37	21,70	0,0006***
	35	93,63	21,70	0,0098***
	40	-2,93	21,70	1,0000
	50	-67,70	21,70	0,1140
	60	-55,90	21,70	0,2899
15	20	18,3	21,70	0,9967
	25	91,6	21,70	0,0120**
	30	88,5	21,70	0,0163**
	35	59,8	21,70	0,2173
	40	-36,8	21,70	0,7866
	50	-101,5	21,70	0,0044***
	60	-89,7	21,70	0,0144**
20	25	73,3	21,70	0,0694*
	30	70,2	21,70	0,0914*
	35	41,5	21,70	0,6620
	40	-55,1	21,70	0,3073
	50	-119,8	21,70	0,0007***

Continuação

	60	-108,0	21,70	0,0023***
25	30	-3,1	21,70	1,0000
	35	-31,8	21,70	0,8906
	40	-128,4	21,70	0,0003***
	50	-193,1	21,70	0,0000***
	60	-181,3	21,70	0,0000***
30	35	-28,7	21,70	0,9361
	40	-125,3	21,70	0,0004***
	50	-190,1	21,70	0,0000***
	60	-178,3	21,70	0,0000***
35	40	-96,6	21,70	0,0073***
	50	-161,3	21,70	0,0000***
	60	-149,5	21,70	0,0001***
40	50	-64,77	21,70	0,1461
	60	-52,97	21,70	0,3543
50	60	11,80	21,70	0,9999

ANEXO 25

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Lacase T20 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LACASE T20 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	49716,5	49716,5	5524,1	16,13	0,000***
Erro	20	6847,4	6847,4	342,4		
Total	29	56563,9				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE LACASE T20 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-7,20	15,11	1,0000
	15	10,53	15,11	0,9992
	20	19,99	15,11	0,9363
	25	57,10	15,11	0,0306**
	30	59,26	15,11	0,0227**
	35	36,58	15,11	0,3642
	40	-33,95	15,11	0,4594
	50	-49,54	15,11	0,0841*
	60	-66,05	15,11	0,0086***
10	15	17,74	15,11	0,9684
	20	27,19	15,11	0,7284
	25	64,31	15,11	0,0111**
	30	66,47	15,11	0,0081***
	35	43,78	15,11	0,1703
	40	-26,75	15,11	0,7448
	50	-42,34	15,11	0,2008
	60	-58,85	15,11	0,0240**
15	20	9,45	15,11	0,9997
	25	46,57	15,11	0,1221
	30	48,73	15,11	0,0933*
	35	26,04	15,11	0,7706
	40	-44,49	15,11	0,1568
	50	-60,07	15,11	0,0202**
	60	-76,59	15,11	0,0019***
20	25	37,12	15,11	0,3460
	30	39,28	15,11	0,2792
	35	16,59	15,11	0,9793
	40	-53,94	15,11	0,0471**
	50	-69,53	15,11	0,0052***

Continuação

	60	-86,04	15,11	0,0005***
25	30	2,2	15,11	1,0000
	35	-20,5	15,11	0,9263
	40	-91,1	15,11	0,0003***
	50	-106,6	15,11	0,0001***
	60	-123,2	15,11	0,0000***
30	35	-22,7	15,11	0,8764
	40	-93,2	15,11	0,0002***
	50	-108,8	15,11	0,0000***
	60	-125,3	15,11	0,0000***
35	40	-70,5	15,11	0,0045***
	50	-86,1	15,11	0,0005***
	60	-102,6	15,11	0,0001***
40	50	-15,59	15,11	0,9862
	60	-32,10	15,11	0,5322
50	60	-16,51	15,11	0,9799

ANEXO 26

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP T5 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MnP T5 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	652,365	652,365	72,485	15,38	0,000***
Erro	18	84,806	84,806	4,711		
Total	27	737,171				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE MnP T5 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-1,066	1,772	0,9997
	15	-0,388	1,981	1,0000
	20	11,540	1,981	0,0005***
	25	6,125	1,772	0,0642*
	30	-0,412	1,772	1,0000
	35	-2,369	1,772	0,9313
	40	-0,727	1,772	1,0000
	50	-5,966	1,772	0,0761*
10	60	-7,054	1,772	0,0228**
	15	0,679	1,981	1,0000
	20	12,606	1,981	0,0002***
	25	7,191	1,772	0,0195**
	30	0,655	1,772	1,0000
	35	-1,303	1,772	0,9988
	40	0,339	1,772	1,0000
	50	-4,900	1,772	0,2200
15	60	-5,988	1,772	0,0744*
	20	11,927	2,17	0,0010***
	25	6,512	1,981	0,0884*
	30	-0,024	1,981	1,0000
	35	-1,982	1,981	0,9884
	40	-0,339	1,981	1,0000
	50	-5,579	1,981	0,2026
	60	-6,667	1,981	0,0764*
20	25	-5,42	1,981	0,2316
	30	-11,95	1,981	0,0004***
	35	-13,91	1,981	0,0001***
	40	-12,27	1,981	0,0003***
	50	-17,51	1,981	0,0000***

Continuação

	60	-18,59	1,981	0,0000***
25	30	-6,54	1,772	0,0409**
	35	-8,49	1,772	0,0043***
	40	-6,85	1,772	0,0287**
	50	-12,09	1,772	0,0001***
	60	-13,18	1,772	0,0000***
30	35	-1,958	1,772	0,9778
	40	-0,315	1,772	1,0000
	50	-5,555	1,772	0,1168
	60	-6,643	1,772	0,0363**
35	40	1,642	1,772	0,9932
	50	-3,597	1,772	0,5915
	60	-4,685	1,772	0,2665
40	50	-5,239	1,772	0,1598
	60	-6,327	1,772	0,0515*
50	60	-1,088	1,772	0,9997

ANEXO 27

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP T10 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MnP T10 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	671,496	671,496	74,611	12,63	0,000***
Erro	20	118,139	118,139	5,907		
Total	29	789,635				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE MnP T10 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-0,233	1,984	1,0000
	15	0,370	1,984	1,0000
	20	2,758	1,984	0,9168
	25	10,649	1,984	0,0010***
	30	12,724	1,984	0,0001***
	35	-0,461	1,984	1,0000
	40	0,667	1,984	1,0000
	50	1,224	1,984	0,9997
	60	-2,067	1,984	0,9853
10	15	0,603	1,984	1,0000
	20	2,991	1,984	0,8742
	25	10,882	1,984	0,0008***
	30	12,958	1,984	0,0001***
	35	-0,227	1,984	1,0000
	40	0,900	1,984	1,0000
	50	1,458	1,984	0,9988
	60	-1,833	1,984	0,9936
15	20	2,388	1,984	0,9633
	25	10,279	1,984	0,0015***
	30	12,355	1,984	0,0002***
	35	-0,830	1,984	1,0000
	40	0,297	1,984	1,0000
	50	0,855	1,984	1,0000
	60	-2,436	1,984	0,9586
20	25	7,891	1,984	0,0202**
	30	9,967	1,984	0,0021***
	35	-3,218	1,984	0,8231
	40	-2,091	1,984	0,9842
	50	-1,533	1,984	0,9983

Continuação

	60	-4,824	1,984	0,3591
25	30	2,08	1,984	0,9849
	35	-11,11	1,984	0,0006***
	40	-9,98	1,984	0,0021***
	50	-9,42	1,984	0,0038***
	60	-12,72	1,984	0,0001***
30	35	-13,18	1,984	0,0001***
	40	-12,06	1,984	0,0002***
	50	-11,50	1,984	0,0004***
	60	-14,79	1,984	0,0000***
35	40	1,127	1,984	0,9998
	50	1,685	1,984	0,9965
	60	-1,606	1,984	0,9975
40	50	0,558	1,984	1,0000
	60	-2,733	1,984	0,9206
50	60	-3,291	1,984	0,8049

ANEXO 28

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP T15 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MnP T15 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	155,545	155,545	17,283	4,23	0,003***
Erro	20	81,733	81,733	4,087		
Total	29	237,278				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE MnP T15 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,9151	1,651	0,9999
	15	0,5939	1,651	1,0000
	20	3,2424	1,651	0,6302
	25	5,3879	1,651	0,0866*
	30	7,0000	1,651	0,0115**
	35	4,6243	1,651	0,2010
	40	2,5151	1,651	0,8673
	50	1,4727	1,651	0,9950
	60	0,2969	1,651	1,0000
10	15	-0,3212	1,651	1,0000
	20	2,3273	1,651	0,9101
	25	4,4728	1,651	0,2342
	30	6,0849	1,651	0,0371**
	35	3,7091	1,651	0,4596
	40	1,6000	1,651	0,9910
	50	0,5576	1,651	1,0000
	60	-0,6182	1,651	1,0000
15	20	2,6485	1,651	0,8313
	25	4,7940	1,651	0,1684
	30	6,4061	1,651	0,0247**
	35	4,0303	1,651	0,3536
	40	1,9212	1,651	0,9700
	50	0,8788	1,651	0,9999
	60	-0,2970	1,651	1,0000
20	25	2,145	1,651	0,9423
	30	3,758	1,651	0,4427
	35	1,382	1,651	0,9968
	40	-0,727	1,651	1,0000
	50	-1,770	1,651	0,9822

Continuação

	60	-2,946	1,651	0,7370
25	30	1,612	1,651	0,9905
	35	-0,764	1,651	1,0000
	40	-2,873	1,651	0,7616
	50	-3,915	1,651	0,3900
	60	-5,091	1,651	0,1217
30	35	-2,376	1,651	0,9000
	40	-4,485	1,651	0,2314
	50	-5,527	1,651	0,0734*
	60	-6,703	1,651	0,0169**
35	40	-2,109	1,651	0,9477
	50	-3,152	1,651	0,6636
	60	-4,327	1,651	0,2698
40	50	-1,042	1,651	0,9996
	60	-2,218	1,651	0,9305
50	60	-1,176	1,651	0,9991

ANEXO 29

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP T20 (U L⁻¹) versus Tempo de incubação**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tempo	fixo	10	5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 60

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MnP T20 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tempo	9	43,083	43,083	4,787	2,26	0,062*
Erro	20	42,364	42,364	2,118		
Total	29	85,447				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE MnP T20 (U L⁻¹) POR TEMPO DE INCUBAÇÃO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	1,3212	1,188	0,9775
	15	-0,4788	1,188	1,0000
	20	-0,9333	1,188	0,9980
	25	0,4788	1,188	1,0000
	30	1,1455	1,188	0,9913
	35	3,1395	1,188	0,2613
	40	-0,6182	1,188	0,9999
	50	1,7879	1,188	0,8752
	60	0,0424	1,188	1,0000
10	15	-1,800	1,188	0,8711
	20	-2,255	1,188	0,6709
	25	-0,842	1,188	0,9991
	30	-0,176	1,188	1,0000
	35	1,818	1,188	0,8647
	40	-1,939	1,188	0,8181
	50	0,467	1,188	1,0000
	60	-1,279	1,188	0,9818
15	20	-0,4545	1,188	1,0000
	25	0,9576	1,188	0,9976
	30	1,6243	1,188	0,9238
	35	3,6183	1,188	0,1308
	40	-0,1394	1,188	1,0000
	50	2,2667	1,188	0,6648
	60	0,5212	1,188	1,0000
20	25	1,4121	1,188	0,9660
	30	2,0788	1,188	0,7567
	35	4,0728	1,188	0,0629*
	40	0,3152	1,188	1,0000
	50	2,7212	1,188	0,4351

Continuação

	60	0,9758	1,188	0,9973
25	30	0,667	1,188	0,9999
	35	2,661	1,188	0,4643
	40	-1,097	1,188	0,9936
	50	1,309	1,188	0,9788
	60	-0,436	1,188	1,0000
30	35	1,994	1,188	0,7949
	40	-1,764	1,188	0,8833
	50	0,642	1,188	0,9999
	60	-1,103	1,188	0,9933
35	40	-3,758	1,188	0,1052*
	50	-1,352	1,188	0,9741
	60	-3,097	1,188	0,2764
40	50	2,4061	1,188	0,5933
	60	0,6606	1,188	0,9999
50	60	-1,745	1,188	0,8892

ANEXO 30

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade máxima de Lacase (U L⁻¹) versus Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE MÁXIMA DE LACASE POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	33340	33340	11113	18,10	0,000***
Erro	35	21484	21484	614		
Total	38	54825				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE MÁXIMA DE LACASE POR TRATAMENTO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	-35,13	12,39	0,0362**
	15	31,12	13,06	0,0990*
	20	-40,88	12,39	0,0114**
10	15	66,259	10,93	0,0000***
	20	-5,742	10,11	0,9410
15	20	-72,00	10,93	0,0000***

ANEXO 31

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade máxima de MnP (U L⁻¹) versus Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE MÁXIMA DE MnP POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	1586,59	1586,59	528,86	91,28	0,000***
Erro	46	266,51	266,51	5,79		
Total	49	1853,10				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE MÁXIMA DE MnP POR TRATAMENTO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,40	1,458	0,9927
	15	-10,66	1,243	0,0000***
	20	-14,24	1,183	0,0000***
10	15	-11,06	1,163	0,0000***
	20	-14,64	1,099	0,0000***
15	20	-3,578	0,7922	0,0003***

ANEXO 32

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade máxima de descoloração do RBBR (U min^{-1}) versus**

Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE MÁXIMA DE DESACOLORAÇÃO DO RBBR POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	140,275	140,275	46,758	31,86	0,000***
Erro	47	68,976	68,976	1,468		
Total	50	209,252				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE MÁXIMA DE DESACOLORAÇÃO DO RBBR POR TRATAMENTO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,536	0,5342	0,7481
	15	2,833	0,5711	0,0001***
	20	-1,760	0,4826	0,0036***
10	15	2,297	0,5342	0,0005***
	20	-2,296	0,4384	0,0000***
15	20	-4,594	0,4826	0,0000***

ANEXO 33

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Degradação do pentaclorofenol aos 5 dias de cultivo *versus* Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA DEGRADAÇÃO DO PENTACLOROFENOL AOS 5 DIAS POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	0,216667	0,216667	0,072222	9,63	0,005***
Erro	8	0,060000	0,060000	0,007500		
Total	11	0,276667				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: DEGRADAÇÃO DO PENTACLOROFENOL AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
10	15	-0,1333	0,07071	0,3055
	20	-0,3667	0,07071	0,0037***
	5	-0,1000	0,07071	0,5253
15	20	-0,2333	0,07071	0,0436**
	5	0,0333	0,07071	0,9633
20	5	0,2667	0,07071	0,0227**

ANEXO 34

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP aos 5 dias de cultivo (U L⁻¹) versus Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE MnP AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	37,729	37,729	12,576	4,68	0,036**
Erro	8	21,506	21,506	2,688		
Total	11	59,235				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE MnP AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,806	1,339	0,9286
	15	-3,121	1,339	0,1696
	20	-3,073	1,339	0,1782
10	15	-3,927	1,339	0,0731*
	20	-3,879	1,339	0,0769*
15	20	0,0484	1,339	1,0000

ANEXO 35

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade Lacase aos 5 dias de cultivo (U L^{-1}) versus Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14 - 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE LACASE AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	2334,5	2334,5	778,2	5,63	0,023**
Erro	8	1105,9	1105,9	138,2		
Total	11	3440,4				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE LACASE AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	4,733	9,600	0,9585
	15	-6,894	9,600	0,8872
	20	30,044	9,600	0,0554*
10	15	-11,63	9,600	0,6374
	20	25,31	9,600	0,1111
15	20	36,94	9,600	0,0205**

ANEXO 36

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Descoloração do RBBR aos 5 dias de cultivo *versus* Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA DESCOLORAÇÃO DO RBBR AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	5,1968	5,1968	1,7323	4,48	0,047**
Erro	7	2,7050	2,7050	0,3864		
Total	10	7,9018				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: DESCOLORAÇÃO DO RBBR AOS 5 DIAS DE CULTIVO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	1,950	0,5675	0,0425**
	15	1,350	0,5675	0,1689
	20	1,750	0,5675	0,0671*
10	15	-0,6000	0,5076	0,6557
	20	-0,2000	0,5076	0,9777
15	20	0,4000	0,5076	0,8577

ANEXO 37

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Degradação do pentaclorofenol aos 15 dias de cultivo *versus* Diferentes**

Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA DEGRADAÇÃO DO PENTACLOROFENOL AOS 15 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	0,09000	0,09000	0,03000	1,00	0,441
Erro	8	0,24000	0,24000	0,03000		
Total	11	0,33000				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 38

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de MnP aos 15 dias de cultivo *versus* Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE MnP AOS 15 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	43,119	43,119	14,373	7,85	0,009***
Erro	8	14,654	14,654	1,832		
Total	11	57,773				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: ATIVIDADE DE MnP AOS 15 DIAS DE CULTIVO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	1,176	1,105	0,7193
	15	-2,527	1,105	0,1803
	20	-3,552	1,105	0,0492**
10	15	-3,703	1,105	0,0406**
	20	-4,727	1,105	0,0115**
15	20	-1,024	1,105	0,7919

ANEXO 39

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Atividade de Lacase aos 15 dias de cultivo *versus* Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ATIVIDADE DE LACASE AOS 15 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	2195,2	2195,2	731,7	1,70	0,243
Erro	8	3438,8	3438,8	429,8		
Total	11	5634,0				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valo de F do Teste de Studednt; *** = 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 40

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Descoloração do RBBR aos 15 dias de cultivo versus Diferentes Tratamentos (T5, T10, T15 e T20)**

(Minitab Release 14– 2006)

Resumo

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Tratamento	fixo	4	5; 10; 15; 20

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA DESCOLORAÇÃO DO RBBR AOS 15 DIAS DE CULTIVO POR TRATAMENTO, USANDO SOMA DE QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Tratamento	3	7,3000	7,3000	2,4333	4,53	0,039**
Erro	8	4,3000	4,3000	0,5375		
Total	11	11,6000				

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor de 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 TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: DESCOLORAÇÃO DO RBBR AOS 15 DIAS DE CULTIVO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
5	10	0,400	0,5986	0,9062
	15	-1,300	0,5986	0,2106
	20	-1,367	0,5986	0,1812
10	15	-1,700	0,5986	0,0834*
	20	-1,767	0,5986	0,0713*
15	20	-0,06667	0,5986	0,9995