

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

CRISTIANE PATRÍCIA KIST

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS
UTILIZANDO FUNGOS DO GÊNERO *PLEUROTUS***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CURITIBA
2013**

CRISTIANE PATRÍCIA KIST

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS
UTILIZANDO FUNGOS DO GÊNERO *PLEUROTUS***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Monitoramento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues.
Coorientadora: Profa. Dra. Marlene Soares.

CURITIBA
2013

RESUMO

KIST, Cristiane Patrícia. Estudo da degradação de compostos nitroaromáticos utilizando fungos do gênero *Pleurotus*. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná. Curitiba, 2013.

Os fungos do gênero *Pleurotus* são basidiomicetos que se destacam na degradação de substâncias recalcitrantes do ambiente, como por exemplo, os compostos nitroaromáticos, que são poluentes prioritários constituintes do efluente Água Vermelha (AV), uma água residuária gerada em uma das etapas de fabricação do explosivo comercial e militar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT). O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade dos fungos *Pleurotus ostreatus* POS 560 e *Pleurotus floridae* PSP 1 de degradar os compostos nitroaromáticos presentes na AV. O potencial impactante deste efluente foi avaliado com base em antecedentes bibliográficos relevantes e através de ensaios de caracterização física, química e ecotoxicológica. Para avaliar aspectos relacionados com a ecotoxicologia dos efluentes, bioensaios foram realizados utilizando-se *Daphnia magna* e apresentaram o Fator de Toxicidade (FT) 16 para o efluente AV na concentração de 1% e FT 4 para o efluente AV 0,5% em 24 horas do ensaio demonstrando a toxicidade e a importância do seu tratamento. Os estudos de tratabilidade fúngica foram baseados na condução de um procedimento com planejamento fatorial de experimentos realizado em meio sólido, onde o crescimento foi medido em função da variação de: espécie do fungo, pH, concentração do efluente e concentração de glicose. Dentre os fatores mais favoráveis estatisticamente, destacaram-se a concentração de efluente (0,5%), a espécie de fungo *P. floridae*, o pH 6,0 e concentração de 10 g/L de glicose. Estas condições foram consideradas como base experimental para o tratamento fúngico do efluente AV da indústria de explosivos por 15 dias em meio líquido com frascos agitados. Os resultados obtidos indicaram que o *P. floridae* nas condições de estudo foi capaz de reduzir os parâmetros de DQO, DBO e Fenóis em 55, 51 e 25% respectivamente. Obteve-se também redução da toxicidade em relação ao bioensaio realizado com *D. Magna*, onde o FT_D baixou para 4 em 48 horas. Adicionalmente, *P. floridae* foi capaz de converter e degradar totalmente ambos os compostos nitroaromáticos identificados (2,4 e 2,6-dinitrotolueno) em tempos da ordem de 2 e 8 dias. O conjunto de resultados obtidos indicam e sugerem que *P. floridae* possui potencialidade para a remediação de efluentes contendo espécies químicas de relevância ambiental como os compostos nitroaromáticos.

PALAVRAS-CHAVE: Nitroaromáticos, 2,4,6-trinitrotolueno, Biorremediação, Fungos da podridão branca.

ABSTRACT

KIST, Cristiane Patrícia. Study of degradation of nitroaromatic compounds using fungi of the genus *Pleurotus*. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná. Curitiba, 2013.

The fungi of the genus *Pleurotus* are basidiomycetes that stand out in the degradation of recalcitrant environmental substances. For example, nitroaromatic compounds, which are priority pollutants constituents of the effluent Red Water (RW), a wastewater generated in one of the manufacturing steps of commercial and military used explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). The objective of this work was to study the ability of fungi *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus floridae* POS 560 PSP 1 to degrade nitroaromatic compounds of the RW. The potential impact of this effluent was evaluated based on a relevant bibliographical history and through physical, chemical and ecotoxicological testing assessment. To evaluate aspects related to effluent ecotoxicology, bioassays were conducted using *Daphnia magna*, showing a toxicity factor (TF) 16 in a 1% RW concentration and FT 4 in a 0.5% RW concentration during a 24 hour testing, proving its toxicity and the importance of its treatment. The fungal treatability studies were based on the conduct of a procedure with factorial planning of experiments performed on solid medium, where growth was measured considering the variation of fungal species, pH, effluent concentration and glucose concentration. Among the most favorable factors, stood out the 0.5% effluent concentration, *P. floridae* fungus species, pH 6.0, and 10 g/L glucose concentration. These conditions were considered as the experimental basis for the fungal treatment of RW explosives industry effluent for 15 days in liquid medium in shaker flasks. The results indicated that *P. floridae* was able to reduce the parameters of COD, BOD and phenols at 55, 51 and 25% respectively. It was also obtained less toxicity compared to the bioassay using *D. magna*, where TF decreased to 4 in 48 hours. Additionally, *P. floridae* was able to fully convert and degrade both nitroaromatic compounds identified (2,4 and 2,6 dinitrotoluene) between 2 and 8 days interval. The results indicate and suggest that *P. floridae* have potential for the remediation of wastewater containing chemical species with environmental relevance as nitroaromatic compounds.

KEYWORDS: Nitro aromatics, 2,4,6-trinitrotoluene, Bioremediation, White rot fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do 2,4,6 trinitrotolueno (TNT).....	18
Figura 2 -	Esquema da produção do explosivo TNT e a geração de seus efluentes.....	19
Figura 3 -	Fotografia do efluente da produção de TNT – Água vermelha (AV).....	20
Figura 4 -	Fotografia do neonato de <i>Daphnia magna</i> com idade aproximada de 2 horas.....	21
Figura 5 -	Etapas dos processos metodológicos do trabalho.....	32
Figura 6 -	Fotografia das diluições do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos para o teste com <i>D. magna</i>	39
Figura 7 -	Fotografia do cultivo de <i>Pleurotus floridae</i> (A) e cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> (B).....	40
Figura 8 -	Fotografia da Placa de Petri com marcação de três raios.....	45
Figura 9 -	Esquema das etapas de determinação enzimáticas.....	51
Figura 10 -	Cromatografia obtida para amostra da Água Vermelha bruta..	55
Figura 11 -	Representação gráfica do estudo com <i>D. magna</i> mostrando a imobilidade observada em diferentes diluições obtidas a partir de Água Vermelha 1%, em 24 e 48 horas.....	57
Figura 12 -	Representação gráfica do estudo com <i>D. magna</i> mostrando imobilidade em diferentes diluições de Água Vermelha a 0,5%, em 24 e 48 horas.....	58
Figura 13 -	Representação gráfica FT_D em função das concentrações da Água Vermelha (1% e 0,5%) no teste de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> em 24 horas.	58
Figura 14-	Representação gráfica FT_D em função das concentrações da Água Vermelha (1% e 0,5%) no teste de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> em 48 horas.....	59
Figura 15-	Representação do gráfico de Pareto para avaliação comparativa dos efeitos principais e de interação sobre a velocidade de crescimento de fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	

	em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.....	62
Figura 16-	Interpretação geométrica relativa aos fatores experimentais significativos sobre o crescimento radial de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> em meio composto a base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.....	63
Figura 17-	Interpretação geométrica relativa aos fatores experimentais significativos sobre o crescimento radial de fungos do gênero <i>Pleurotus</i> em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.....	64
Figura 18 -	Representação gráfica do crescimento micelial do fungo <i>Pleurotus floridae</i>	65
Figura 19 -	Representação gráfica do crescimento micelial do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	66
Figura 20 -	Representação gráfica da comparação entre o crescimento micelial dos fungos <i>P. ostreatus</i> e <i>P. floridae</i> com os desvio padrões no meio de cultivo contendo efluente Água Vermelha a 0,5%; 10 g/L de glicose e pH 6.....	67
Figura 21 -	Fotografia mostrando a formação de <i>pellets</i> durante o tratamento fúngico nos Erlenmeyers.....	70
Figura 22 -	Descoloração no meio 2 (pH 6, 20 g/L de glicose) com o fungo <i>P. floridae</i> e comparações com os meios 1 (pH 6, 10 g/L de glicose), 3 (pH 5, 10 g/L de glicose) e 4 (pH 5, 20 g/L de glicose).....	71
Figura 23 -	Representação do gráfico de Pareto mostrando o padrão de redução da concentração de Nitroaromáticos.....	73
Figura 24 -	Superfície de contorno da estimativa de resposta da redução de Nitroaromáticos com glicose e pH.....	74
Figura 25 -	Superfície de contorno da estimativa de resposta da redução de Nitroaromáticos com glicose e fungo.....	74
Figura 26 -	Interpretação geométrica da redução da concentração de nitroaromáticos em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.....	75

Figura 27 -	Interpretação geométrica referente as principais variáveis da Redução da concentração de Nitroaromáticos.....	76
Figura 28 -	Concentração enzimática média durante 7 dias de experimento para os diferentes meios com os dois fungos.....	78
Figura 29 -	Peso seco da biomassa micelial de <i>P. floridae</i> durante experimento em meio líquido.....	80
Figura 30 -	Fotografia do micélio filtrado do meio de cultivo para posterior secagem e obtenção da biomassa.....	81
Figura 31 -	Análise cromatográfica da adsorção micelial dos compostos presentes no meio de cultivo com Água Vermelha da indústria de explosivos comparando o controle no 1º dia, 8º dia e último dia de estudo.....	82
Figura 32 -	Comparação entre redução diária de glicose e início da produção de lacase pelo fungo <i>P. floridae</i>	84
Figura 33 -	Concentração de diferentes enzimas produzidas por <i>Pleurotus floridae</i> no segundo experimento em meio líquido com o efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.....	85
Figura 34 -	Imagem comparativa do controle (sem tratamento) e após o 15º dia de tratamento fúngico com <i>P. floridae</i>	87
Figura 35 -	Medida da Abs do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos durante o tratamento fúngico.....	87
Figura 36 -	Cromatograma de monitoramento de 2,6 dinitrotolueno (1) e 2,4 dinitrotolueno (2) referente ao controle e as amostras do tratamento fúngico.....	90
Figura 37 -	Cromatograma do 8º dia mostrando os dois picos de monitoramento, sendo pico 1 o 2,6 DNT e pico 2 o 2,4 DNT...	91
Figura 38 -	Representação gráfica comparando a redução de 2,6-dinitrotolueno e a produção de lacase.....	92
Figura 39 -	Representação gráfica do estudo com <i>D. magna</i> mostrando imobilidade em diferentes diluições de Água Vermelha à 0,5%, em 24 e 48 horas com o meio de cultivo líquido, sem tratamento.....	94
Figura 40 -	Representação gráfica do estudo com <i>D. magna</i> mostrando	

imobilidade em diferentes diluições de Água Vermelha à 0,5%, em 24 e 48 horas com o meio de cultivo líquido, após o tratamento fúngico de 15 dias..... 95

Figura 41 - Representação gráfica do FT_D comparando a toxicidade do meio com o final do tratamento fúngico de 15 dias..... 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variáveis e níveis de estudo.....	43
Tabela 2 -	Matriz padrão para o planejamento experimental 2^4 com os fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	44
Tabela 3 -	Variáveis e níveis de estudo na concentração do efluente a 0,5% de Água Vermelha.....	47
Tabela 4 -	Matriz padrão para o planejamento experimental 2^3 como os fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	47
Tabela 5 -	Resultados das Análises Física e Química da Água Vermelha (diluída 0,5% v/v).....	54
Tabela 6 -	Resultados obtidos para o delineamento experimental.....	60
Tabela 7 -	Efeitos principais de interação e de erro padrão de efeito calculados em função da velocidade média de crescimento de <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus floridae</i> em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.....	61
Tabela 8 -	Comparação entre crescimento em Ágar e na melhor condição de crescimento para <i>Pleurotus floridae</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	68
Tabela 9 -	Resultados do planejamento experimental 2^3 com os fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	72
Tabela 10 -	Estimativa de efeitos para a redução da concentração de Nitroaromáticos.....	72
Tabela 11 -	Resultado da determinação de Glicose (g/L) após tratamento fúngico por 7 dias.....	76
Tabela 12 -	Resultados da redução de DQO e DBO da AV tratada durante 15 dias.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Água amarela
AV	Água vermelha
TNT	2,4,6 trinitrotolueno
DNT	2,6 ou 2,4-dinitrotolueno
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
CGMS	Cromatografia gasosa – Espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMBEL	Indústria de material bélico do Brasil
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial hidrogeniônico
PDA	Potato-dextrose-Ágar
DNS	Ácido 3,5 dinitrossalicílico
FT _D	Fator de Toxicidade para <i>D. magna</i>
FT	Fator de Toxicidade
rpm	Rotações por minuto
nm	Nanômetros

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e proteção e por permitir a realização de todos os meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues, por ter permitido o meu ingresso no curso e pela orientação. Obrigada pela paciência, calma, simplicidade, sabedoria e também pela dedicação em me orientar, visto a distância que nos separou durante todo o curso. Adorava os dias em que conversávamos, pois sempre surgiam boas ideias para melhorar o trabalho.

Agradeço a minha coorientadora Profa. Dra. Marlene Soares, pelos ensinamentos, pelas explicações, por sua atenção, humanidade, simplicidade e generosidade e disposição em ajudar. Muito obrigada pelo carinho, pelas palavras de incentivo e apoio e pela torcida. Obrigada por acreditar na minha capacidade profissional, pois foi muito importante para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, Noeli e João, obrigado pelo carinho, apoio, e amor. Vocês são um exemplo para mim, eu sou muito feliz de tê-los como pais.

Aos meus irmãos Gracieli e Jean Carlos, pelas conversas e ótimos momentos que passamos em Entre Rios do Oeste, nossa cidade natal.

Ao meu marido e namorado Maurício, por seu amor, carinho, atenção, dedicação exclusiva nos últimos meses deste trabalho, pela companhia e amizade, por me ouvir quando precisei simplesmente desabafar, mas, sobretudo por entender a minha ausência, a minha ansiedade e minha “chatice” em tantos momentos. Sou imensamente grata por sua ajuda, pelas vezes que me acompanhou até a UTFPR, pela ajuda com os dados do Excel. Também fico feliz por ter encontrado você, afinal vim a Curitiba para fazer o mestrado, e encontra-lo aqui foi muito especial e também importante nessa minha jornada. Enfim, poderia escrever muito sobre você, que é uma pessoa que admiro muito. Vou resumir: Eu te amo!

A todos os colegas dos laboratórios de Microbiologia, Ecotoxicologia e Biotecnologia, pelos momentos de convivência e colaboração.

Aos colegas de turma e amigos Francielli, Jean Richard, Cassio, Carin, Valeria e Juliana por compartilharmos os primeiros passos da caminhada.

A todos os professores do Departamento de Química e Biologia – UTFPR, pelos ensinamentos e por sua dedicação à arte de ensinar. Em especial a professora Wanessa do laboratório de Ecotoxicologia, muito obrigada pela disponibilidade do laboratório e por acompanhar meus ensaios.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Há, agradeço aos meus fungos!! Lindos, cresceram muito bem, adorava manipulá-los. E não tem nada melhor do fazer o que se gosta.

A todos que participaram na realização deste trabalho o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 CONTEXTUALIZAÇÃO DO ASSUNTO	17
3.1 COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS.....	17
3.1.1 Trinitrotolueno (TNT).....	18
3.2 ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DA AV.....	21
3.3 BASIDIOMICETOS.....	22
3.3.1 Fungos da Podridão Branca.....	24
3.3.2 Fungos do Gênero <i>Pleurotus</i>	25
3.4 BIORREMEDIAÇÃO.....	27
3.4.1 Aplicação de Fungos Causadores de Podridão Branca em Biorremediação.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 AMOSTRA DO EFLUENTE.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	33
4.2.1 Determinação de Sólidos Totais.....	33
4.2.2 Determinação de Sólidos Suspensos.....	34
4.2.3 Determinação de Sólidos Dissolvidos Totais.....	34
4.2.4 Determinação de Sólidos Dissolvidos Fixos.....	34
4.2.5 Determinação de Sólidos Dissolvidos Voláteis.....	34
4.2.6 Determinação de Sulfatos.....	34
4.2.7 Determinação de Nitratos.....	34
4.2.8 Determinação de Nitrogênio Orgânico.....	35
4.2.9 Determinação de Fenóis Totais.....	35
4.2.10 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	36
4.2.11 Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).....	36
4.2.12 Determinação de TNT e compostos Nitroaromáticos.....	36
4.2.12.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS).....	37
4.2.12.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
4.3 TOXICIDADE AGUDA DO EFLUENTE AV COM <i>Daphnia magna</i>	38
4.4 ORGANISMOS.....	39
4.4.1 Inoculação.....	40
4.4.1.1 Preparo da solução de células de <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus floridae</i>	40
4.4.1.2 Contagem de células de <i>P. ostreatus</i> e <i>P. floridae</i>	41
4.5 PRIMEIRO EXPERIMENTO: CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO.....	42
4.5.1 Preparo de Placas de Petri.....	42
4.5.2 Condições do Experimento.....	42
4.5.3 Medição do Crescimento Radial.....	44
4.6 PRIMEIRO EXPERIMENTO: BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS DE EFLUENTE AV EM MEIO	

LÍQUIDO.....	46
4.6.1 Preparo dos Erlenmeyers com Meio líquido.....	46
4.6.2 Condições do Experimento.....	46
4.7 SEGUNDO EXPERIMENTO: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS EM FRASCOS AGITADOS....	48
4.8 CONTROLE ANALÍTICO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS DE AV EM MEIO LÍQUIDO....	49
4.8.1 Determinação da Biomassa Micelial.....	49
4.8.2 Determinação da Adsorção de Nitroaromáticos pelo Micélio.....	49
4.8.3 Determinação de Glicose.....	50
4.8.4 Determinação Enzimática.....	50
4.8.4.1 Atividade de Peroxidase.....	52
4.8.4.2 Atividade Mangânes Peroxidase.....	52
4.8.4.3 Atividade de Lacase.....	52
4.9 MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS, VIDRARIAS E RESÍDUOS..	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA AV.....	54
5.2 ENSAIO ECOTÓXICOLÓGICO DA AV.....	56
5.3 PRIMEIRO EXPERIMENTO: EFEITOS QUE INFLUENCIAM NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO...	60
5.4 PRIMEIRO EXPERIMENTO: EFEITOS QUE INFLUENCIAM NA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE AV EM MEIO LÍQUIDO.....	70
5.4.2 Análise Estatística do Delineamento Experimental.....	71
5.4.3 Atividade Enzimática.....	77
5.5 SEGUNDO EXPERIMENTO: ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS.....	80
5.5.1 Biomassa.....	80
5.5.2 Adsorção de Nitroaromáticos pelo Micélio.....	81
5.5.3 Determinação de Glicose.....	83
5.5.4 Atividade Enzimática.....	84
5.5.5 Determinação de cor.....	86
5.5.6 Monitoramento da degradação de 2,6 e 2,4-dinitrotolueno.....	89
5.6 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PÓS-TRATAMENTO FÚNGICO.	94
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS	100
ANEXO	114

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental é uma das suas manifestações mais comuns, a contaminação de águas e solos, são problemas que devem ser estudados com intuito de viabilizar meios para sua minimização. Embora seja importante e altamente relevante a economia de recursos nos processos produtivos através da gestão integrada das águas residuárias, outras medidas, como investimentos em tecnologias alternativas e eficientes vêm ganhando destaque.

Dentro do contexto da poluição industrial hídrica, vários são os contaminantes presentes nos efluentes e todos requerem atenção e tratamento eficaz. Muitos efluentes ainda não recebem tratamento adequado, sendo descartados no ambiente, ainda com alta toxicidade e com biodegradabilidade reduzida.

A indústria de explosivos produz dois tipos de efluentes, chamados de Água Amarela (AA) e Água Vermelha (AV). É necessário buscar formas adequadas de tratamento dos compostos presentes nestes efluentes, como os nitroaromáticos. Porém o tratamento de efluentes contendo espécies químicas desta natureza é bastante dificultado pelo seu marcante caráter tóxico (CAVALOTTI, 2008).

Para o tratamento de compostos nitroaromáticos, como o 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), processos físicos e químicos são estudados, como o processo redutivo fundamentado no uso de ferro metálico, o processo foto-Fenton (HELFERICH, 2012), e também o uso de processos biológicos. Como alternativa ao tratamento biológico por bactérias, que são por vezes inibidas por compostos muito tóxicos, surge o tratamento utilizando fungos que vem crescendo como nova tecnologia para o tratamento de compostos recalcitrantes. Os fungos conseguem degradar esses contaminantes, porque produzem inúmeras enzimas ligninolíticas (SALVI, 2011), degradando assim compostos tóxicos.

Os fungos basidiomicetos do gênero *Pleurotus* são reconhecidos como degradadores de substâncias recalcitrantes e são estudados para degradação de TNT (ESTEVE-NÚNEZ et al., 2001; KIM; SONG, 2000), bem como outros fungos, como *Phanerochaete chrysosporium* (SILVA, 2009; VALLI et al., 1992). Rho et al. (2001) conseguiram realizar a biotransformação do TNT em uma taxa de 100%

utilizando *P. chrysosporium*, porém perceberam que para mineralizar o TNT seria necessário otimizar as condições de cultivo que maximizassem a biorremediação.

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar de que maneira fungos do gênero *Pleurotus* utilizam ou dependem de elementos nutritivos de um meio de cultivo a base do efluente Água Vermelha. Também espera-se contribuir no desenvolvimento de processos em meio líquido que proporcionem um maior rendimento em biomassa, atividade enzimática, degradação de compostos nitroaromáticos e redução de toxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a capacidade do gênero *Pleurotus* para a biorremediação do efluente industrial denominado Água Vermelha (AV).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente industrial AV segundo parâmetros físicos, químicos e ecotoxicológicos;
- Identificar os principais efeitos que influenciam a velocidade de crescimento micelial de *P. ostreatus* POS 560 e *P. floridae* PSP 1 utilizando o efluente AV e seus constituintes;
- Identificar as melhores condições para o biotratamento do efluente AV, através de planejamento experimental e cultivo líquido;
- Estudar sob condições otimizadas a cinética e eficiência de biodegradação de espécies nitroaromáticas do efluente AV em frascos agitados.
- Caracterizar o efluente AV após tratamento fúngico sob condições otimizadas.

3 CONTEXTUALIZAÇÃO DO ASSUNTO

O crescimento industrial estende-se aos dias atuais, porém, isso trouxe como consequência a degradação do ambiente, uma vez que, para a transformação de matérias-primas em bens manufaturados, muitas substâncias indesejadas são produzidas e têm como destino final o meio ambiente (BABÁ et al., 2009).

As indústrias de modo geral são fundamentais para a vida na sociedade atual, pois a partir delas é retirada a subsistência dos seus envolvidos, como trabalhadores, empregadores, e além da clientela que a mesma atinge e conseqüentemente dela beneficia-se. Em suma, dependemos da industrialização, porém a mesma causa a degradação e poluição ambiental.

Uma das formas de minimizar essa poluição é a biorremediação, que envolve a utilização de micro-organismos, de ocorrência natural ou cultivados, para degradar contaminantes em águas subterrâneas e em solos. Neste caso, geralmente, os micro-organismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

3.1 COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS

A produção, o teste e o uso de explosivos, fundamentados quimicamente em compostos nitroaromáticos, vêm desde o século XIX contaminando solos e águas. No começo do século XX, pesquisadores já tinham desenvolvido mais de 60 novos compostos, a maioria deles nitroaromáticos, como o 2,4,6 trinitrotolueno (TNT), que há muito tempo vem dominando o mercado mundial de explosivos (RODRIGUES et al., 2007).

Explosivos nitroaromáticos, como o TNT, de acordo com Cavalotti (2008), surgiram há mais de 50 anos, principalmente para substituir a instável nitroglicerina. Em geral, explosivos a base de TNT são mais seguros, desde a fabricação até o uso. Estes são classificados de acordo com a sua utilização, sendo o trinitrotolueno um dos principais explosivos secundários (BRUM, 2010).

Com uma produção mundial de explosivos estimada em 108 toneladas/ano, estes materiais aparecem como importantes agentes de contaminação ambiental (GUERRA, 2011).

3.1.1 Trinitrotolueno (TNT)

O TNT (Figura 1) é um dos compostos nitroaromáticos mais comuns. É mutagênico e apresenta efeitos tóxicos em algas, peixes, seres humanos e outros vertebrados (CAVALOTTI, 2008).

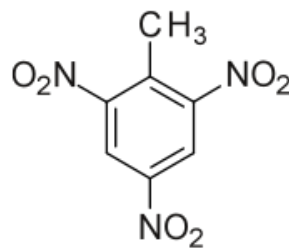


Figura 1 - Estrutura química do 2,4,6 trinitrotolueno (TNT).

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA considera estes compostos como poluentes prioritários, de elevado potencial impactante, além de terem elevado caráter carcinogênico (RODRIGUES et al., 2007).

A principal fonte de contaminação por nitroaromáticos está associada aos processos industriais. A descarga de rejeitos gerados durante a manufatura e o processamento, bem como o nível de contaminação causado variam amplamente, dependendo da intensidade das operações de manufatura e da eficácia das tecnologias empregadas no tratamento dos resíduos (RODRIGUES et al., 2007).

O mais importante explosivo nitroaromático, o TNT, segundo Cavalotti (p. 02, 2008),

é produzido por nitração sequencial do tolueno, reação realizada em três estágios e na presença de ácido nítrico e sulfúrico. A formação do composto trinitrado ocorre somente no terceiro estágio, juntamente com diversas impurezas, as quais são retiradas do produto por sucessivas lavagens com água.

Desta produção, a maior parte das impurezas é removida por processos de lavagem realizado com água e posteriormente com solução de sulfito de sódio, gerando dois tipos de efluentes denominados Água Amarela (AA) e Água Vermelha (AV) (RODRIGUES et al., 2007).

O destino final dos efluentes da indústria de explosivos segundo Helferich (2012); Rodrigues (2005); Hofrichter et al. (1998), são a incineração, porém esta possui algumas desvantagens, como a emissão de gases. Na Figura 2, segue um fluxograma da geração do explosivo TNT e a geração de seus efluentes, AV e AA.

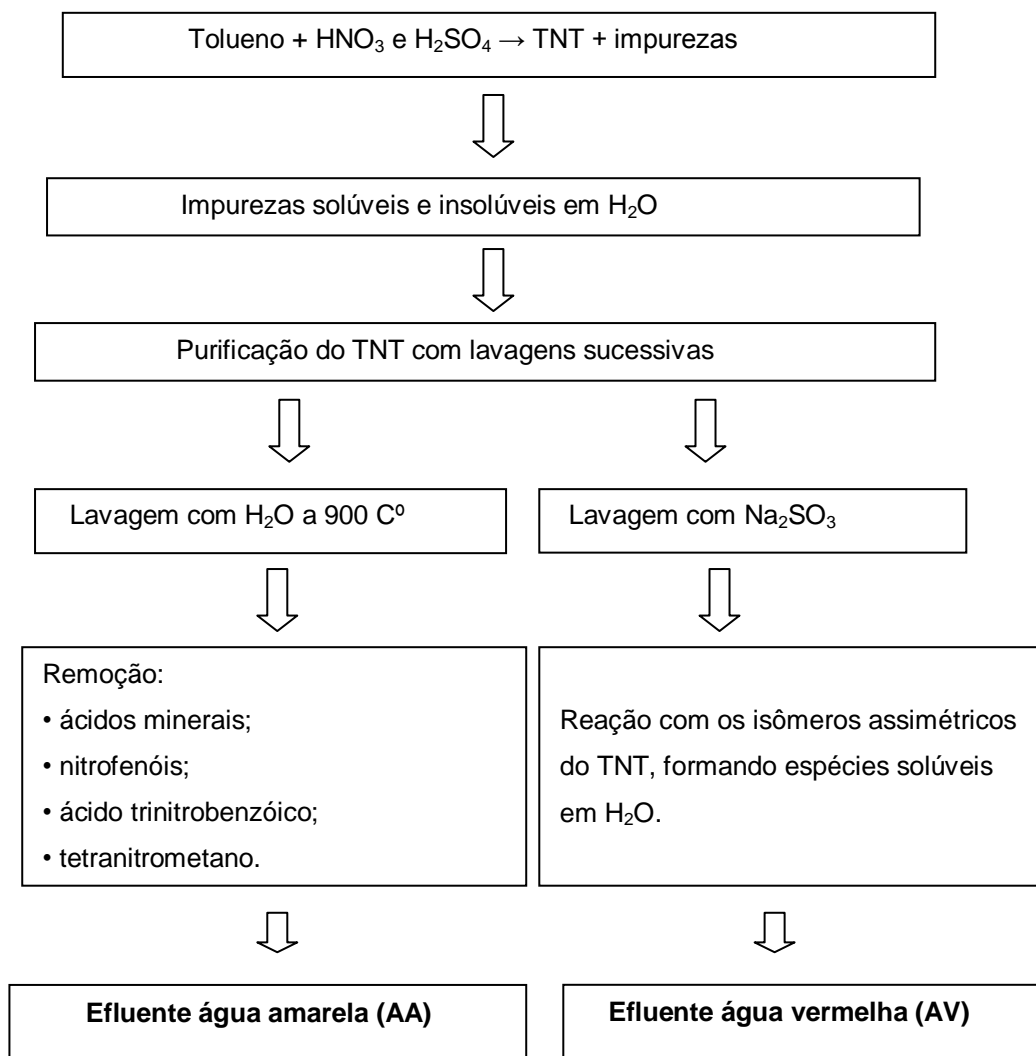


Figura 2 - Esquema da produção do explosivo TNT e a geração de seus efluentes.
Fonte: CAVALOTTI (2008).

O efluente AV é resultante da água de lavagem a partir da produção do TNT e outras etapas de limpeza. Inicialmente essa água quase não é colorida, mas assume coloração vermelha quando exposta à luz solar e a pH 7 ou superior, devido aos produtos de fotodegradação gerados a partir do TNT (RIBEIRO, 2008). O efluente AV apresenta intensa coloração marrom avermelhada (Figura 3) e pH em torno de 7,7, e a sua carga orgânica é também elevada (CAVALOTTI, 2008).



Figura 3. Fotografia do efluente da produção de TNT – Água vermelha (AV)
Fonte: HELFERICH (2012).

O TNT causa risco à saúde, e a contaminação por este ocorre através da inalação, ingestão e absorção da pele. Brum (2010) descreve em seu trabalho vários sintomas que afetaram a saúde de pessoas que tiveram contato com o TNT.

Devido às suas propriedades químicas alguns cuidados devem ser adotados ao trabalhar com os explosivos, como evitar a inalação e o contato com a pele, pois o nível de tolerância é menor do que 1,5 miligramas por metro cúbico de ar (BRUM, 2010).

O trinitrotolueno é completamente estável e, ao contrário da nitroglicerina, é relativamente insensível à fricção, impacto ou agitação. Isto significa que é necessário o uso de um detonador para provocar sua explosão (GUERRA, 2011).

Os antecedentes bibliográficos e outras informações referentes a estes efluentes no âmbito nacional são escassos e muitas vezes limitados pelas próprias instituições que os produzem ou fiscalizam, o que tem dificultado as pesquisas de

monitoramento ambiental e o desenvolvimento de tecnologias apropriadas para a remediação destes efluentes.

Segundo Helferich (2012) a AV possui compostos nitroaromáticos que dificultam o tratamento biológico convencional, desta forma, os estudos de caracterização deste tipo particular de efluente são fundamentais para avaliação do seu potencial poluente, ao mesmo tempo que auxiliam posteriores estudos de recuperação de seus constituintes, reuso ou tratamento.

3.2 ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DA AV

Segundo a NBR 12713 (ABNT, 2009) a toxicidade aguda de amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e de substâncias químicas solúveis ou dispersas em água, pode ser testada através de bioensaios, e também estabelece condições ideais da utilização de organismos-teste em ensaios de avaliação de amostras ambientais.

Os estudos ecotoxicológicos segundo Kern (2012) representam uma ferramenta indispensável na avaliação de efluentes complexos, pois permitem resultados diretos sobre o impacto causado na biota.

Desta forma, os testes de toxicidade são métodos importantes para que ocorra o monitoramento de efluentes, avaliando a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental (KERN, 2012). Diferentes organismos são utilizados em testes de toxicidade aguda, um deles é o microcrustáceo *Daphnia magna* (Figura 4).



Figura 4 – Fotografia de Neonato de *Daphnia magna* com idade aproximada de 2 horas. Aumento 50X.
Fonte: KERN (2012).

Para avaliar o potencial tóxico do efluente da indústria de explosivos, que gera a AA e a AV, já foram utilizados como organismos-teste *Daphnia similis*, *Danio rerio*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Pseudokircheneriella subcaptata*. Os efluentes AA e AV apresentaram-se extremamente tóxicos para os organismos de teste segundo Ribeiro et al. (2012).

Em estudo realizado com o efluente AA da indústria de explosivos, com o organismo teste *Artemia salina*, Cavalotti et al. (2009) observaram a morte de todos os organismos-teste no tempo monitorado de 48 horas, concluindo que o efluente com TNT apresenta toxicidade aguda. No processo de degradação de trinitrotolueno, quando este foi submetido ao contato com *Artemia salina*, o substrato mostrou-se tóxico, provocando a morte de todos os organismos-teste em 48 horas de exposição (CAVALOTTI, 2008).

Em trabalho realizado por Park et al. (2012) observaram que em dois tipos de tratamento com solos contaminados pelo efluente TNT (biorremediação por compostagem e lodos ativados) ocorreu maior redução de TNT com o processo de lodos ativados, onde também a toxicidade para o organismo-teste *Salmonella* apresentou níveis mais baixos, sendo um processo mais eficaz do que a compostagem na redução da toxicidade.

3.3 BASIDIOMICETOS

No Reino Fungi o Filo *Basidiomycota* possui organismos pluricelulares, de reprodução assexuada e sexuada e aeróbios. Vivem em regime de saprofitismo e parasitismo. Como saprófitas decompõem resíduos complexos de plantas e animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao meio. Como parasitas nutrem-se com a ajuda de hospedeiros vivos, causando doenças nesses hospedeiros. Tal regime de nutrição faz com que os fungos sejam heterótrofos que utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono e energia (OLIVEIRA et al., 2005).

São agrupados nesse filo fungos conhecidos popularmente como cogumelos e orelhas de pau. Segundo Raven; Evert; Eichhorn (1992), o micélio desses organismos é constituído por hifas septadas que geralmente são simples. Outra

característica desses é a produção de esporos, que são chamados de basidiósporos. Estes tem origem sexuada, em uma estrutura denominada basídio, que está localizada nos basidiomas. O basidioma define os fungos ou macrofungos como cogumelos e orelhas de pau.

Algumas espécies de fungos saprófitas utilizam os componentes da madeira para seu crescimento, e dentre os degradadores de madeira, segundo Souza e Rosado (2009), destacam-se os fungos:

- Fungos da podridão branca, que degradam três componentes principais da madeira, a celulose, a hemicelulose e a lignina, proporcionando coloração clara na sua degradação.
- Fungos de podridão parda degradam polissacarídeos celulose e hemicelulose, observando-se uma coloração escura nos locais degradados.
- Os fungos de podridão mole e alguns ascomicetos realizam a degradação da madeira dura em ecossistemas florestais.

Os fungos causadores de podridão branca são os organismos que melhor degradam a lignina, celulose e hemicelulose em moléculas menores até CO₂ e água (por isso, são denominados fungos ligninocelulolíticos), sendo desta forma, também empregados na biorremediação de poluentes. Os basidiomicetos ligninocelulolíticos segundo Salvi (2011) estão relacionados com a biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes.

Guimarães (2009) afirma que a grande maioria dos fungos produtores de enzimas ligninolíticas, que são necessárias e capazes de realizar a degradação de algumas substâncias, pertence ao filo *Basidiomycota*.

A capacidade dos micro-organismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos, bem como os processos que envolvem descoloração e metabolização de compostos são também estudados e tem atraído muita atenção (LACERDA et al., 2007).

3.3.1 Fungos da Podridão Branca

Fungos de podridão branca degradam os componentes principais da madeira, proporcionando coloração clara na sua degradação. Esses fungos estão sendo utilizados em tratamentos de biorremediação, na degradação de poluentes ambientais recalcitrantes e em tratamentos de efluentes industriais (SOUZA; ROSADO, 2009).

Neto et al. (2010) e Guimarães (2009) descrevem em seu trabalho que os fungos são produtores de várias enzimas, como lacases, lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) e outras peroxidases. As mesmas fazem parte do sistema ligninolítico destes, e são responsáveis pela degradação da celulose, hemicelulose e ligninas, além de degradarem outros xenobióticos como corantes têxteis.

Graças a essas enzimas com grande capacidade catalítica e o fato de possuírem hifas que penetram no substrato, alcançando mais facilmente os poluentes (NASCIMENTO, 2008), os fungos se apresentam como agentes eficientes em processos biotecnológicos. Outra questão de interesse são que os fungos de podridão branca parecem ser os únicos organismos capazes de converter lignina a CO₂.

O conhecimento das características físicas e químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos é de fundamental importância para a aplicação destes fungos em processos de biorremediação, são necessários estudos sobre essas enzimas e a sua produção efetiva de cada gênero fúngico (GUIMARÃES, 2009).

Vários fungos realizam a biodegradação de efluentes, como *Trametes versicolor* (KUNZ et al., 2002), os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes*, *Trametes villosa* e outros (SILVA, 2009).

Silva (2009, p. 25) destaca algumas vantagens da utilização de fungos basidiomicetos em processos de biodegradação.

O sistema enzimático, sendo extracelular, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos; 2) o sistema enzimático, sendo inespecífico, pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para misturas deles; 3) o sistema enzimático, sendo produzido em resposta às condições de limitação de nutrientes, não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença da

lignina ou do composto poluente; 4) este grupo de fungos possui vantagens competitivas, com relação aos outros micro-organismos, quando materiais lignocelulósicos são utilizados como fontes de carbono e 5) a degradação da lignina ocorre até que a sua concentração seja reduzida a níveis não detectáveis e o produto final é o CO₂.

Além destas vantagens, Santaella et al. (1996) citam como fatores indicadores do uso dos fungos em tratamentos biológicos sua capacidade de suportar possíveis choques nas cargas orgânica e hidráulica a eles submetidas e intensas e bruscas variações de pH, luz, umidade e oxigênio. Dentre esses fatores físicos que afetam o crescimento desses fungos, a temperatura ótima para seu desenvolvimento situa-se entre 22 e 30 °C a 62 °C. Os fungos toleram grande variação na concentração de íons, de modo geral, os fungos filamentosos podem crescer em faixa de pH entre 1,5 a 11 (TRABULSI et al., 1999).

Sales-Campos et al. (2008) estudaram o crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara* e observaram que o mesmo cresceu em temperaturas de 20 e 30 °C, mas obteve um maior crescimento na temperatura de 25 °C (KOMURA, 2009).

Assis (2011) e Gern (2005) em seus estudos constataram que os fungos do gênero *Pleurotus* crescem bem em 20 g/L de glicose.

De modo geral, os fungos desenvolvem-se melhor em um meio que tenha pH de 4 a 6, entretanto algumas espécies podem ser mais específicas e até mudar o pH do meio quando estão em crescimento (BITTON, 1994; GRIFFIN, 1994).

A aeração também é um fator importante no cultivo, por isso a agitação no meio de cultivo serve para melhorar a distribuição de oxigênio e outros nutrientes para as células fúngicas (BARBOSA et al., 2004).

3.3.2 Fungos do Gênero *Pleurotus*

Os fungos do gênero *Pleurotus* pertencem à ordem Agaricales e à família Pleurotaceae (NEVES, 2007). A autora Minotto (p. 13, 2007), descreve resumidamente o fungo *Pleurotus*:

Os fungos do gênero *Pleurotus*, popularmente conhecidos por Shimeji, apresentam o basidioma em forma de ostra. Estes são cogumelos comestíveis e de alto valor nutricional, pouco exigente em relação ao

substrato e de bom desenvolvimento em condições rústicas. As espécies podem ser encontradas naturalmente em florestas tropicais e subtropicais ou cultivados artificialmente para fins comerciais.

“O cogumelo *Pleurotus ostreatus* é uma fonte de proteína, e um organismo com habilidade efetiva de bioconverter vários materiais lignocelulósicos” (MAIO et al., 2004).

Em um estudo realizado com fungos do gênero *Pleurotus* por Rosolen et al. (2004), o mesmo mostrou que o fungo *P. ostreatus* produziu algumas enzimas em maior quantidade (MnP e lacase), do que o fungo *P. sajor-caju*. Dentre as enzimas, os autores observaram que a MnP teve maior produção. Segundo Delamatrice (2005), a enzima lignina peroxidase não foi detectada em *P. ostreatus*.

De acordo com Khalil et al. (2012), a atividade de produção de enzimas dos dois fungos, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, atingiu seu máximo após 10 dias de cultivo.

Segundo Jacques et al. (2007), *Pleurotus ostreatus* é um fungo ligninolítico que tem sido bastante estudado quanto a degradação de poluentes, e que apresenta um elevado potencial, para utilização em processos de biorremediação (PEREIRA, 2011).

De acordo com Ferreira (2009), *P. ostreatus* é uma espécie boa para a aplicação na biorremediação de solos contaminados com poluentes recalcitrantes porque este fungo apresenta um crescimento denso e eficiente na produção de enzimas ligninolíticas extracelulares em solo.

A espécie *Pleurotus ostreatus* variedade *floridae*, conhecida popularmente por *Pleurotus* branco, geralmente possui coloração branca, creme, marrom clara ou amarela, dependendo das condições de cultivo (NEVES, 2007).

Segundo Figueiró (2009), esta espécie é capaz de frutificar em temperaturas acima de 25 °C, bem como todos os fungos do gênero, pois Bononi; Capelari (1985) já afirmavam que a faixa de temperatura entre 20 e 30 °C é a ideal para eles.

3.4 BIORREMEDIAÇÃO

Biorremediação é o uso de organismos vivos (fungos, bactérias e alguns protozoários) em tratamento de ambiente contaminado para reduzir a concentração dos poluentes em níveis não detectáveis (NASCIMENTO, 2008), não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental (SALVI, 2011).

Outra definição que o autor Guimarães (2009) faz da biorremediação é que ela é um conjunto de tecnologias, que utilizam processos biológicos, aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas.

Os micro-organismos são capazes de biodegradar poluentes tóxicos, para obtenção de energia (alimento). Dentre os compostos biodegradáveis incluem-se os hidrocarbonetos, os preservantes de madeira, os solventes halogenados e os pesticidas (CETESB, 2012).

O contaminante pode funcionar como uma fonte de carbono e ou nitrogênio para os micro-organismos, sendo às vezes necessário o fornecimento de nutrientes como nitrogênio e fósforo, bem como um agente oxidante, que funcione como receptor de elétrons, além de outros nutrientes específicos para cada contaminante (CETESB, 2012).

A biorremediação pode ocorrer de acordo com várias técnicas que têm sido desenvolvidas. Segundo Guimarães (2009), elas são denominadas *in situ*, o processo de biodegradação ocorre no local contaminado, e *ex situ* quando o solo é retirado e transferido até a unidade de tratamento. Ainda, as principais alternativas de biorremediação, sendo *in situ* são segundo Jacques et al. (2007), a biorremediação intrínseca ou atenuação natural, a bioestimulação, o bioaumento ou bioenriquecimento, os biofiltros, a bioventilação, o “Land farming”, *ex situ* são a compostagem e os biorreatores.

Para determinar a técnica de remediação a ser utilizada, é necessário verificar qual a origem e o tipo de contaminante presente, ou seja, as classes e as concentrações dos elementos químicos, como eles são distribuídos na área. Ainda é necessário conhecer as condições hidrogeológicas e a situação do sítio contaminado, isto é, se o local é uma área industrial, urbana, rural ou de preservação ambiental, bem como o seu tamanho a ser remediada. Para isto é

necessário o mapeamento da região através de ensaios *in situ* e de laboratório (BRUM, 2010).

A biorremediação pode muitas vezes ser influenciada por alguns fatores como o pH, a temperatura, biodisponibilidade e características do solo, como a sua constituição, competição com organismos nativos e as interações entre o inóculo fúngico e a microflora do local.

Existem algumas vantagens do uso da biorremediação (CETESB, 2012; NASCIMENTO, 2008):

- ✓ Habilidade dos micro-organismos de biodegradar substâncias perigosas ao invés de meramente transferir o contaminante de um meio para outro;
- ✓ Eficiente em meios homogêneos e de textura arenosa;
- ✓ Baixo custo comparativamente a outras técnicas de remediação, se os compostos forem facilmente degradáveis;
- ✓ A tecnologia pode ser considerada como destrutiva dos contaminantes;
- ✓ Permite atingir concentrações alvo ambientalmente aceitáveis para o solo (destruindo a maior parte dos compostos biodisponíveis);
- ✓ São capazes de diminuir o efeito tóxico de muitos xenobióticos;
- ✓ Libera metabólitos que podem ser degradados por outros micro-organismos.

Maior segurança e menos perturbação do meio ambiente são os principais benefícios da biorremediação.

Lima et al. (2012) também relatam e defendem em seu trabalho a utilização de fungos na biorremediação. Ainda, afirmam que os fungos representam uma alternativa no tratamento de efluentes que possuem compostos aromáticos recalcitrantes no ambiente. E como essa técnica vem sendo utilizada há vários anos, e em certos casos apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (JACQUES et al., 2007), é uma alternativa de tratamento mais “limpa”.

Os processos de biorremediação vêm sendo bastante estudados e desta forma destacam-se como uma das formas menos agressivas de tratamento, pois envolvem basicamente a atividade microbiana, onde é possível utilizar os micro-organismos que cada ambiente dispõe, porém, em áreas a serem tratadas mais rapidamente ou mais eficientemente, é necessário a biorremediação monitorada.

3.4.1 Aplicação de Fungos Causadores de Podridão Branca em Biorremediação

A decomposição da matéria orgânica é um processo que ocorre naturalmente pela ação de organismos como fungos e bactérias. Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza. Estas precisam ser degradadas em unidades menores antes de sua assimilação (GUIMARÃES, 2009).

Os fungos são usados atualmente para a degradação de inúmeros poluentes ambientais, embora algumas observações da transformação de compostos aromáticos poluentes realizados por fungos de podridão branca já datem de 40 anos atrás (SALVI, 2011).

A regulação fisiológica e as propriedades bioquímicas das ligninases de espécies consideradas referências na produção deste sistema enzimático, como aquelas pertencentes aos gêneros *Phanerochaete*, *Trametes*, *Lentinus* ou *Pleurotus*, têm sido muito estudadas. A aplicação destas enzimas foi demonstrada com sucesso na mineralização ou transformação química associada à redução da toxicidade de moléculas recalcitrantes, que incluem hidrocarbonetos aromáticos, organoclorados, organofosforados, combustíveis, pesticidas e solventes de diferentes classes químicas (HENN, 2009).

Espécies como *Higrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophora cinerea*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Psilocybe castanella*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (SALVI, 2011) são envolvidos na degradação de moléculas, tais como pesticidas clorados, dioxinas, bifenilas policloradas, além de hidrocarbonetos aromáticos, pentaclorofenol e hexaclorobenzeno.

Vários fungos da podridão branca (ligninolíticos), descolorem e degradam efluentes têxteis com bons resultados (GUIMARÃES, 2009).

Silva (2005) realizou seu trabalho com efluente de indústria de papel e celulose, e seus resultados foram favoráveis a degradabilidade do poluente por parte dos fungos utilizados no estudo (*Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella*).

Machado e Matheus (2006) avaliaram o potencial de degradação do azul brilhante de remazol por extratos obtidos de substratos sólidos colonizados por *P. ostreatus* e por extratos do resíduo da produção do cogumelo "shimeji". O trabalho foi realizado com a extração das enzimas (peroxidases e lacases) e aplicação

destas sobre o poluente. Foi evidenciado o potencial enzimático de *Pleurotus ostreatus* e do resíduo da produção do cogumelo para a degradação de compostos xenobióticos.

Barnabe (2003) teve como objetivo verificar a ação descontaminante de *P. ostreatus* junto aos herbicidas Paraquat e Diquat em teste laboratoriais, usando o ensaio respirométrico de BARTHA e PRAMER em frascos GLENDHILL. O autor verificou então a resistência dos fungos e a biodegradabilidade dos herbicidas.

Nitroaromáticos podem ser efetivamente degradadas por culturas de fungos de decomposição branca, destacando espécies como *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium*. Os fungos desta classe produzem enzimas extracelulares responsáveis pela efetiva degradação de inúmeros substratos resistentes (CAVALOTTI, 2008).

Na busca de tecnologias mais limpas e menos onerosas, basidiomicetos saprófitas, dentre os quais os do gênero *Pleurotus*, têm sido estudados por diferentes grupos de pesquisa e tem se mostrado capazes de degradar compostos organoclorados como clorolignina e clorofenóis (GARCIA, 2009). No entanto, ainda são escassos os relatos da biodegradação por *Pleurotus* de compostos nitroaromáticos como 2,4,6-trinitrotolueno.

O TNT não é facilmente biodegradado, pois o metabolismo oxigenado de bactérias para compostos aromáticos não ocorre no mesmo por causa de suas propriedades químicas, já que as formas parcialmente reduzidas deste reagem entre elas na presença de oxigênio para formar compostos mais mutagênicos que o próprio e que não são metabolizáveis por micro-organismos (SOARES et al., 2011). Por isso, o uso de fungos para a biorremediação do TNT tem gerado interesse considerável (ESTEVE-NUNEZ et al., 2001).

Vários são os métodos de biorremediação. Em biorreatores, por exemplo, Hofrichter et al. (1998), descrevem a degradação enzimática de um amplo espectro de substâncias aromáticas e alifáticas pelo sistema enzimático do fungo *Nematoloma frowardii*, onde a preparação de enzimas produzidas pelo mesmo mineralizou o TNT. Porém, a forma ou o mecanismo pelo qual os fungos mineralizam o explosivo TNT não é conhecida atualmente (HOFRICHTER et al., 1998).

Hofrichter et al. (1998) citam em seu trabalho sobre degradação de TNT, que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* tem baixa tolerância ao composto, o que

pode indicar que o fungo não seja um bom biorremediador de sítios contaminados com explosivos. Contudo Valli et al. (1992) afirmam que em condições que maximizem o crescimento fúngico, o fungo *P. chrysosporium* mineraliza o 2,4-dinitrotolueno, que também é um dos compostos do efluente da AV.

Scheibner e Hofrichter (1998) mostraram que o fungo da podridão branca *Nematoloma frowardii* e o basidiomiceto *Stropharia rugosoannulata* foram capazes de mineralizar uma mistura de produtos de redução a partir de TNT.

Van Aken et al. (1999) mostraram que a preparação concentrada de MnP de *Phlebia radiata*, foi capaz de transformar completamente TNT (22% de mineralização) e 2-amino-4,6-dinitrotolueno (76% mineralização).

Phanerochaete chrysosporium e *Pleurotus ostreatus* foram adaptados para crescer em concentrações elevadas de TNT e assim foram estudados no que diz respeito à sua capacidade para degradar o mesmo substrato em culturas líquidas. Ambas as linhagens foram capazes de causar degradação extensiva de TNT (AXTELL et al., 2000).

Muitos fungos, como *Clitocybula dusenii* e *Stropharia rugosoannulata* (HOFRICHTER et al., 1998), são capazes de reduzir e mineralizar TNT sob condições ligninolíticas (ESTEVE-NÚÑEZ et al., 2001).

Estudos envolvendo a degradação de TNT (100 mg/L) relatam a completa degradação do substrato em 9 horas de tratamento, utilizando-se *Ceratocystis coerulea* e *Lentinus lepideus* (CHEONG et al., 2003).

Segundo Kim e Song (2000), o fungo *Irpex lacteus* conseguiu que o 2,4,6-trinitrotolueno na concentração de 100 mg/L fosse degradado completamente em 10 horas de incubação.

As potenciais vantagens do tratamento com fungos são várias, mas também podem mudar as características de um determinado rejeito para torná-lo mais receptivo ao tratamento, ou auxiliar na bioconversão dos rejeitos em produtos de maior valor agregado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados nos Laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Curitiba – sede Ecoville e nos Laboratórios da UTFPR – Campus Pato Branco conforme fluxograma na Figura 5. A avaliação do potencial de tratabilidade fúngica pelos organismos do gênero *Pleurotus* foi desenvolvida seguindo três etapas. Em uma primeira etapa, o potencial impactante do efluente Água Vermelha (AV) foi avaliado com base na literatura científica (HELFERICH, 2012; GUERRA, 2011; RODRIGUES et al., 2007) e através de ensaios de caracterização física, química e ecotoxicológica cujos métodos estão descritos na seção 4.2. Na segunda etapa foram realizados dois estudos, um da velocidade de crescimento em meio sólido descrito na seção 4.3 e outro em meio líquido descrito na seção 4.4. Na última etapa foi realizado um estudo da tratabilidade segundo as condições definidas pela segunda etapa, em meio líquido com frascos agitados conforme a seção 4.7. Por fim, o efluente tratado sob condições otimizadas foi caracterizado segundo os parâmetros descritos na primeira etapa.

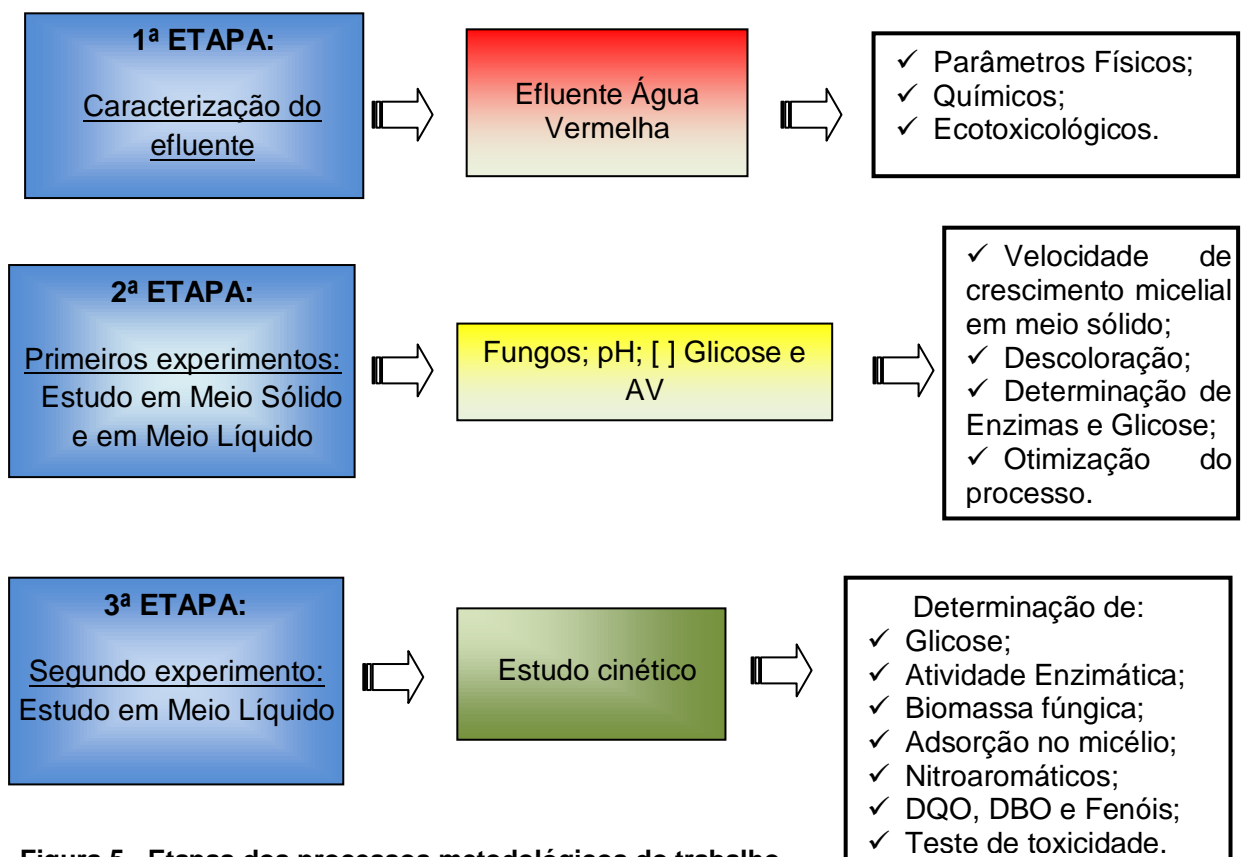


Figura 5 - Etapas dos processos metodológicos do trabalho.

4.1 AMOSTRA DE EFLUENTE

A amostra do efluente AV foi gentilmente cedida pela indústria de Material Bélico do Brasil – IMBEL, localizada na cidade de Piquete, estado de São Paulo. A amostragem foi do tipo composta, sendo o efluente coletado em alíquotas em períodos de tempo pré-determinados proporcionais à vazão do efluente AV (300 L/hora), para composição de uma amostra representativa. Esta amostra foi dividida em volumes menores, estocados em câmara fria a -20 °C no laboratório da UTFPR de Pato Branco.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente foi caracterizado segundo a determinação de sólidos totais, sólidos suspensos, sólidos dissolvidos totais, sólidos fixos e voláteis, sulfatos, nitratos, nitritos, nitrogênio orgânico, fenóis totais, demanda química de oxigênio (DQO) e da demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Realizou-se também a caracterização por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrofotometria de Massas (CG/MS), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. O padrão de TNT foi cedido pela IMBEL. Demais padrões nitroaromáticos e aminonitroaromáticos (Supelco) foram importados e utilizados como referência para caracterização cromatográfica e identificação espectrométrica.

4.2.1 Determinação de Sólidos Totais

Para a determinação do teor de sólidos totais, uma amostra de 100 mL do efluente, previamente neutralizada com NaOH 6 mol/L, foi adicionada em um balão de fundo redondo, concentrada a vácuo em rotaevaporador e seca em estufa até massa constante, à 103-105 °C (IAL, 1985).

4.2.2 Determinação de Sólidos Suspensos

Por definição, sólidos suspensos são todos os sólidos sedimentáveis e flutuantes presentes no efluente. Na prática, os sólidos suspensos foram aqueles passíveis de serem retidos por filtração em filtro à base de fibra de vidro e posteriormente secos a 103-105 °C até peso constante (IAL, 1985).

4.2.3 Determinação de Sólidos Dissolvidos Totais

Para a determinação do teor de sólidos dissolvidos totais, 100 mL do filtrado gerado na determinação de sólidos suspensos foram adicionados em um balão de fundo redondo, concentrado a vácuo em rotaevaporador e seco em estufa até massa constante, à 103-105 °C (IAL, 1985).

4.2.4 Determinação de Sólidos Dissolvidos Fixos

Submeteram-se os sólidos totais obtidos conforme procedimento descrito na seção 4.2.3, à calcinação em mufla a (550 ± 50) °C por 1 hora. Deixou-se esfriar em dessecador e o mesmo foi pesado com precisão de 0,1 mg.

4.2.5 Determinação de Sólidos Dissolvidos Voláteis

Efetuuou-se a diferença dos valores obtidos de sólidos totais (procedimento da seção 4.2.3) e de sólidos fixos (procedimento da seção 4.2.4), o valor encontrado foi o de sólidos voláteis.

4.2.6 Determinação de Sulfatos

A determinação de SO_4^{-2} foi realizada através de metodologia turbidimétrica. O método baseia-se na precipitação seletiva de sulfato na forma de BaSO_4 (Reagen), seguida de sua quantificação pela medida da opacidade ótica em 420 nm (APHA, 1995).

4.2.7 Determinação de Nitratos

A determinação foi realizada de acordo com método padrão. Foi utilizado um eletrodo de íon seletivo para nitrato, Marca Quimis, modelo QA838, com sensibilidade de 0,5 a 1500 mg NO_3 mg/L (APHA, 1995).

4.2.8 Determinação de Nitrogênio Orgânico

O método de Kjeldahl (micro-Kjeldhal) foi utilizado para determinação do nitrogênio orgânico presente no efluente AV. Este método baseia-se na determinação do nitrogênio da amostra, através da digestão com ácido sulfúrico concentrado e posterior destilação da amônia, a qual é fixada em solução ácida e titulada (APHA, 1995).

4.2.9 Determinação de Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais foi determinada colorimetricamente conforme o procedimento padrão de Folin-Ciocalteau (Merck). O princípio do método é a reação entre o reagente de Folin-Ciocalteau e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul (APHA, 1995).

4.2.10 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

As determinações foram realizadas de acordo com o procedimento padrão adaptado com algumas modificações. Em tubos de vidro foram adicionados 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de solução digestora (preparada com 10,12 g de dicromato de potássio; 33,3g de sulfato de mercúrio II; 167 mL de H₂SO₄, completados para 1000 mL com água destilada) e 3,5 mL de solução catalítica (preparada na proporção de 5,5 g de AgSO₄ (Marca Reagen), kg⁻¹ de H₂SO₄ concentrado). Em seguida, os tubos foram alocados em bloco digestor e mantidos a temperatura de 150 °C por 2 horas. Após resfriamento, foi realizada leitura de absorvidade, no comprimento de onda de 600 nm. A concentração da demanda de O₂ da amostra, em mg/L, foi obtida pela interpolação dos dados obtidos de uma curva de calibração utilizando biftalato de potássio como padrão (APHA, 1995).

4.2.11 Determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A quantidade de matéria orgânica biodegradável na amostra foi determinada pela diferença de concentração de oxigênio dissolvido, antes (ODi) e após a incubação por 5 dias (ODf) das amostras a 20 ± 1 °C, ao abrigo da luz (APHA, 1995).

4.2.12 Determinação de TNT e compostos Nitroaromáticos

A determinação de TNT e nitroaromáticos (2,4-dinitrotolueno e 2,6-dinitrotolueno) foi realizada por CG/MS e CLAE, para observar e quantificar a degradação ou a mineralização do efluente AV no processo de biodegradação fúngica em meio líquido.

4.2.12.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS)

O procedimento experimental foi realizado de acordo com modificação da metodologia descrita por Keum e Li (2004). Uma alíquota de 2 mL do efluente filtrado em membrana 0,45 micrometros foi seca em banho-maria sendo o material resultante redissolvido em metanol grau cromatográfico. As amostras assim preparadas foram analisadas em cromatógrafo gasoso Varian 431-GC acoplado a um detector de massa Varian 210-MS, operando em faixa de aquisição de 50-250u, energia de ionização de 70 eV e modo de aquisição normal (impacto de elétrons; transferline coluna/MS a 200 °C) íon trap à 170 °C. A programação de temperatura foi: 50 °C, 1 minuto, 10 °C/minuto até 120 °C; 3 °C/minuto até 200 °C, temperatura do injetor de 250 °C, split 1:25. A coluna utilizada foi a capilar Chrompack WCOT CP-Sil 8 LB/MS, dimensões: 30 m x 0,25 mm; espessura de filme: 0,25 µm.

4.2.12.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação de TNT e de nitroaromáticos majoritários foi realizada por CLAE com aparelho Varian modelo 920-LC com uma coluna *Microsorb-MV 100-5 C18* com dimensões de 250X4 6mmx1/4", para cromatografia em fase reversa, usando fase móvel composta por metanol: água 70:30, com fluxo isocrático de 0,8 mL/minuto , detector com arranjo de diodo (PDA) com varredura de 200 a 600 nm em canais simultâneos de 254 e 273 nm. O preparo da amostra para injeção no HPLC foi feito por extração em fase sólida (SPE). (HELFERICH, 2012). Foi utilizado 50 mL do efluente 1% e adicionado 15 g de cloreto de sódio, sendo feita a homogeneização da amostra e filtrando em papel filtro qualitativo. A coluna C18 de SPE foi pré-condicionada passando pela coluna dois volumes de metanol e em seguida dois volumes de água destilada. Em seguida a amostra foi passada pela coluna, os compostos retidos foram eluídos em 2 mL de metanol, e filtrado em uma membrana CHROMAFIL® Xtra PVDF-45/25 PVDF, sendo então recolhidos em um frasco.

4.3 TOXICIDADE AGUDA DO EFLUENTE AV COM *Daphnia magna*

Para avaliar aspectos relacionados com a ecotoxicologia do efluente AV, bioensaios foram realizados utilizando-se *Daphnia magna*.

O teste foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR Curitiba – sede Ecoville, onde os microcrustáceos *Daphnia magna* são cultivados conforme carta de controle (ANEXO 1), visando determinar a toxicidade aguda do efluente AV.

Para realizar o teste foi utilizado o efluente AV na concentração de 0,5% e 1%. O autor Helferich (2012) também utilizou o mesmo efluente diluído, em seu trabalho diluiu o mesmo a 0,01% e mesmo assim, não conseguiu realizar a mineralização dos compostos da AV.

Foram colocados 20 mL da amostra do efluente em contato com 10 indivíduos jovens de *Daphnia magna* (de 2 a 24 horas de vida), durante um período de 24 e 48 horas, com várias diluições da amostra. Ao final dos dois períodos, foi feita a contagem dos microcrustáceos sobreviventes.

A validação dos testes foi feita sob a condição do teste (controle) não apresentar mais que 10% de mortalidade, sendo considerados mortos os microcrustáceos que não apresentam mobilidade em 10 segundos de observação.

Os procedimentos seguiram a NBR 12713 (ABNT, 2009) que avalia a toxicidade aguda de amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e de substâncias químicas solúveis ou dispersas em água.

O fator de toxicidade para *D. magna* (FT_D), foi determinado considerando-se a menor diluição da amostra em que não ocorreu imobilidade em mais de 10% dos organismos, que é igual ao fator de diluição.

Inicialmente foram preparadas a partir da amostra (efluente) uma série de diluições contendo água de diluição e a própria amostra. As amostras foram submetidas aos seguintes fatores de diluição: 1 (100% da concentração de 0,5 do efluente); 2 (50%, sendo o efluente diluído a 0,25); 4 (25% na concentração de 0,125); 8 (12,5%, do efluente à 0,062); 16 (6,25%, ficando o efluente AV na concentração de 0,031) e 32 (3,125% e este estava na concentração de 0,01 de AV), conforme Figura 6, o mesmo repetiu-se para a amostra de AV a 1%.

O critério utilizado para o teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foi a fator de diluição (FD), que estabelece a concentração do efluente que pode

ocasionar a mortalidade ou imobilidade superior a 10% dos organismos expostos durante 48 horas nas diferentes concentrações do efluente. Após o tempo de prova (24 e 48 horas), observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração e determinou-se o FT_D .



Figura 6 – Fotografia das diluições do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos para o teste com *D. magna*.

Para cada concentração foram utilizadas três réplicas, com 10 organismos em cada, num volume de 20 mL (GARCIA 2009). Após o tempo de prova (24/48 horas), observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração.

No início do segundo experimento foi realizado um teste com a *D. magna* com o efluente utilizado no tratamento fúngico. Após o tratamento fúngico da AV, no 15º dia foi realizado um teste final visando determinar a toxicidade dos subprodutos gerados durante os tratamentos em comparação com o efluente não tratado.

4.4 ORGANISMOS

Os organismos utilizados neste trabalho foram os fungos ligninolíticos *Pleurotus ostreatus* POS 560 e o *Pleurotus floridae* PSP 1, cedidos pela Fungibrás. Os mesmos foram cultivados em placas de Petri com meio nutritivo contendo Agar-

batata-dextrose (BDA), mantidos em geladeira na temperatura de 6 °C, sendo repicados a cada 6 meses (FAN; SOCCOL, 2001).

4.4.1 Inoculação

O inóculo dos fungos foi obtido segundo o método de Spier (2005), utilizando uma suspensão de células na concentração de 10^4 células/mL (RODRIGUES et al., 2010).

4.4.1.1 Preparo da suspensão de células de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus floridae*

Após a distribuição e solidificação do meio de cultivo esterilizado em Erlenmeyers autoclavados, procedeu-se a semeadura dos fungos, que foram incubados em estufa (De Leo, modelo B3CBE), a 25 °C por 7 dias, como mostra a Figura 7 (KOMURA, 2009).

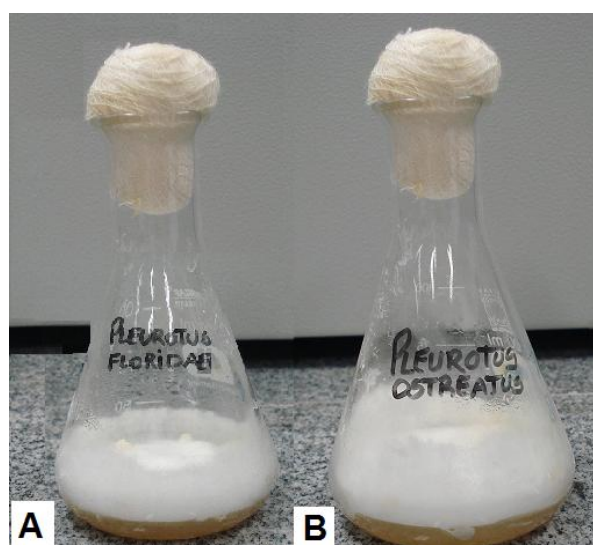


Figura 7 – Fotografia do Cultivo de *Pleurotus floridae* (A) e Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (B).

Em um Erlenmeyer de 100 mL foi adicionado 35 mL de água deionizada, Tween 80 a 0,2% (SPIER, 2005), 3,0 g de pérolas de vidro e duas barras de ferro magnéticas, sendo o conjunto autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Ao final do cultivo, o conteúdo do Erlenmeyer menor foi vertido sobre a biomassa fúngica, e o conjunto foi mantido no agitador magnético (d. Tomé) por 15 minutos (SPIER, 2005).

4.4.1.2 Contagem de células de *P. ostreatus* e *P. floridae*

A suspensão de células obtida foi quantificada em câmara de Neubauer (SPIER, 2005) e o resultado confirmado por contagem em placas.

O resultado foi expresso por células em $0,1\text{mm}^3$, o qual foi convertido em células por mL, segundo a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células por mL} = \text{n}^\circ \text{ total células} / 0,1\text{mm}^3 \cdot 1000 \text{ mm}^3 / 1\text{mL} \cdot \text{fator de diluição}$$

O resultado foi confirmado por contagem em placas, através do plaqueamento em BDA Himedia pela técnica do espalhamento, sendo a resposta fornecida em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL. Realizado em triplicata nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} (RODRIGUES et al., 2010), onde foi adicionado 0,1 mL nas placas para posterior contagem das colônias, seguida de incubação 26 °C por 24/48 horas (APHA, 1998). O inóculo foi então adicionado aos experimentos.

4.5 PRIMEIRO EXPERIMENTO: CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO

4.5.1 Preparo de Placas de Petri

O preparo das placas de Petri com poços foi realizado em duas etapas segundo adaptação do método utilizado por Ferronato e Salmaso (2010), que utilizou 40 mL de meio para o preparo das placas, para colocar a suspensão de células fúngicas de forma padronizada no centro de cada placa.

Na primeira etapa as placas de Petri foram esterilizadas e depois foi adicionado 10 mL de meio de cultivo previamente preparado e autoclavado.

Na segunda etapa, após o meio frio, cilindros de 8 mm de diâmetro previamente esterilizados e frios foram colocados no centro da placa, com auxílio de uma pinça estéril, mas evitando chegar ao fundo da mesma. Acrescentou-se mais 10 mL do meio e deixou-se esfriar. Foi retirado com cuidado o cilindro e girado algumas vezes para o mesmo desprender sem rasgar o meio.

4.5.2 Condições do Experimento

Um delineamento experimental foi realizado com o objetivo de avaliar comparativamente o crescimento e tolerância dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus floridae* nos meios de cultivo contendo o efluente AV.

Os fungos foram submetidos ao crescimento em placas de Petri com meio sólido composto por 20 mL de Ágar Bacteriológico (Himedia) e diferentes condições de pH, concentrações de AV e concentrações de glicose (Tabela 1) para a determinação e otimização do processo.

Após a obtenção da suspensão de células, inoculou-se 0,1 mL da suspensão micelial em cada placa de Petri (resultando em um inóculo de 10^4 células/mL), previamente preparada na condição específica de pH e concentração de glicose específica e AV (RODRIGUES, 2006).

Variáveis de natureza descontínua e contínua foram estudadas segundo um delineamento fatorial do tipo completo com quatro fatores experimentais e dois níveis de variação.

As diluições do efluente AV a 1% e a 0,5% foram utilizadas no delineamento experimental e obtidas a partir de diluições feitas da concentração de 10% de AV com água de diluição (HELFERICH, 2012). Na concentração de 0,5% o pH estava em 6,1 e na concentração de 1% o pH estava em torno de 5,8.

Para ajuste do pH foram utilizadas soluções de NaOH 1M e HCl 1M (NEDER, 1992). De acordo com o planejamento fatorial, o pH das amostras de AV em diferentes concentrações (0,5 e 1%) foi ajustado para 5 e 6. Segundo Bitton (1994) e Griffin (1994) o pH entre 4 a 6 permite um maior crescimento fúngico. A leitura do pH foi realizada por um sensor de pH (Tecnopon, modelo mPA - 210).

Ao meio de cultivo foram adicionadas as concentrações de 10 e 20 g/L de glicose (ASSIS, 2011; GERN, 2005).

Na Tabela 1 encontram-se as variáveis e níveis utilizados no estudo. Na Tabela 2 pode ser visualizada a matriz do planejamento experimental. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o cultivo dos fungos realizado em estufa na temperatura de 26 °C por 7 dias (SALES CAMPOS et al., 2008).

Tabela 1 - Variáveis e níveis de estudo.

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
Fungo	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. floridae</i>
pH	5,0	6,0
Glicose	10	20 g/L
Concentração do efluente AV	0,5%	1,0%

Fonte: própria.

Tabela 2 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2⁴ com os fungos do gênero *Pleurotus*.

Níveis/ ensaios	Fungo	pH	Glicose	% Efluente	Resposta
1	-	-	-	-	Velocidade de crescimento radial
2	+	-	-	-	
3	-	+	-	-	
4	+	+	-	-	
5	-	-	+	-	
6	+	-	+	-	
7	-	+	+	-	
8	+	+	+	-	
9	-	-	-	+	
10	+	-	-	+	
11	-	+	-	+	
12	+	+	-	+	
13	-	-	+	+	
14	+	-	+	+	
15	-	+	+	+	
16	+	+	+	+	

Fonte: própria.

O estudo foi realizado para avaliação da significância dos efeitos principais e interação com 95% de confiança e trinta e dois graus de liberdade. Foram realizados ensaios em triplicata, sendo um o controle, sem o organismo.

Também foi realizado neste experimento em meio sólido um acompanhamento do crescimento fúngico em Ágar.

4.5.3 Medição do Crescimento Radial

O acompanhamento da progressão linear do crescimento fúngico foi realizado por uma semana, a cada 24 horas, até que a borda da placa fosse atingida (FAN e SOCCOL, 2001).

Visando determinar a velocidade do crescimento dos organismos e a relação deste nos diferentes meios de cultivo, na parte inferior das placas de Petri foram marcados três raios partindo do centro até sua extremidade, sobre os quais o crescimento micelial (Figura 8) foi medido com o auxílio de um paquímetro (FAN; SOCCOL, 2001). Para esta leitura do crescimento em centímetros *versus* dia foi feita a adaptação da metodologia de Colla et al. (2008), que observaram o crescimento por 5 dias marcando 6 raios.

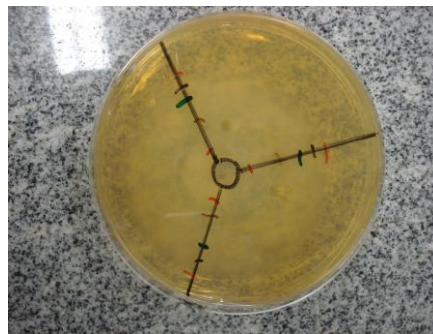


Figura 8 – Placa de Petri com marcação de três raios.

Após o período de leitura do crescimento micelial, os resultados foram compilados para análise estatística.

4.6 PRIMEIRO EXPERIMENTO: BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS DE EFLUENTE AV EM MEIO LÍQUIDO

4.6.1 Preparo dos Erlenmeyers com Meio Líquido

Os Erlenmeyers de 250 mL receberam 100 mL do efluente AV a 0,5%, onde o pH foi corrigido para 6, e adicionou-se glicose na concentração de 10 g/L.

Estes frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Depois estes foram inoculados com os dois fungos com 4 mL da suspensão de micélio, segundo adaptação do método utilizado por Devi et al. (2009) utilizado na contagem das células, e incubados em Incubadora *Shaker* SL 222 (SOLAB) a 120 rpm (SPIER, 2005) e 26 °C (HENN, 2009).

O experimento foi realizado em 4 repetições, por 7 dias (BABÁ et al., 2009), e em frascos-controle (sem o organismo).

No delineamento em meio líquido com efluente na concentração de AV à 0,5%, foram preparados quatro diferentes meios, sendo: 1 (pH 6; 10 g/L de glicose), 2 (pH 6; 20 g/L de glicose), 3 (pH 5; 10 g/L de glicose) e 4 (pH 5; 20 g/L de glicose), onde posteriormente foram inoculados nos meios os fungos *P. floridae* e *P. ostreatus*.

4.6.2 Condições do Experimento

Para auxiliar a escolha dos parâmetros para o segundo experimento em meio líquido, realizou-se um teste piloto do mesmo, com diferentes meios contendo pH diferente e duas concentrações de glicose, 10 e 20 g/L. O efluente AV da indústria de explosivos foi utilizado na menor concentração (0,5%), seguindo os resultados dos estudos em meio sólido e o teste de toxicologia com a *D. magna*.

Nas Tabelas 3 e 4 estão indicadas as variáveis do meio líquido, bem como a matriz padrão deste delineamento experimental.

Tabela 3 - Variáveis e níveis de estudo na concentração do efluente a 0,5% de Água Vermelha.

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
Fungo	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. floridae</i>
pH	5,0	6,0
Glicose g/L	10	20

Fonte: própria.

Tabela 4 – Matriz padrão para o planejamento experimental 2³ com os fungos do gênero *Pleurotus*.

Níveis/ ensaios	Fungo	pH	Glicose	Resposta
1	-	-	-	Velocidade de Descoloração e Atividade Enzimática
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	

Fonte: própria.

Os cultivos em meio líquido foram conduzidos conforme descrito na seção 4.4.3, seguindo o primeiro experimento em meio sólido que indicou a concentração 0,5% do efluente como menos tóxica aos organismos em estudo (BABÁ et al., 2009; FERREIRA, 2009), diferentes concentrações de glicose e pH ajustado para 5 e 6.

Após 7 dias os Erlenmeyers foram retirados e o micélio separado por filtração. O filtrado foi utilizado para as análises de descoloração, concentração de nitroaromáticos, glicose e de enzimas. A descoloração das amostras tratadas foi determinada por cromatografia. A glicose foi determinada pelo método DNS e a determinação enzimática foi realizada conforme descrito, na seção 4.8.3.

4.7 SEGUNDO EXPERIMENTO: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS EM FRASCOS AGITADOS

A cinética de degradação de nitroaromáticos foi realizada em meio líquido com frascos agitados contendo a condição escolhida no segundo experimento.

Os cultivos foram conduzidos conforme descrito na seção 4.6, com o fungo escolhido conforme o planejamento experimental após otimização e escolha dos principais parâmetros de análise.

O experimento foi realizado em triplicata, por 15 dias (FERREIRA, 2009), e em frascos-controle (sem o organismo). Alíquotas para verificação dos processos de biodegradação foram determinadas diariamente, através da retirada de 3 frascos para as análises descritas em 4.8. As análises ecotoxicológicas (item 4.3) foram realizadas no 1º dia do estudo e no 15º dia, retirando-se 2 frascos para cada análise.

Ao final, as amostras foram filtradas para a determinação da biomassa (4.8.1), e análise de adsorção de algum composto nitroaromático contido no micélio (4.8.2). Alíquotas de 5 mL foram retiradas da amostra filtrada para a determinação enzimática e de glicose, sendo o restante congelado para as análises de fenóis, DBO, DQO e a determinação de nitroaromáticos por CG/MS. Fenóis, DBO, DQO e nitroaromáticos foram determinados na Central de Análises da UTFPR, campus de Pato Branco.

A cor do cultivo com o efluente foi monitorada durante 15 dias pela determinação da absorbância no comprimento de onda de máxima absorção para dinitrotoluenos ($\lambda_{\text{máx}}=290$ nm) utilizando-se espectrofotômetro. Todas as medições foram realizadas com amostras submetidas a correção de pH (7,6) e filtradas em membrana 0,45 μm .

4.8 CONTROLE ANALÍTICO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS NITROAROMÁTICOS DE AV EM MEIO LÍQUIDO

4.8.1 Determinação da Biomassa Micelial

Para determinação da concentração de biomassa micelial, as amostras de 100 mL dos frascos de Erlenmeyers foram filtradas em papel Whatmann nº.1 (previamente seco por 24 horas a 60 °C e pesado) e lavados com 100 mL de água destilada (RUEGGER, 2001).

O papel filtro com o micélio foi colocado em estufa durante 48 horas a 60 °C. O peso seco foi determinado gravimetricamente em balança analítica (Radwag AS 220/C/1) (RUEGGER, 2001) e depois foi subtraído o valor do peso final pelo inicial, para obtenção do peso total.

4.8.2 Determinação da Adsorção de Nitroaromáticos pelo Micélio

A adsorção no micélio fúngico foi realizada após a determinação da biomassa (PEREIRA, 2011).

Para determinação do contaminante adsorvido aos micélios, a biomassa retida no papel filtro, foi macerada em tubos de ensaio com auxílio de bastão de vidro e adicionados 2 mL de metanol espectroscópico seguindo-se a filtração em membrana de 0,22 µm e coletados em frascos *vial* onde foram posteriormente injetados no cromatógrafo conforme os procedimentos para quantificação de nitroaromáticos descritos por Helferich (2012).

4.8.3 Determinação de Glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). As amostras foram diluídas de forma que a concentração de substrato estivesse entre os valores da curva padrão, cujas concentrações variaram de 0 a 1 g/L de glicose. A 1 mL das amostras diluídas foi acrescentado 1 mL do reagente DNS. Simultaneamente foi feita a curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Em seguida, a mistura foi colocada em banho-maria (Tecnal TE – 056) à 100 °C por 5 minutos, deixada resfriar e acrescida de 13 mL de água destilada. O valor da absorbância foi medido a 540 nm. A concentração de glicose foi determinada relacionando-se o valor da absorbância lida para cada amostra com a respectiva concentração na curva padrão (GARCIA, 2009).

4.8.4 Determinação Enzimática

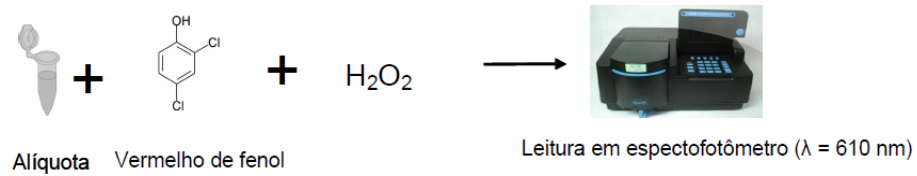
As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas.

A atividade enzimática é a quantidade de substrato que em uma reação enzimática particular é convertida em produto por unidade de tempo em condições determinadas (FORGIARINI, 2006).

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a transformação de 1 μmol de produto por minuto em condições padronizadas. A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg) (ROVEDA et al., 2010).

Nos organismos utilizados, as enzimas geralmente produzidas são peroxidase, manganês peroxidase e lacase, as quais foram determinadas segundo Pereira (2011) (Figura 9), sendo as reações realizadas em triplicata e as leituras de absorbância efetuadas com auxílio de espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV-VIS Cary-50, da Varian). A enzima lignina peroxidase não é produzida por *P. ostreatus* segundo Delamatrice (2005), portanto não foi determinada.

• **Manganês Peroxidase**



• **Lacase**

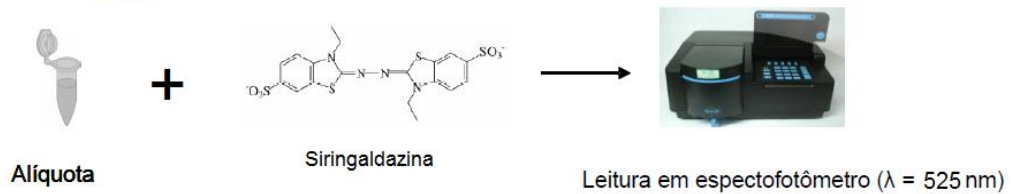


Figura 9: Esquema das etapas de determinação enzimáticas.

Fonte: (PEREIRA, 2011).

Os resultados de atividade enzimática foram calculados pela fórmula (PERREIRA, 2011):

$$U/L = (\Delta Abs / \xi \times R \times t) \times 10^6$$

Onde:

U/L = Unidade Internacional, onde internacional significa micromol por minuto

ΔAbs = Absorbância (Abs final – Abs inicial)

ξ = Coeficiente de absorção molar

R = Volume da amostra (mL)

t = tempo de reação em minutos

10⁶ = Conversão da medida para litro

Coeficientes de absorção molar:

Lacase (525 nm) = 65000 (Lacase)

Peroxidase (525 nm) = 65000 (Peroxidase)

Manganês Peroxidase (610 nm) = 4460 (MnP)

4.8.4.1 Atividade de Peroxidase

Foi utilizado 0,6 mL de filtrado enzimático centrifugado, adicionado a um tubo contendo: 0,1 mL de siringaldazina em 1 mM de etanol absoluto, 0,6 mL de tampão citrato fosfato 0,05 M e 0,1 mL de H₂O₂ 2 mM. Após 10 minutos de reação a amostra foi lida em 525 nm (SZKLARZ, 1989).

4.8.4.2 Atividade Manganês Peroxidase

Foram adicionados 0,5 mL da amostra à 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO₄ 2 mM, 0,1 mL de H₂O₂ 2 mM preparado em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,0) (SARTORI, 2011) e 0,1 mL de vermelho de fenol (0,1%). A amostra foi analisada na temperatura de 30 °C após 5 minutos de reação (interrompida pela adição de 0,04 mL NaOH) no comprimento de onda de 610 nm (KUWAHARA, 1984).

4.8.4.3 Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi determinada segundo o protocolo de Szklarz et. al (1989), adicionando o meio centrifugado (0,6 mL) a um tubo contendo 0,1 mL de siringaldazina com 1 mM em etanol absoluto, 0,6 mL de tampão citrato fosfato 0,05 M e 0,1 mL de água deionizada. A reação ocorreu após 10 minutos e foi realizada a leitura em 525 nm (SZKLARZ et al., 1989).

4.9 MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS, VIDRARIAS E RESÍDUOS

As normas de segurança laboratoriais foram sempre observadas, como a utilização de luvas e guarda pó e, sempre que possível a cabine de segurança biológica e química foi utilizada.

Como o efluente poderia deixar resíduos nas vidrarias, todo material utilizado na pesquisa foi separado e submetido a cuidados especiais de limpeza, como esterilização em autoclave, banho ácido e lavagem.

Todos os resíduos da pesquisa (placas de Petri descartáveis e resíduos dos meios contendo o efluente) foram esterilizados, identificados, separados e encaminhados para a Essencis Soluções Ambientais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA AV

O efluente Água Vermelha de acordo com a resolução CONAMA nº 23/96 (BRASIL, 1996) é um resíduo perigoso da classe 1 e está enquadrado como um resíduo reativo, desta forma não existem parâmetros fixados para este efluente da indústria de explosivos, o mesmo tem seu lançamento proibido no meio ambiente.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados das análises físicas e químicas da AV a 0,5%.

Tabela 5. Resultados das Análises Física e Químicas da Água Vermelha (diluída a 0,5% v/v)

Parâmetros	Resultados
Sólidos totais (mg/L)	712 ± 25
Sólidos suspensos totais (mg/L)	9 ± 0,50
Sólidos dissolvidos totais (mg/L)	665 ± 50
Sólidos Dissolvidos Fixos (mg/L)	170 ± 25
Sólidos Dissolvidos Voláteis (mg/L)	502 ± 50
Sulfato (mg/L)	169 ± 25
Nitrato (mg/L)	41 ± 5
Nitrito (mg/L)	2,6 ± 1
Nitrogênio orgânico (mg/L)	35 ± 5
DQO	246 ± 25 mg/L O ₂
DBO ₅	136 ± 20 mg/L O ₂
pH	6,8 ± 0,1
Fenóis totais	4 mg/L

Fonte: própria.

De uma maneira geral observou-se que a AV apresenta uma quantidade significativa de sólidos totais (712 ± 25 g/L) com uma contribuição em termos de sólidos dissolvidos da ordem de 93% sendo estes constituídos de matéria orgânica (75%) e a fração inorgânica (26%) relacionada a sais dissolvidos dos ácidos

utilizados e também a adição do sulfito de sódio na etapa de purificação e lavagem do TNT.

Como este efluente não apresenta na legislação os parâmetros mínimos de lançamento e proíbe o mesmo, os elevados níveis dos compostos presentes no mesmo justificam a condução de operações unitárias para tratamento e/ou recuperação do efluente em estudo.

Na Figura 10 esta a caracterização realizada por CLAE da AV bruta, mostrando os dois compostos presentes em maior concentração, o 2,6-dinitrotolueno e o 2,4-dinitrotolueno, compostos que serão monitorados no efluente tratado com o fungo.

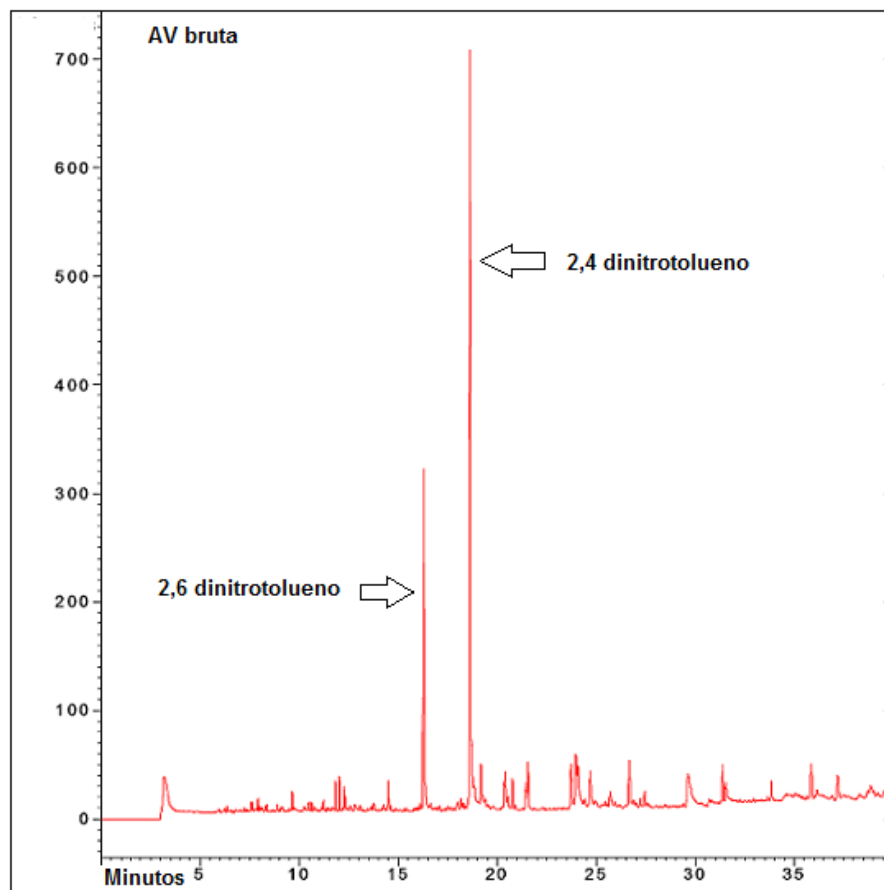


Figura 10 - Cromatograma obtido para amostra de Água Vermelha bruta.

A forte coloração observada no efluente pode ser explicada a partir de duas hipóteses principais (HELFERICH, 2012):

- Presença de azo compostos derivados de possíveis acoplamentos entre moléculas com funções amino reduzidas pela reação com sulfito de sódio em etapas mais avançadas no processo de purificação. Estes acoplamentos ocorreriam em função da formação de íons arenodiazônios que são eletrólitos fracos e reagem com compostos aromáticos mais reativos, como fenóis, para produzir compostos do tipo azo;

- Presença de espécies benzenóides mono, di ou polinitroaromáticas não acopladas e residuais oriundas dos precursores sintéticos do 2,4,6-trinitotolueno.

Adicionalmente, o efluente também apresentou uma taxa de DQO (matéria orgânica) que correspondente a aproximadamente o dobro da DBO (razão DBO/DQO = 0,552), o que sugere que o mesmo não é facilmente biodegradável (SCALIZE et al., 2004).

5.2 ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO DA AV

Vários organismos-teste já foram utilizados para ensaios ecotoxicológicos de efluente da indústria de explosivos, como *Artemia salina* (PINTO; PAIVA, 2007), o peixe *Danio rerio* (MARQUES; PAIVA, 2008), o microcrustáceo *Ceriodaphnia silvetrii* (MELO et al., 2010), a bactéria *Escherichia coli* e a alga *Selenastrum capricornutum* (RODRIGUES et al., 2007).

O microcrustáceo *D. magna* foi observado em 24 e 48 horas, onde observou-se a imobilidade do organismo-teste no efluente AV nas concentrações mostradas na Figura 11.

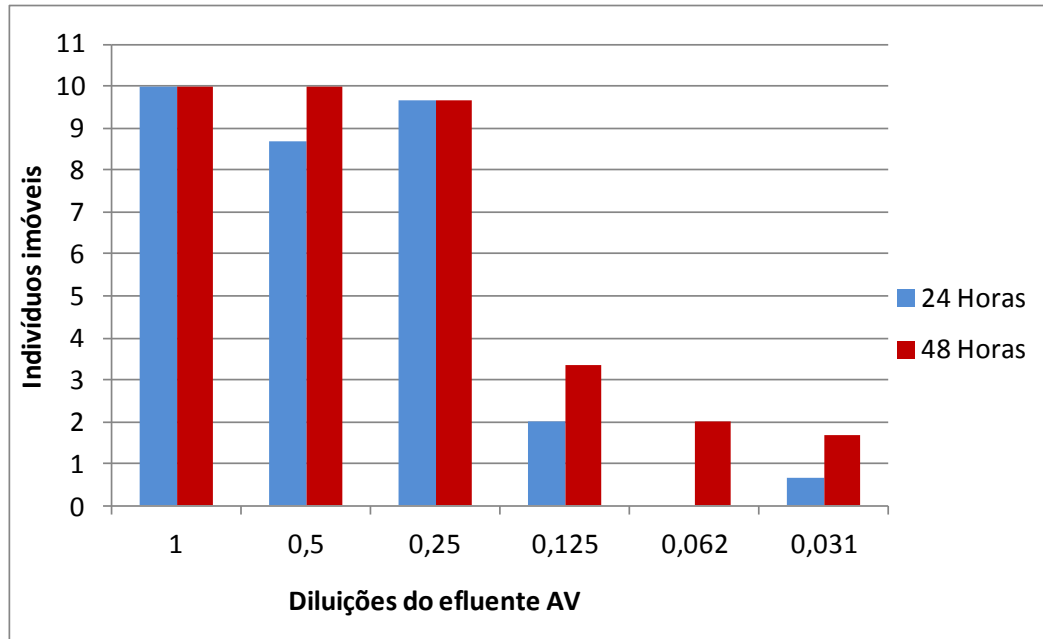


Figura 11 – Representação gráfica do estudo com *D. magna* mostrando a imobilidade observada em diferentes diluições obtidas a partir de Água Vermelha a 1%, em 24 e 48 horas.

A taxa de inibição observada de *D. magna* foi maior em 48 horas, não sendo observado o FT para *D. magna* nesse tempo. O FT_D em 24 horas foi 16, na diluição 0,062, indicando que a toxicidade do efluente AV é alta.

Comparativamente, a menor concentração do efluente utilizada neste trabalho (0,5%) também demonstrou-se tóxica, devido o FT_D corresponder a 4 (Figura 12).

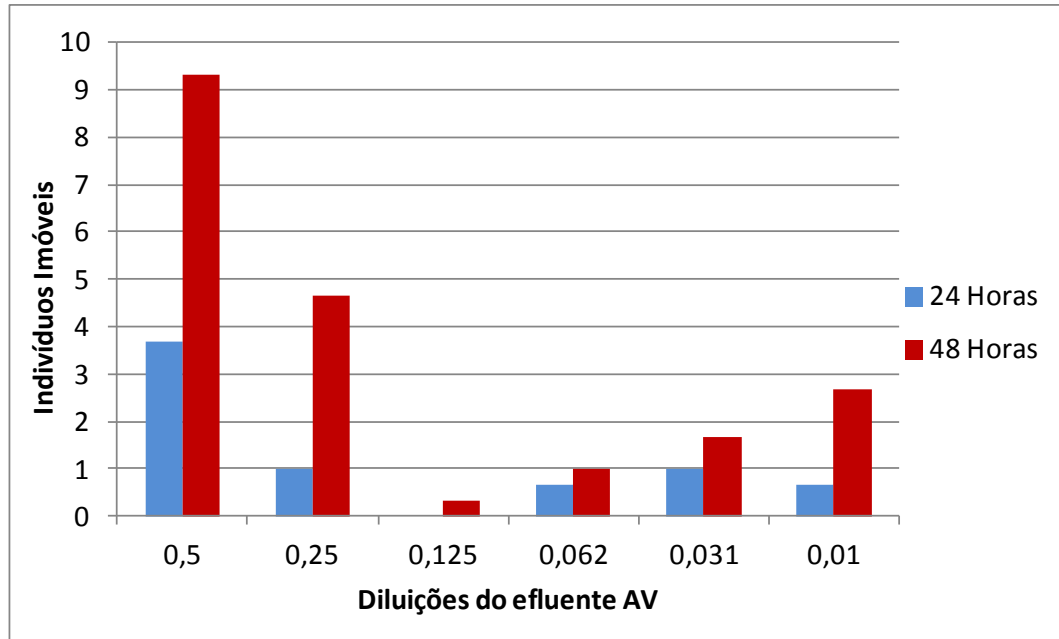


Figura 12 – Representação gráfica do estudo com *D. magna* mostrando imobilidade em diferentes diluições de Água Vermelha a 0,5%, em 24 e 48 horas.

Somente foi possível observar o FT que não causou a imobilidade de menos de 10% dos organismos no teste em 24 horas (Figura 13), isso deve-se à alta toxicidade do efluente AV, tanto na concentração de 1% como de 0,5%.

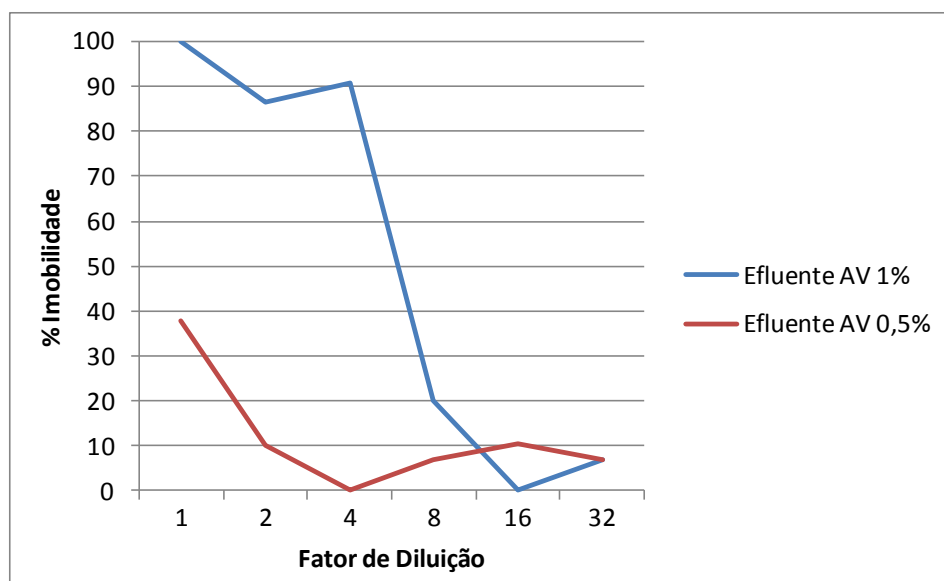


Figura 13 - Representação gráfica FT_D em função das concentrações da Água Vermelha (1% e 0,5%) no teste de toxicidade aguda com *D. magna* em 24 horas.

O efluente AV na concentração 0,5% apresentou-se menos tóxico (Figura 14) em comparação com o efluente AV à 1%, visto que o FT da AV a 0,5% foi 4 e o FT da AV a 1% não foi obtido.

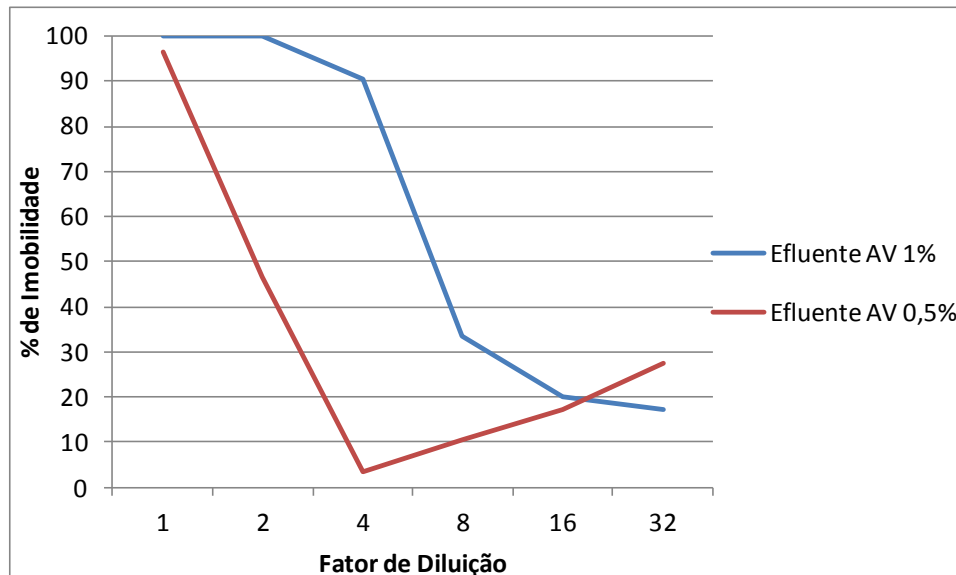


Figura 14 - Representação gráfica FT_D em função das concentrações da Água Vermelha (1% e 0,5%) no teste de toxicidade aguda com *D. magna* em 48 horas.

O FT encontrado foi 4, que significa que o efluente foi diluído com 3 partes de água de diluição e 1 parte de efluente, e que esta diluição não apresenta mais toxicidade aguda ao organismo-teste (PAWLOWSKY et al., 1997).

Com esses resultados fica claro a preocupação que deve-se ter com este efluente oriundo da indústria de explosivos, visto que este teste foi realizado em uma concentração de 0,5% e 1% do efluente, ou seja, a toxicidade dele nestas condições é alta, porém o efluente bruto, certamente é mais tóxico. O que justifica então, o estudo de alternativas para o seu tratamento.

5.3 PRIMEIRO EXPERIMENTO: EFEITOS QUE INFLUENCIAM NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para o delineamento experimental, tendo sido obtidas velocidades de crescimento radial que variaram entre 0,32 a 4,61 mm/dia.

Tabela 6 – Resultados obtidos para o delineamento experimental

Níveis/ ensaios	Fungo	pH	Glicose	% Efluente	Velocidade de Crescimento Radial (mm/dia)			Média	Desvio Padrão
					Vel. 1	Vel. 2	Vel. 3		
1	-	-	-	-	3,48	2,96	2,93	3,123	0,309
2	+	-	-	-	2,957	2,91	2,94	2,936	0,023
3	-	+	-	-	3,39	3,09	2,92	3,133	0,237
4	+	+	-	-	3,420	4,61	3,19	3,740	0,762
5	-	-	+	-	2,24	1,88	1,89	2,003	0,205
6	+	-	+	-	2,36	2,24	1,96	2,187	0,205
7	-	+	+	-	1,89	2,45	2,12	2,153	0,281
8	+	+	+	-	2,47	3,37	3,19	3,010	0,476
9	-	-	-	+	0,60	0,86	0,49	0,650	0,19
10	+	-	-	+	0,78	0,44	0,40	0,540	0,208
11	-	+	-	+	1,34	1,21	1,00	1,183	0,171
12	+	+	-	+	0,87	0,96	1,16	0,997	0,148
13	-	-	+	+	0,74	0,71	0,64	0,6967	0,051
14	+	-	+	+	0,63	0,57	0,32	0,507	0,164
15	-	+	+	+	0,89	0,79	0,74	0,807	0,076
16	+	+	+	+	1,04	1,00	1,60	1,213	0,335

Fonte: própria.

Para a análise estatística destes dados foi utilizado o software *Statgraphics Plus versão 5.1*, onde foram calculados os efeitos principais, de interação e o erro padrão de efeito conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Efeitos principais de interação e de erro padrão de efeito calculados em função da velocidade média de crescimento de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus floridae* em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.

Fator experimental	Efeito calculado	Erro padrão de efeito
A: fungo	0,172	+/- 0,085
B: pH	-0,449	+/- 0,085
C: Glicose	-0,465	+/- 0,085
D: [Efluente]	-1,961	+/- 0,085
AB	-0,248	+/- 0,085
AC	0,141	+/- 0,085
AD	-0,192	+/- 0,085
BC	0,001	+/- 0,085
BD	-0,002	+/- 0,085
CD	0,429	+/- 0,085

Fonte: própria.

Para a interpretação da Tabela 7 foram considerados estatisticamente significativos os efeitos cujos valores absolutos foram superiores ao erro padrão associado ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) com trinta e dois graus de liberdade. Para auxiliar nesta interpretação foi construído o gráfico de Pareto ilustrado na Figura 15.

Neste gráfico todos os efeitos que ultrapassaram a linha vertical azul foram considerados significativos.

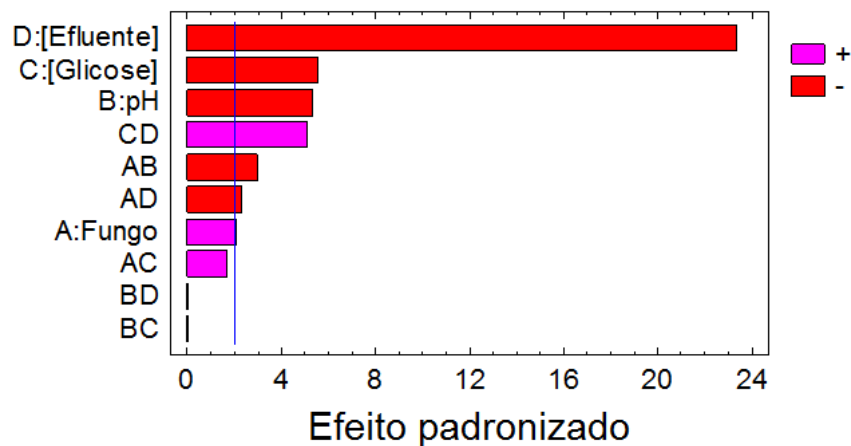


Figura 15 – Representação do gráfico de Pareto para avaliação comparativa dos efeitos principais e de interação sobre a velocidade de crescimento de fungos do gênero *Pleurotus* em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.

A variável que mais afetou o crescimento radial foi a concentração de efluente, tendo esta promovido um decréscimo de aproximadamente 1,943 mm/dia quando a concentração foi elevada de 0,5 para 1% (AV). A concentração de glicose mostrou-se significativa, sugerindo que, nas condições do ensaio, o fungo obteve um crescimento radial maior na concentração de glicose de 10 g/L. A variável do fungo teve baixa significância estatística. O pH também foi importante estatisticamente para o crescimento fúngico.

Embora o efeito principal para a variável fungo não tenha se apresentado altamente significativa, esta é analisada juntamente com a variável pH através da Figura 16.

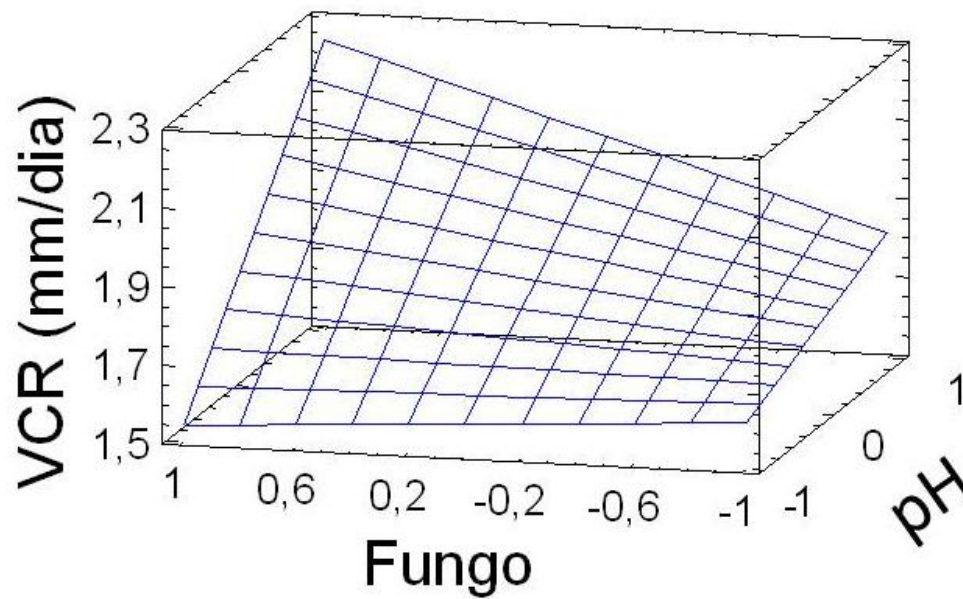


Figura 16 - Interpretação geométrica relativa aos fatores experimentais significativos sobre o crescimento radial de fungos do gênero *Pleurotus* em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.

A variável pH influenciou na velocidade de crescimento radial dos dois fungos, visto que os mesmos apresentaram uma tendência de melhor crescimento em pH 6, mas *P. floridae* obteve um crescimento neste pH maior em comparação com *P. ostreatus*.

Embora a Figura 17 indique que a velocidade de crescimento radial (VCR) aumenta com a diluição do efluente e com qualquer espécie de fungo, há uma elevação desta de 0,17 mm/dia quando foi utilizada a espécie *P. floridae*.

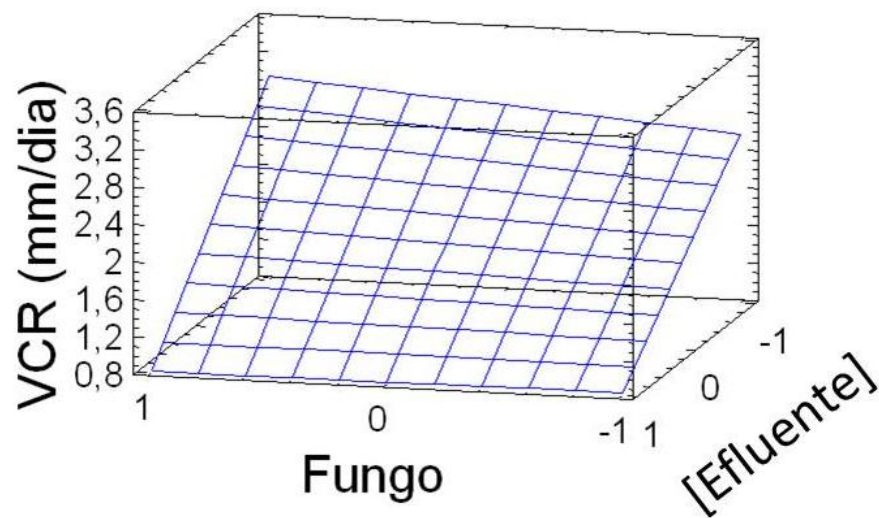


Figura 17 - Interpretação geométrica relativa aos fatores experimentais significativos sobre o crescimento radial de fungos do gênero *Pleurotus* em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.

Com base na tabela de efeitos, gráfico de Pareto e interpretação das Figuras 17, 18 e 19 pode-se concluir que as condições que mais contribuíram para o crescimento fúngico no meio composto à base do efluente AV foram: a concentração inferior de efluente (0,5% de AV); o nível superior de pH (6,0); 10 g/L de glicose e *P. floridae*. Nesta condição a velocidade de crescimento micelial observada foi de $3,74 \pm 0,762$ mm/dia (Tabela 6).

Marino et al. (2008) estudaram o *P. ostreatus* na degradação de serragem da casca de coco, que apresenta taninos que reduzem o crescimento fúngico, verificando o crescimento micelial de 6,6 mm/dia. Este resultado é similar àquele de Pedra e Marino (2006) que cultivaram os isolados de *P. ostreatus* para testar a degradação do mesmo substrato, mas suplementado com farelo de trigo e arroz, onde o fungo foi capaz de degrada-lo eficientemente.

Para a degradação de corante azul de metileno estudados por Babá et al. (2009), observou-se que o fungo *Pleurotus floridae* teve um crescimento micelial maior em relação ao *P. ostreatus*.

Além do delineamento experimental da seção anterior que utilizou como base a velocidade de crescimento radial média em 7 dias de experimento, considerou-se pertinente uma avaliação pontual comparativa das condições

ensaiadas ao longo dos dias de estudo. A Figura 18 ilustra este perfil de resultados para o fungo *Pleurotus floridae*.

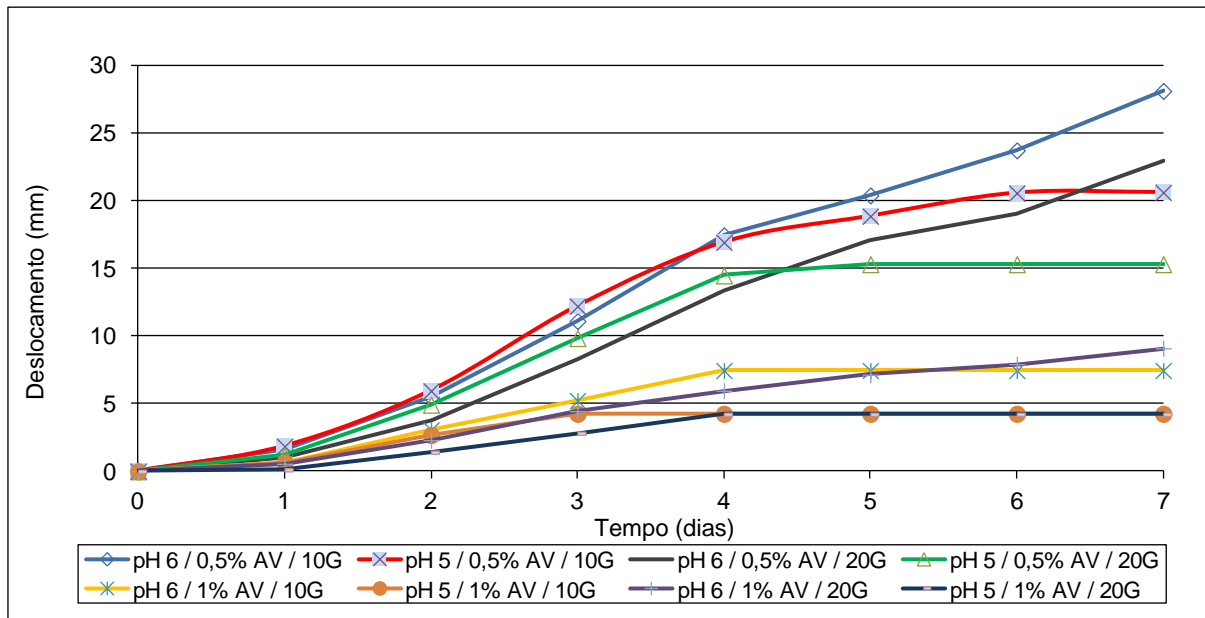


Figura 18 – Representação gráfica do crescimento micelial do fungo *Pleurotus floridae*. AV: Água Vermelha; 10G: 10 g/L de Glicose; 20G: 20 g/L de Glicose.

Os gráficos das Figuras 18 e 19 reforçam o comportamento observado no delineamento experimental, pois o crescimento dos fungos do gênero *Pleurotus* foram melhores na condição de pH 6, 10 g/L de glicose e na concentração de 0,5% do efluente AV.

Rodrigues (2006) estudou o fungo *Aspergillus niger* em reator biológico para o tratamento de água residuária sintética contendo fenol, com diferentes concentrações de glicose, observou que o uso da glicose favoreceu a obtenção de maiores reduções da concentração de fenol e de matéria orgânica.

A concentração do efluente a 0,5% não afetou significativamente o crescimento do *P. floridae*, à medida que na maior concentração (1%) a inibição é mais visível no crescimento do mesmo, como também foi observado no delineamento experimental.

Os dois fungos apresentaram o mesmo padrão de comportamento em relação às concentrações do efluente. O crescimento radial de *P. ostreatus* foi parecido com *P. floridae*, crescendo mais na menor concentração (Figura 19).

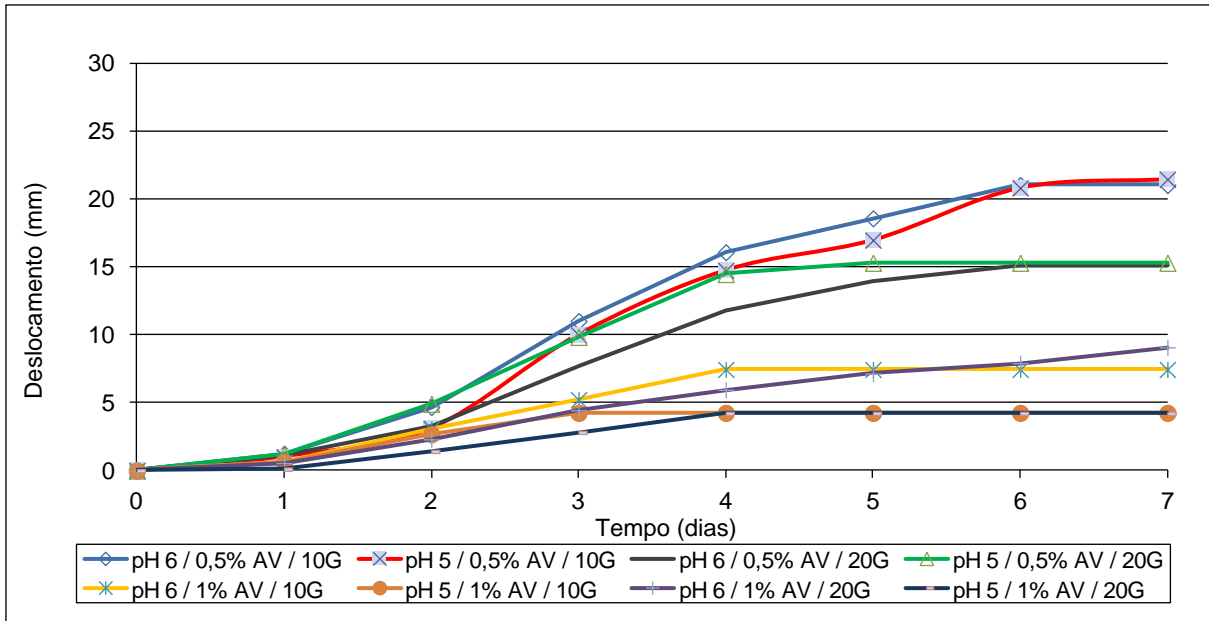


Figura 19 – Representação gráfica do crescimento micelial do fungo *Pleurotus ostreatus*. AV: Água Vermelha; 10G: 10 g/L de Glicose; 20G: 20 g/L de Glicose.

Para o *P. ostreatus* as melhores condições foram em pH 5 e 6, na concentração de 0,5% e 10 g/L de glicose. Desta forma este fungo cresceu bem na mesma condição que *P. floridae*, mas o pH 5 desta condição permitiu crescimento parecido.

Quanto ao aspecto de determinação do pH ótimo do meio de cultura, Soares et al. (2010) apresentaram também o melhor resultado com pH 6 para o fungo *Aspergillus nidulans* utilizando dois meios distintos de cultura, BDA e Meio Completo a 2% amido, variando os tratamentos com adição ou não de glicose.

Na Figura 20 observa-se o crescimento comparativo de *P. floridae* e *P. ostreatus*.

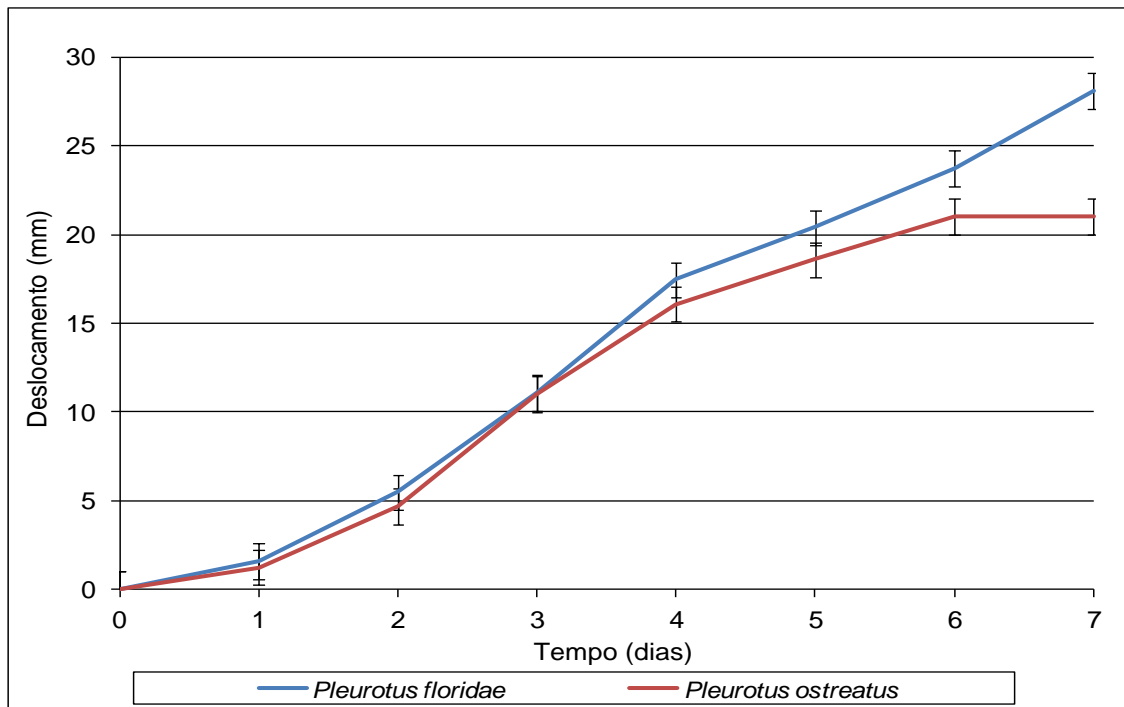


Figura 20 – Representação gráfica da comparação entre o crescimento micelial dos fungos *P. ostreatus* e *P. floridae* com os desvio padrões no meio de cultivo contendo efluente Água Vermelha a 0,5%; 10 g/L de glicose e pH 6.

Observando o crescimento dos dois fungos podemos relatar que o padrão de crescimento é muito parecido, visto que analisando o gráfico com o desvio padrão pode-se notar que o fungo *P. floridae* cresceu ligeiramente mais que *P. ostreatus*, confirmando os resultados estatísticos.

No meio com 20 g/L de glicose, o crescimento foi menor, sugerindo que o estudo pode ser mantido com a menor concentração da glicose. O mesmo foi observado pelos autores Peña-Miranda et al. (1996) que, avaliaram concentrações de glicose entre 1 a 20 g/L na remoção da cor de água residuária contendo melaço e observaram maior remoção da cor por *Aspergillus niger* com 10 g/L de glicose.

Os fungos crescem mais ou melhor quando supridos de nutrientes (GERN, 2005; WISBECK, 2003), como a glicose, mas outras fontes podem suprir essa necessidade, como nitrogênio por exemplo.

A capacidade dos fungos em adaptar rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para a sua sobrevivência e auxilia os processos de biodegradação por diferentes substratos (PEREIRA, 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os fungos *P. floridae* e *P. ostreatus* conseguiram crescer na presença do efluente AV. Barnabé (2003) também verificou o crescimento e resistência de *P. ostreatus* em herbicidas, que também inibem o crescimento fúngico.

O crescimento micelial foi pouco afetado pelo efluente AV nas concentrações mais baixas (0,5%), no entanto, o crescimento foi inibido na concentração de 1% de AV em média no quarto dia do estudo. Supõe-se que isso ocorreu devido a toxicidade do efluente sobre o crescimento dos fungos, como deixa claro o gráfico de Pareto.

Algumas substâncias são essenciais para o metabolismo de vários seres vivos, incluindo os fungos, no entanto, são tóxicos quando presentes em excesso (BALDRIAN, 2003). Assim, houve um crescimento na maior concentração de AV, mas este ao longo do tempo foi diminuindo.

Essa toxicidade foi comprovada com o teste com *D. magna*, pois quanto mais efluente, ou menor a diluição, maior o efeito tóxico apresentado.

A comparação entre o crescimento em Ágar e com o meio de cultivo do delineamento sólido evidencia que os fungos conseguiram crescer, mas foram afetados pela toxicidade do efluente AV, conforme análise da Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação entre crescimento em Ágar e na melhor condição de crescimento para *Pleurotus floridae* e *Pleurotus ostreatus*.

Organismos	Ágar Agar		Efluente 0,5%, pH 6, 10 g/L de Glicose	
	Vel. cresc. (mm/dia)	Desvio Padrão	Vel. cresc. (mm/dia)	Desvio Padrão
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,875	0,303	3,133	0,237
<i>Pleurotus floridae</i>	4,976	0,386	3,740	0,762

Fonte: própria.

Os fungos cresceram de maneira parecida nos dois meios de cultivo. Quanto a tolerância ou degradação do contaminante presente no efluente, esta será esclarecida no estudo em frascos agitados.

O Ágar ágar também é conhecido como Ágar ou agarose, é extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas, e possui em sua composição, principalmente, fibras e também sais minerais (P, Fe, K, Cl, I), celulose,

anidrogactose e uma pequena quantidade de proteínas, podendo assim servir como uma fonte de nutrientes para os micro-organismos.

A glicose é um composto de fácil assimilação pelos fungos (GRIFFIN, 1994), por isso foi adicionada no estudo para auxiliar na adaptação inicial do fungo no meio contendo e efluente, porém outros fungos como a *Phanerochaeta*, somente utilizam a glicose como fonte de carbono, se esta for adicionada ao meio, e não degradam os compostos de interesse.

5.4 PRIMEIRO EXPERIMENTO: EFEITOS QUE INFLUENCIAM NA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE AV EM MEIO LÍQUIDO

Concentrações muito elevadas de células no inóculo resultam em crescimento na forma filamentosa, o que conduziria à diminuição da eficiência do tratamento, enquanto que em concentrações de 10^4 esporos/mL de inóculo, os fungos tenderiam a formar *pellets*, estrutura que permitiria uma maior produção de enzimas, o que poderia favorecer a obtenção de maior eficiência do processo (RODRIGUES et al., 2010).

De acordo com Covizzi et al. (2007) os fungos podem ser encontrados na forma de esporos ou de filamentos, e, quando submetidos a certas condições de crescimento, tendem a formar aglomerados de micélios, que tem formato esférico, os quais são denominados *pellets*. As condições de cultivo interferem nas características físicas, químicas e morfológicas das hifas e na tendência destas em formar agregados celulares ou não.

Segundo Celestino et al. (2009), que estudaram a remoção de matéria orgânica de água residuária contaminada com BTX, essa formação de *pellets* pode ter contribuído positivamente para os fungos se desenvolverem e alcançarem melhores remoções.

Ao final do cultivo em meio líquido observou-se que os fungos inoculados formaram *pellets* (Figura 21).



Figura 21 – Fotografia mostrando a formação de *pellets* durante o tratamento fúngico nos Erlenmeyers.

A descoloração dos meios foi perceptível no sétimo dia no meio 2 contendo o fungo *P. floridae* (Figura 22).

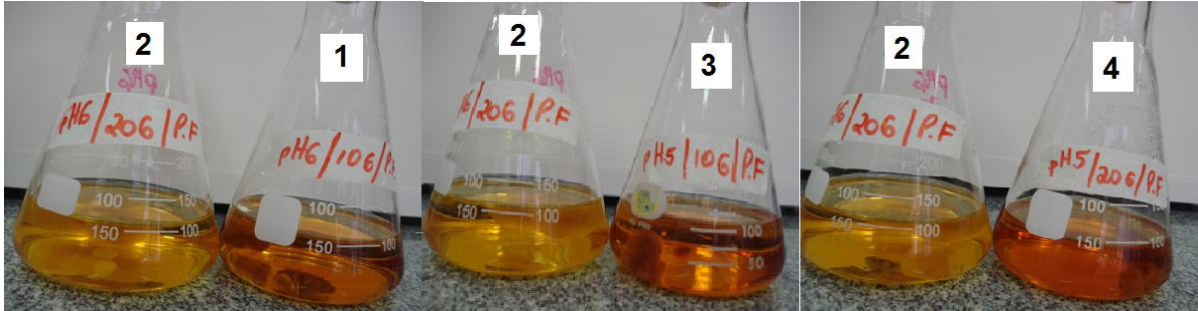


Figura 22 – Descoloração no meio 2 (pH 6, 20 g/L de glicose) com o fungo *P. floridae* e comparações com os meios 1 (pH 6, 10 g/L de glicose), 3 (pH 5, 10 g/L de glicose) e 4 (pH 5, 20 g/L de glicose).

O meio com pH 6 (meio 2) apresentou resultados similares aos obtidos no estudo em meio sólido, tendo sido observado para este maior redução de cor em relação com os demais meios, o que pode estar relacionado a possíveis mecanismos de biodegradação dos cromóforos dos compostos presentes na AV.

Concordando com os resultados, Babá et al., (2009), estudaram a degradação de corante azul de metileno em meio líquido durante 7 dias, onde o fungo *P. floridae* também teve uma descoloração maior se comparado com *P. ostreatus*.

5.4.2 Análise Estatística do Delineamento Experimental

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para o delineamento experimental, tendo sido obtidas reduções da concentração de nitroaromáticos presentes no efluente AV entre 11% e 22,1%.

Tabela 9 – Resultados do planejamento experimental 2³ com os fungos do gênero *Pleurotus*.

Níveis/ ensaios	Fungo	pH	Glicose	Resposta da Redução de TNT				Média de remoção	Desvio Padrão
				R1	R2	R3	R4		
1	-	-	-	14	14,5	15	13,6	14,275	0,607
2	+	-	-	17	16,8	18	18,1	17,475	0,670
3	-	+	-	19	18	18	18,6	18,4	0,489
4	+	+	-	21	20	21	22,1	21,025	0,857
5	-	-	+	16	15	16,5	15	15,625	0,750
6	+	-	+	21	20	20,5	22	20,875	0,853
7	-	+	+	12	11	11	12,8	11,7	0,871
8	+	+	+	19	18	18	18,7	18,425	0,505

Fonte: própria.

O ensaio 4 contendo o fungo *Pleurotus floridae*, pH 6 e 10 g/L de glicose foi o que apresentou a maior média na remoção de nitroaromáticos, sendo esta de aproximadamente 21%. O ensaio 6 também apresentou uma alta remoção (20%), e considerando o erro experimental da determinação não é possível afirmar o meio mais promissor. O ensaio 8 (meio 2 da Figura 22) obteve maior descoloração do meio, nos resultados estatísticos foi observado uma redução de 18% dos nitroaromáticos, demonstrando que a descoloração maior neste caso não está relacionada com a maior remoção dos compostos presentes na AV.

Para melhor compreensão dos efeitos das variáveis selecionadas sobre a redução da concentração dos compostos nitroaromáticos, calculou-se os efeitos constantes na Tabela 10.

Tabela 10 - Estimativa de efeitos para a redução da concentração de Nitroaromáticos

Fator experimental	Efeito calculado	Erro padrão de efeito
A:Fungo	4,45	+/- 0,253
B:pH	0,325	+/- 0,253
C:[Glicose]	-1,1375	+/- 0,253
AB	0,225	+/- 0,253
AC	1,5375	+/- 0,253
BC	-3,5125	+/- 0,253
ABC	-0,5125	+/- 0,253

Fonte: própria.

Para interpretação foram considerados estatisticamente significativos os efeitos cujos valores foram superiores ao erro padrão associado ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) com vinte e quatro graus de liberdade. Para auxiliar nesta interpretação foi construído o gráfico de Pareto ilustrado na Figura 23.

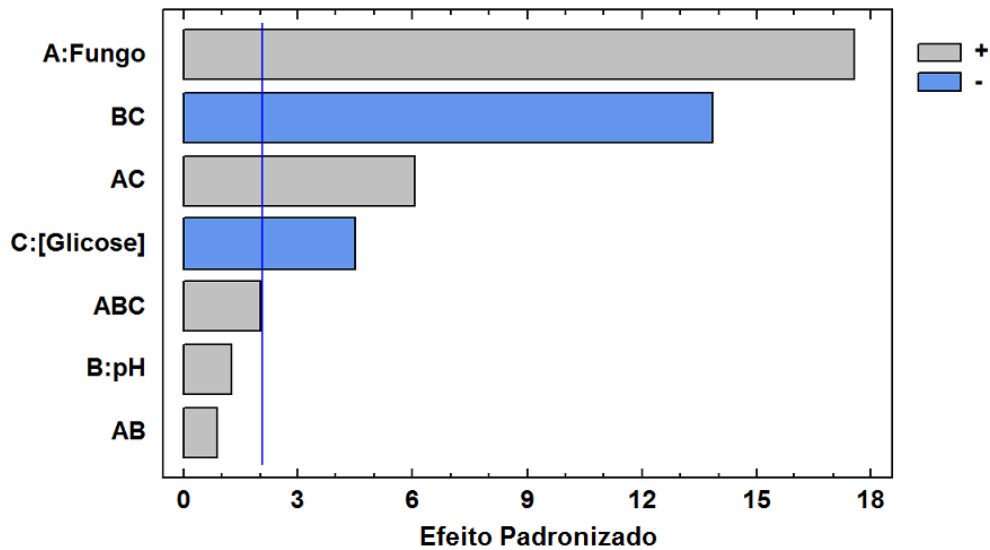


Figura 23 – Representação do gráfico de Pareto mostrando o padrão de redução da concentração de Nitroaromáticos.

Os efeitos que ultrapassaram a linha vertical azul foram considerados significativos. A glicose e a espécie de fungo foram significantes estatisticamente. O pH não foi importante estatisticamente para o estudo da redução de nitroaromáticos do efluente AV.

Nas Figuras 24 e 25, pode-se observar as melhores condições para a redução da concentração de nitroaromáticos contidos no efluente AV da indústria de explosivos.

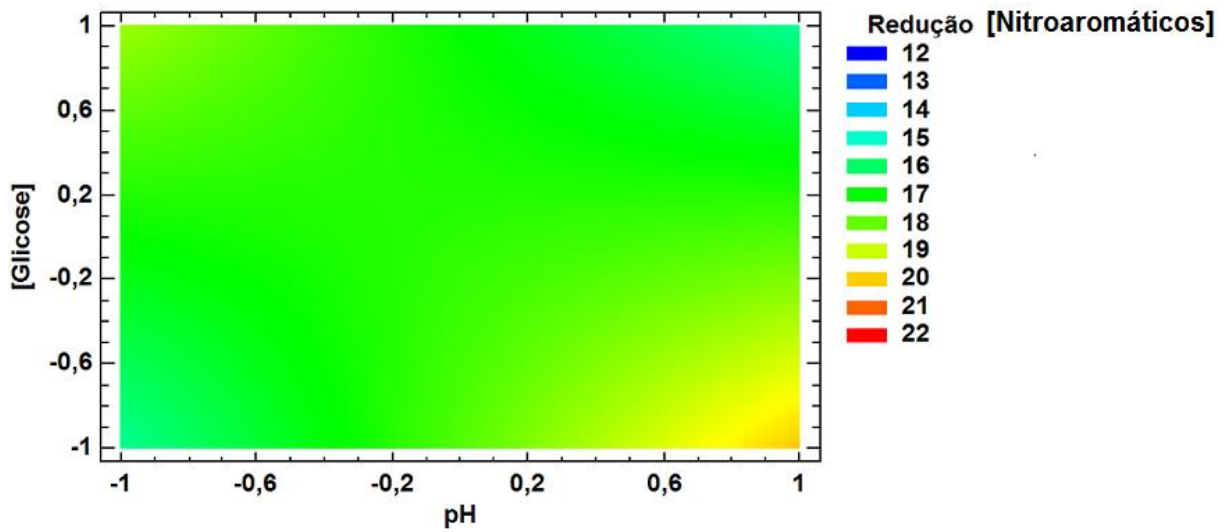


Figura 24 - Superfície de contorno da estimativa de resposta da redução de Nitroaromáticos com glicose e pH (níveis codificados).

As reduções de nitroaromáticos presentes nos meios de cultivo com os fungos variaram entre 12 e 22 %. A melhor condição entre concentração de glicose e pH, foi de 10 g/L de glicose e pH 6, porém conforme Tabela 8, o pH 5 e o nível de glicose maior também propiciaram níveis bons de redução de nitroaromáticos.

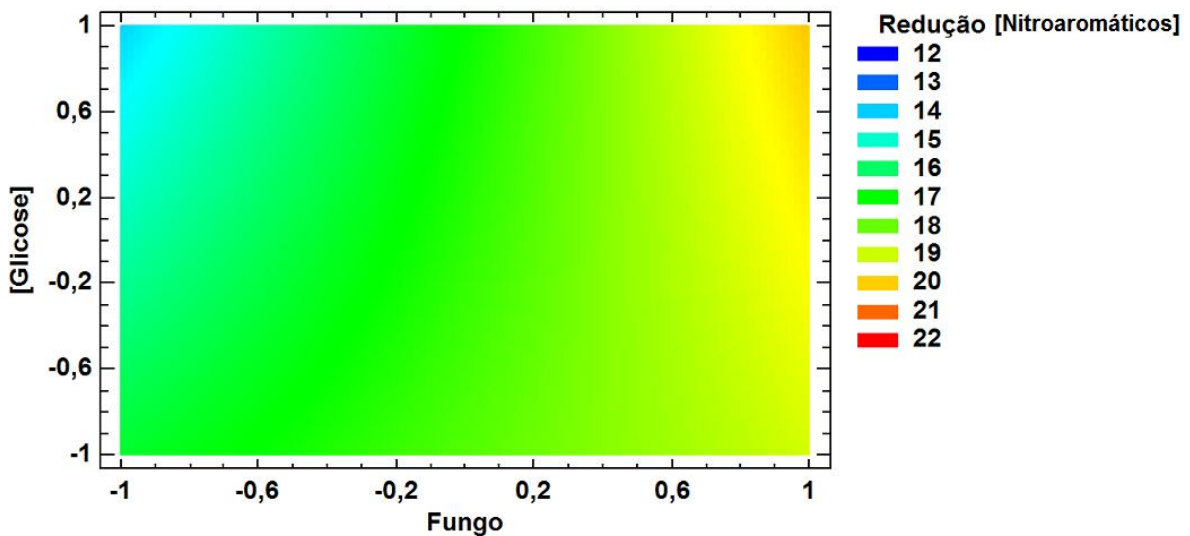


Figura 25 - Superfície de contorno da estimativa de resposta da redução de Nitroaromáticos com glicose e fungo (níveis codificados).

Diante do exposto na Figura 25, a melhor condição entre concentração de glicose e a espécie de fungo de melhor desempenho foi de 10 g/L de glicose e *P. floridae* respectivamente.

Como a interação de terceira ordem para os fatores pH, fungo e concentração de nitroaromáticos, a interpretação destas variáveis foi realizada de forma conjunta através da Figura 26.

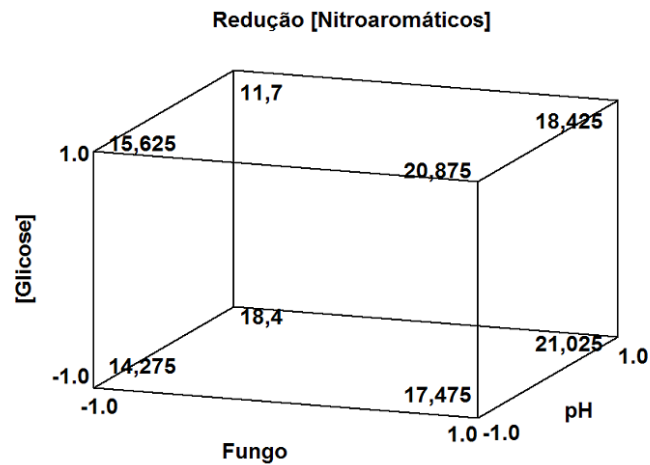


Figura 26 - Interpretação geométrica da redução da concentração de nitroaromáticos em meio composto à base do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos (níveis codificados)

Os efeitos das variações dos níveis de cada fator experimental estudado neste delineamento em meio líquido são mostradas na Figura 27.

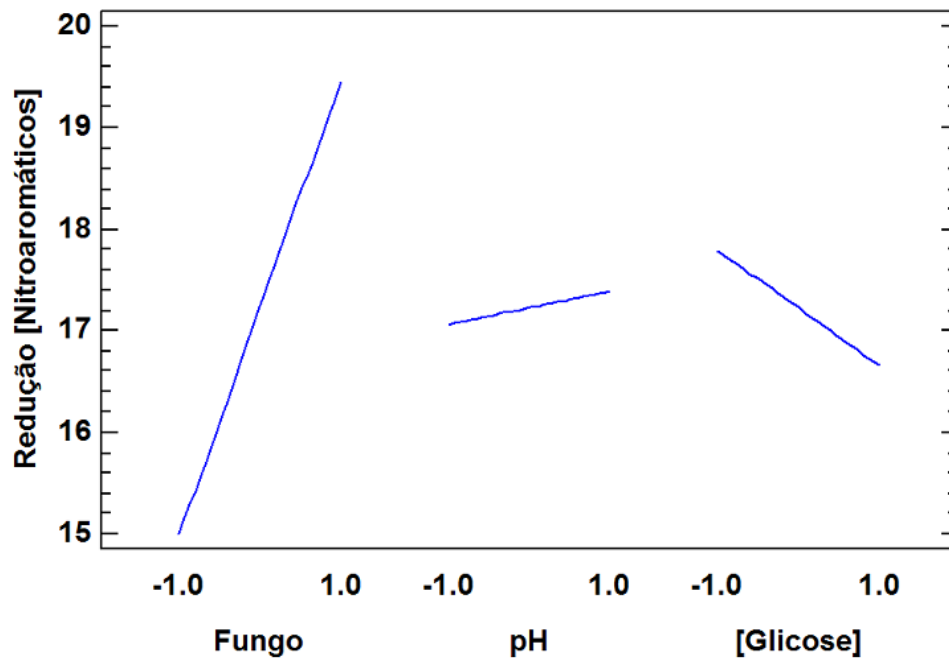


Figura 27 - Interpretação geométrica referente as principais variáveis da Redução da concentração de Nitroaromáticos.

Assim, a espécie fungo que apresentou maior eficiência de remoção de nitroaromáticos foi *P. floridae* e o nível de glicose 10 g/L foram os melhores. Já a variável pH não apresentou influência na redução da concentração de nitroaromáticos.

Na Tabela 11 estão indicados os valores de glicose após o tratamento fúngico com os dois fungos em estudo.

Tabela 11 - Resultado da determinação de Glicose (g/L) após tratamento fúngico por 7 dias.

Condições	<i>Pleurotus floridae</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
1	0,15 ± 1,04	9,64 ± 14,3
2	0 ± 0,02	0,31 ± 1,18
3	9,21 ± 13,8	9,69 ± 12,5
4	9,05 ± 13,5	9,03 ± 13,5

Condições: 1 (pH 6, 10 g/L de glicose), 2 (pH 6, 20 g/L de glicose), 3 (pH 5, 10 g/L de glicose) e 4 (pH 5, 20 g/L de glicose).

Fonte: própria.

Os resultados apontam para o maior consumo de glicose para o fungo *P. floridae* (condições 1 e 2) e *P. ostreatus* (condição 2). O maior consumo de glicose para a condição 2 confirma os dados observados na descoloração, podendo justificar e evidenciar a maior remoção de cor, em função do fungo estar utilizando o substrato do meio para o seu crescimento após utilizar toda a glicose do meio. Portanto, uma descoloração elevada do meio pode não influenciar na degradação de nitroaromáticos do meio, bem como uma maior redução de nitroaromáticos pode não descolorir o meio.

5.4.3 Atividade Enzimática

No final de sete dias foram determinados tanto para o fungo *P. floridae* como para *P. ostreatus* as três enzimas em meio líquido descritas na Figura 28.

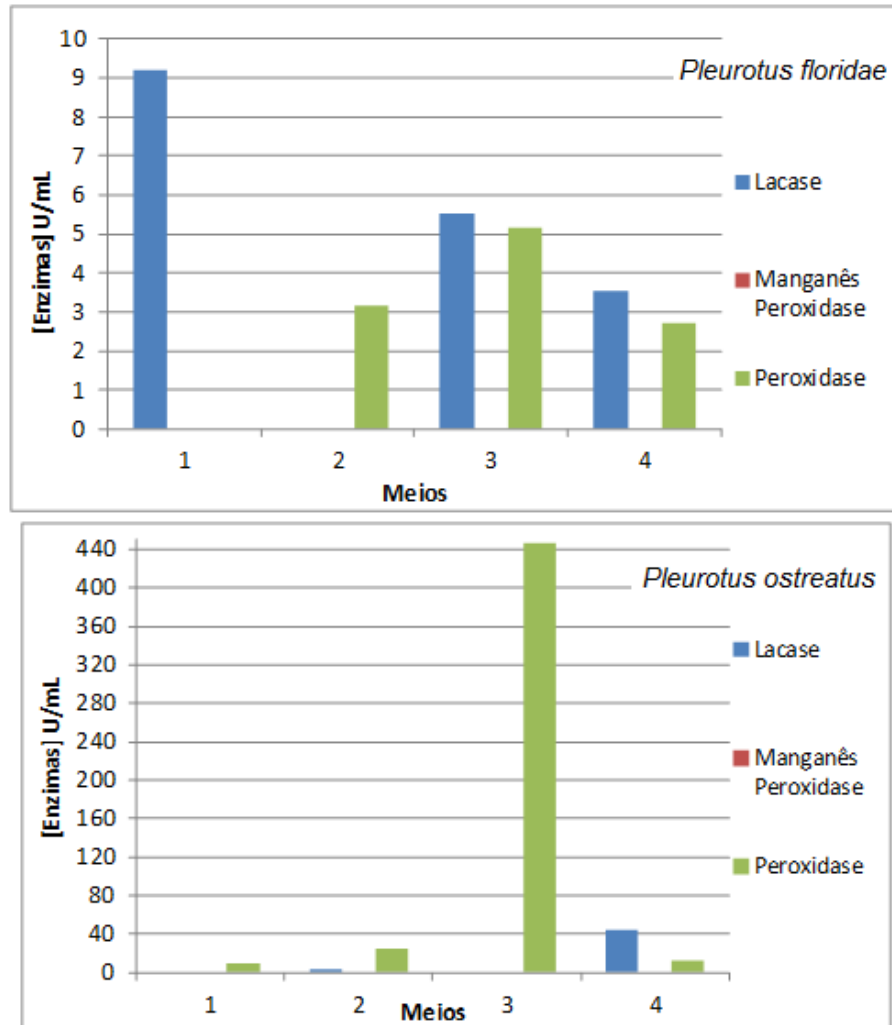


Figura 28 – Concentração enzimática média durante 7 dias de experimento para os diferentes meios com os dois fungos. 1 (pH 6, 10 g/L de glicose), 2 (pH 6, 20 g/L de glicose), 3 (pH 5, 10 g/L de glicose) e 4 (pH 5, 20 g/L de glicose).

A enzima peroxidase apresentou-se em níveis relativamente elevados nos dois fungos em alguns meios (2, 3 e 4). Especula-se que este comportamento tenha promovido a indução na degradação dos fenóis presentes em grande quantidade.

O fungo *P. floridae* produziu lacase em 3 meios, diferentemente de *P. ostreatus* que a produziu somente em dois meios. A lacase pode ter sido produzida pelo estresse causado pela presença da AV. Neste contexto, Henn (2009) observou somente lacases nos extratos das culturas, e concluiu que a enzima foi induzida na presença dos pesticidas.

Estudos realizados com *Phanerochaete chrysosporium*, que possuem o processo de descoloração iniciado por peroxidases, revelaram que o fungo foi muito

eficiente na degradação de azo-corantes (FORGIARINI, 2006). Isso pode explicar a elevada produção de peroxidase também por *Pleurotus*.

A enzima lacase foi produzida por ambos os organismos, mas o fungo *P. floridae* apresentou produção nos meios 1, 3 e 4, sendo que *P. ostreatus* somente a produziu nos meios 2 e 4.

MnP não foi detectável em nenhum dos meios durante o experimento que durou 7 dias. Em estudo realizado sobre produção de enzimas por Silva (2004) com oito fungos durante 14 dias, a mesma observou a atividade enzimática da MnP somente em três linhagens, sendo que apenas uma apresentou concentração mais alta (2,765 U/mL).

Finalmente, *P. ostreatus* produziu maiores quantidades de enzima peroxidase, e o fungo *P. floridae* produziu mais lacase.

Neste contexto, contrariando parte deste resultados, Delamatrice (2005) estudou um efluente da estação de tratamento de Americana São Paulo com *P. ostreatus* e observou a produção de uma concentração maior da enzima MnP e pouca lacase, não foi detectada a produção de LiP.

De modo similar aos resultados obtidos neste trabalho, Forgiarini e colaboradores (2006) observaram relativamente maiores atividades de lacase e MnP na degradação de corantes da indústria têxtil.

O meio tratado com *P. floridae* foi escolhido porque no meio obteve-se maior descoloração e maior porcentagem de redução de nitroaromáticos. Essa descoloração pode estar ligada a peroxidase que é conhecida por ser eficaz na quebra de compostos azo aromáticos na presença de H_2O_2 e por degradar e precipitar importantes corantes azo industriais (MOHAN et al., 2005).

5.5 SEGUNDO EXPERIMENTO: ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

A avaliação do processo de degradação foi acompanhada pelo monitoramento dos parâmetros biomassa, adsorção, glicose, concentração enzimática, cor e concentração de nitroaromáticos.

5.5.1 Biomassa

Na Figura 29 observam-se os resultados da biomassa seca de *Pleurotus floridae* durante 15 dias.

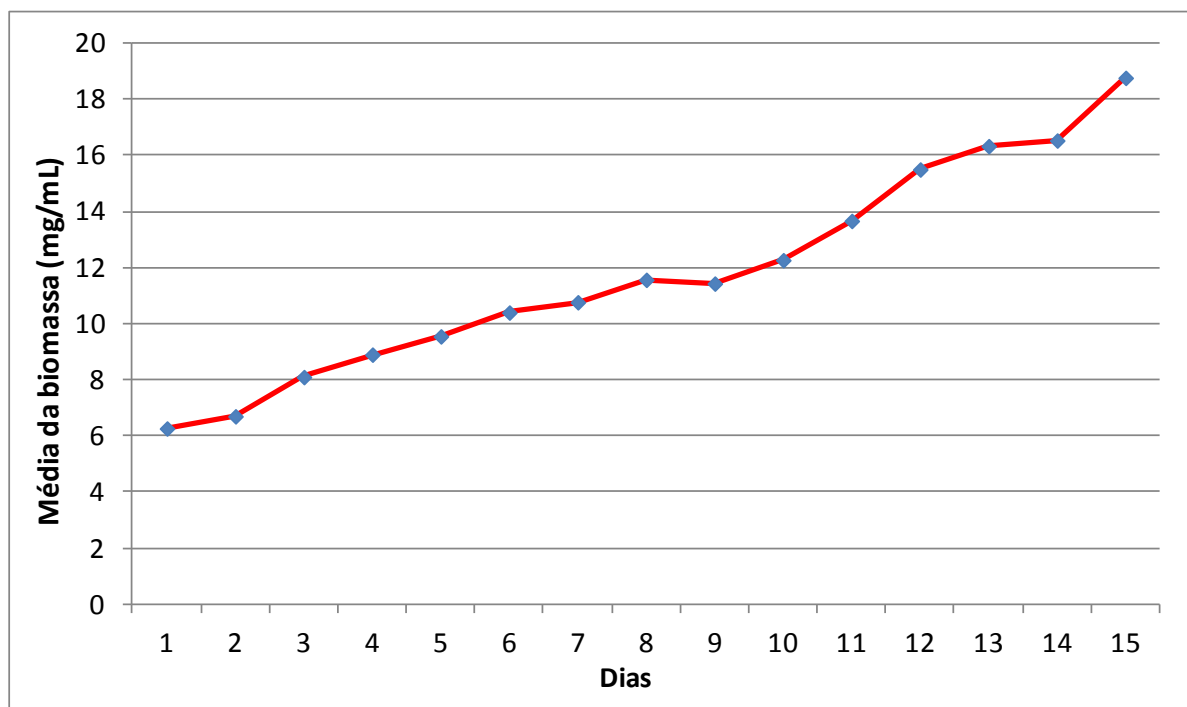


Figura 29 - Peso seco da biomassa micelial de *P. floridae* durante experimento em meio líquido.

Ao 15º dia do estudo, obteve-se crescimento da biomassa micelial de 12,5 miligramas por mL. Komura (2009) obteve em seu estudo com meio líquido

CZAPECK mantido por 10 dias uma biomassa menor de *Pleurotus* (3 miligramas por mL).

O fungo *P. floridae* cresceu de forma gradativa durante os dias de cultivo, atingindo o maior crescimento em biomassa no último dia de estudo. Maziero, Cavazzoni e Bononi (1999) selecionaram 56 espécies de basidiomicetos para a produção de biomassa, destes, 70% das espécies estudadas produziram maiores quantidades de biomassa após 14 dias de cultivo. Desta forma, o fungo em estudo comportou-se de maneira parecida ao estudo.

A maior produção de biomassa de *P. ostreatus* ocorre em nove dias de cultivo a 25 °C e após 14 dias de cultivo ocorre o início da morte celular (CAMPOS et al., 2010). Como neste trabalho não foi observado declínio no crescimento fúngico, não foi possível detectar a maior produção de biomassa.

5.5.2 Adsorção de Nitroaromáticos pelo Micélio

Para o procedimento de adsorção foram seguidos os procedimentos da seção 4.8.2 e o filtrado (Figura 30) foi posteriormente analisado através de CG/MS verificando se a diminuição da concentração de AV no meio estava realmente relacionada à degradação do composto estudado e não devido à adsorção do composto pela biomassa fúngica.

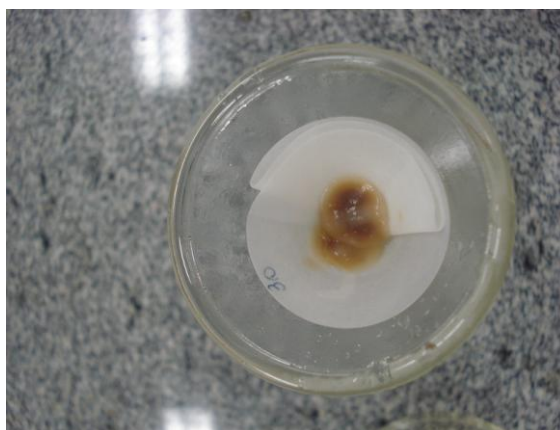


Figura 30 – Fotografia do micélio filtrado do meio de cultivo para posterior secagem e obtenção da biomassa.

Durante a realização do estudo, a adsorção dos compostos presentes no meio de cultivo contendo o efluente AV da indústria de explosivos não se apresentou significativa conforme pode ser observado nos cromatogramas da Figura 31.

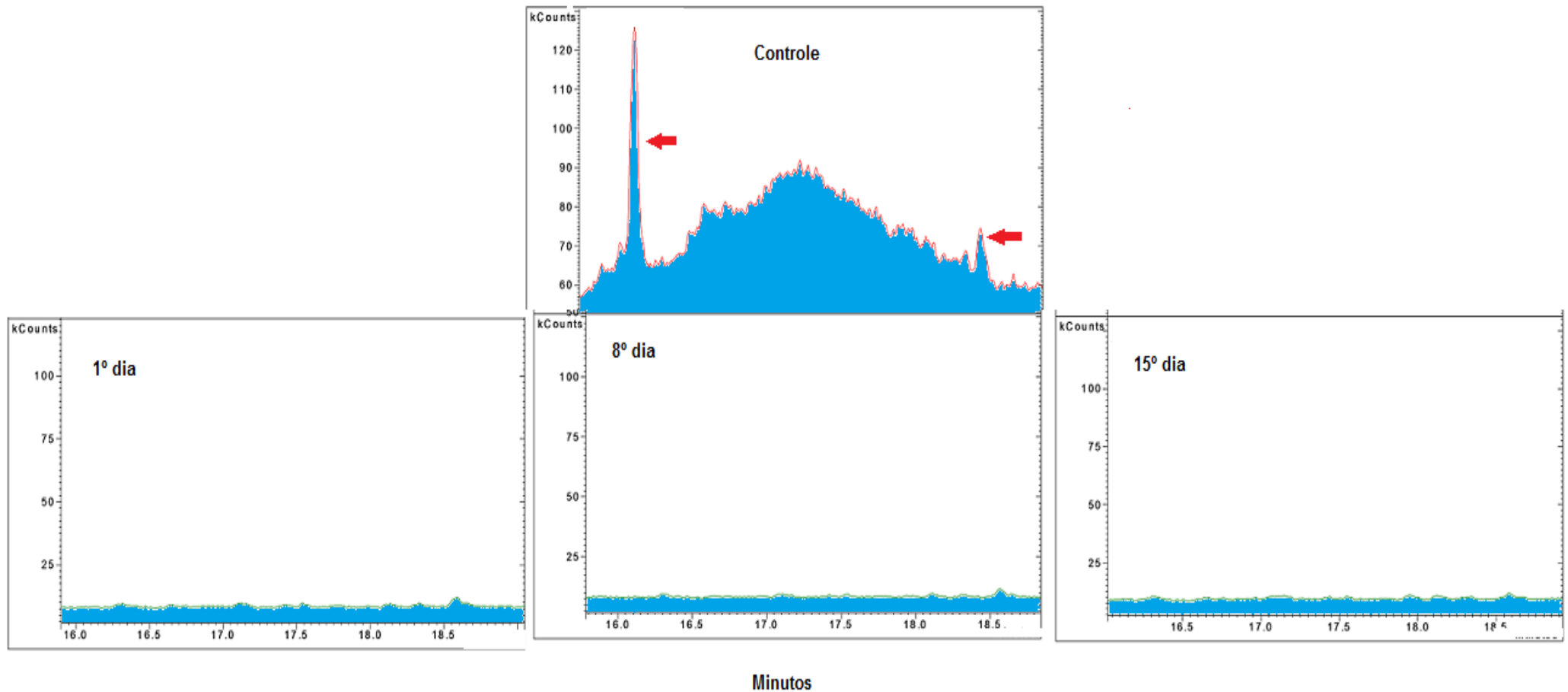


Figura 31 - Análise cromatográfica da adsorção micelial dos compostos presentes no meio de cultivo com Água Vermelha da indústria de explosivos comparando o controle com o 1º dia, 8º dia e último dia de estudo.

Concordando com os resultados deste trabalho, PERREIRA (2011), estudou a adsorção da atrazina ao micélio fúngico e o mesmo também mostrou-se insignificante, indicando a capacidade e a eficiência de *P. ostreatus* em produzir enzimas como a lacase na degradação deste herbicida e de outros como o TNT.

5.5.3 Determinação de Glicose

A determinação de glicose foi importante para evidenciar o crescimento micelial contínuo e assim, indicar que esta pode ter auxiliado o fungo a adaptar-se ao meio contendo o efluente, seguindo posteriormente a isso uma queda na concentração de glicose. Bonfanti (2006) observou o mesmo em estudo realizado com o fungo *Pleurotus sajor-caju* com o efluente da indústria de papel e celulose.

Em um estudo realizado por Forgiarini (2006), onde a concentração de corantes era de 0,5 g/L e com glicose (10 g/L), vários corantes foram testados e verificados quanto a sua descoloração, com glicose no meio seis corantes foram descoloridos, enquanto que na ausência de glicose apenas três obtiveram uma descoloração significativa. Assim, os resultados sugerem que uma fonte primária de carbono (glicose) é essencial para uma descoloração extensiva do corante (FORGIARINI, 2006).

Durante o tratamento fúngico que estendeu-se por 15 dias, observou-se que a partir do 7º dia a glicose foi sendo consumida, e no 10º dia foi totalmente consumida (Figura 32), porém não houve diminuição no crescimento em biomassa fúngica. Isto indica que após o 10º dia de estudo, o fungo utilizou os constituintes do meio para crescer, pode-se comprovar esta afirmação analisando as Figuras da seção 5.6.5, onde mostram a redução da concentração de alguns nitroaromáticos. Também se inicia a maior descoloração do meio.

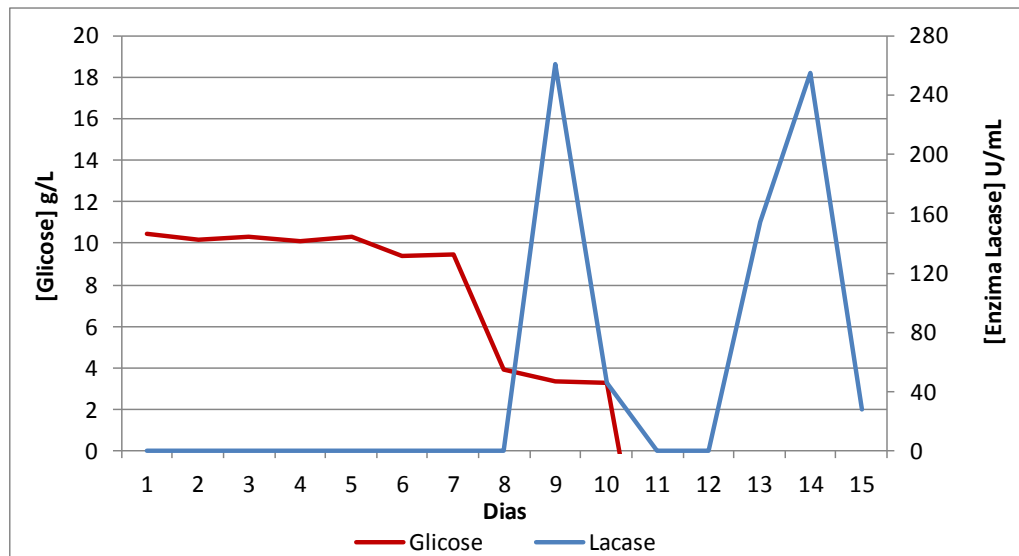


Figura 32 – Comparação entre redução diária de glicose e início da produção de lacase pelo fungo *P. floridae*.

A produção de lacase também teve relação com o consumo total de glicose, pois somente a partir do 9º dia inicia-se a produção da mesma, isso pode ser explicado pelo estresse oxidativo que o efluente causou ao fungo e na falta de glicose este estimulou a produção de lacase, porém esta pode não estar necessariamente envolvida com a degradação de substâncias do meio.

5.5.4 Atividade Enzimática

Avaliando a produção de enzimas durante os dias de experimento obteve-se o seguinte gráfico mostrado na Figura 33.

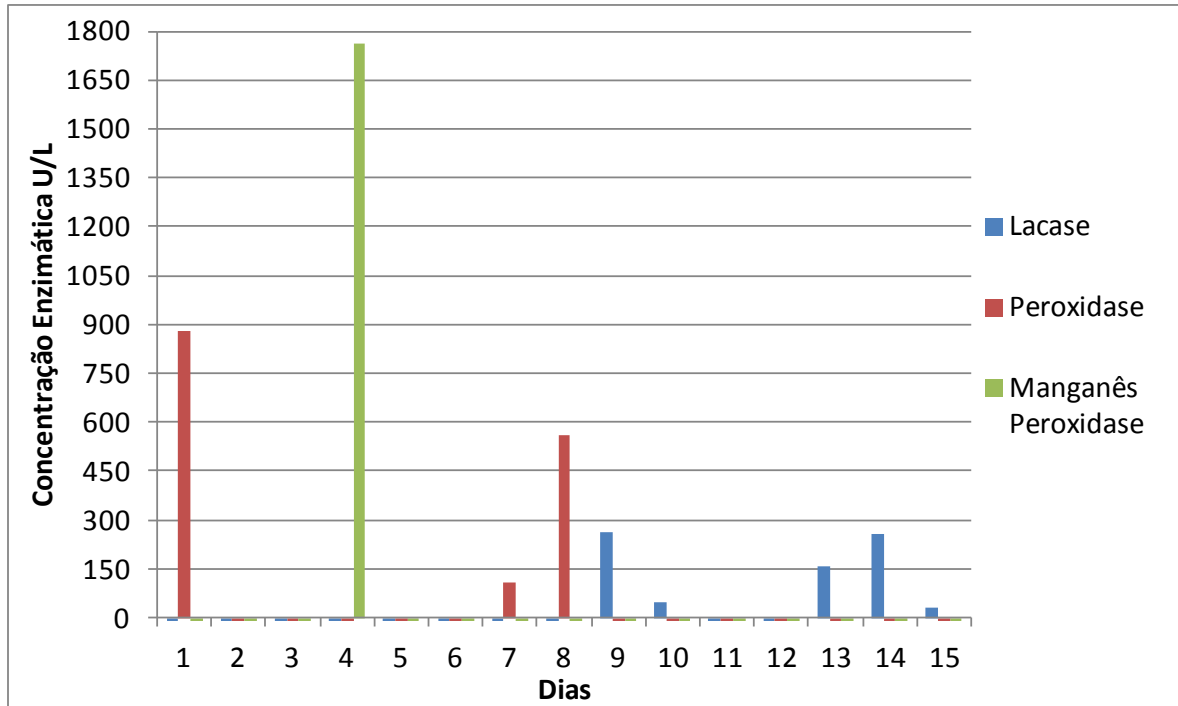


Figura 33 - Concentração de diferentes enzimas produzidas por *Pleurotus floridae* no segundo experimento em meio líquido com o efluente Água Vermelha da indústria de explosivos.

No 1º, 7º e 8º dia ocorreu a produção de Peroxidase. MnP somente foi detectável no 4º dia de estudo em grande quantidade. A partir do 9º dia ocorreu a produção de lacase (261 U/L no 9º dia e 28 U/L no 15º dia). A diferença no tempo de produção dessas enzimas pode refletir o envolvimento da peroxidase e MnP na degradação do efluente AV e a lacase sendo produzida devido as situação de estresse oxidativo.

Comparativamente com o estudo de Pereira (2011) utilizando a atrazina, com o fungo *P. ostreatus* o mesmo produziu apenas a enzima lacase, cujos valores foram para o sétimo dia (0,533 U/mL) e décimo quinto dia (0,119 U/mL) de cultivo.

Em estudo realizado por Baptista et al. (2012), com os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*, os mesmos obtiveram a produção de 0,00435 U/mL de lacase para ambos.

Pozdnyakova et al. (2006) estudaram a habilidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em estimular a produção de lacase e peroxidase produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. Esse estudo mostra a produção da enzima lacase principalmente entre o 7º e 10º dia de cultivo, enquanto que a

produção de peroxidase começou após 5 a 7 dias de cultivo, resultados parecidos com os obtidos neste trabalho.

Conforme apresentado na Figura 38, a atividade enzimática máxima de lacase ocorreu no 9º e 14º dia e a degradação máxima de nitroaromáticos no 8º dia. Pereira (2011), obteve a atividade enzimática máxima de lacase no 7º dia e a degradação máxima de atrazina ocorreu por volta do 15º dia.

Para Alexandrino et al. (2007) a produção máxima da atividade lacase foi obtida após 15 dias de cultivo, enquanto máximo de atividade MnP foi alcançado no trigésimo dia de cultivo.

Segundo Elisashvili et al. (2010) a suplementação de meio com 0,03 à 0,3 milimolar de TNT aumentou a produção de lacase de 1,267 U/mg para 3,125 à 8,630 U/mg por dia pelo fungo *Cerrena unicolor*.

A enzima peroxidase é assim chamada porque depende do peróxido de hidrogênio para se tornar ativa. Segundo Forgiarini (2006) a remoção catalítica de fenóis e outros compostos aromáticos, incluindo substâncias cromogênicas, de efluentes industriais utilizando enzima peroxidase e peróxido de hidrogênio, vem sendo foco de pesquisas extensivas.

As peroxidases na sua ação enzimática provem da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina, a enzima se combina com a molécula de H_2O_2 , formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final. Por causa da baixa especificidade do complexo enzimático peroxidase- H_2O_2 , este pode promover a oxidação de uma grande variedade de poluentes orgânicos (DELLAMATRICE, 2005).

5.5.5 Determinação de cor

A partir da inspeção visual da Figura 34, é possível observar uma significativa descoloração do efluente em estudo.

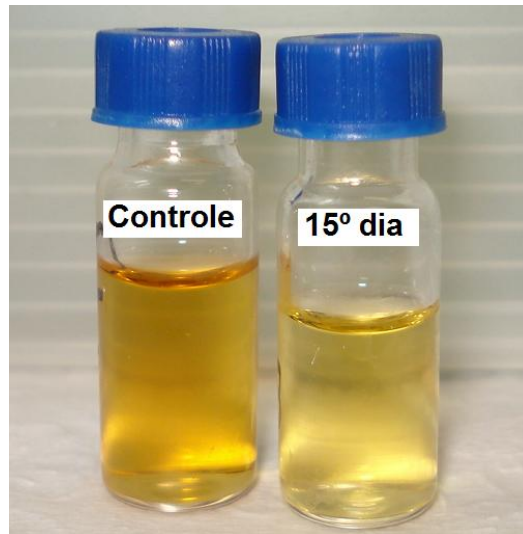


Figura 34 – Imagem comparativa do controle (sem tratamento) e após o 15º dia de tratamento fúngico com *P. floridae*.

Conforme a diminuição da cor foi observada, esta resultou na medida da absorbância mostrada na Figura 35.

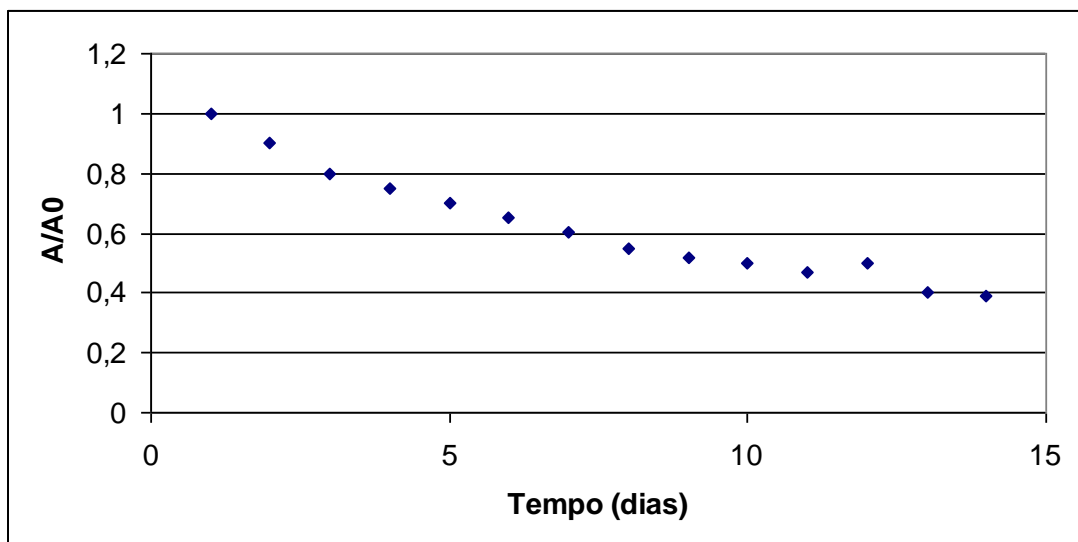


Figura 35 – Medida da Absorbância do efluente Água Vermelha da indústria de explosivos durante o tratamento fúngico ($\lambda_{\text{máx}}=290$ nm).

Pela inspeção da Figura 35 é possível verificar que a redução da cor medida em 465 nm diminuiu em aproximadamente 80% em 15 dias de tratamento do efluente AV pelo fungo *P. floridae*. Sanjust et al. (1991) em estudo de descoloração

do efluente da indústria de óleo de oliva, observaram uma redução de 40 a 60% da cor por *P. floridae*.

De acordo com Forgiarini (2006) entre as enzimas utilizadas para a descoloração está a lacase, que pode ter influenciado na diminuição de absorvância durante o processo de tratamento.

Em estudo realizado por Rodríguez et al. (1999) para observar a descoloração de corante industrial por lacases de fungos ligninolíticos, todas as cepas de *P. ostreatus* exibiram lacase alta e atividade MnP, onde a lacase foi correlacionada com a descoloração do meio.

Após a análise física e química da AV tratada, os níveis de DQO e DBO demonstraram a eficiência do tratamento fúngico, conforme Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da redução de DQO e DBO da AV tratada durante 15 dias.

	DQO	DBO
% de redução	55%	51%

Fonte: própria.

Nesse contexto, em estudo realizado por Santaella et al. (2002), em reator de fluxo descontínuo utilizando fungos para tratamento de efluentes da indústria de beneficiamento da castanha de caju, houve redução na DQO e na DBO do efluente, sendo que, em sete dias, houve redução de 76% da DQO e em 17 dias houve remoção de 95% da DBO₅.

Para fenóis totais, que estavam em torno de 4 mg/L, obteve-se uma redução para 3 mg/L em todo o tratamento, indicando que essa sua redução de 25% pode estar relacionada as enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo.

Desta forma, para degradar efluentes fenólicos, Davis e Burns (1990) mostram que em incubações prolongadas (8 dias) com o fungo *Coriolus versicolor*, foi alcançado 70% a 80% de descoloração, índice maior do que o alcançado com o melhor tratamento enzimático que foi de 48% de remoção em 72 horas por lacase imobilizada.

5.5.6 Monitoramento da degradação de 2,6 e 2,4-dinitrotolueno

Neste estudo da Água Vermelha, os nitroaromáticos identificados como 2,4 e 2,6-dinitrotolueno tiveram sua degradação monitorada via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os picos e as áreas monitoradas para os dois compostos foram chamados de 1 e 2, identificados via biblioteca NIST[®] como 2,6 e 2,4 dinitrotolueno, respectivamente:

✓ Pico 1 = tempo de retenção 16,28 (min.) (2,6 dinitrotolueno); área controle 827326.

✓ Pico 2 = tempo de retenção 18,62 (min.) (2,4 dinitrotolueno); área controle 159674.

Analisando a AV bruta com a AV á 0,5% observam-se os mesmos compostos presentes, mas na menor diluição, como era de se esperar, estes aparecem em picos menores.

A avaliação do processo de degradação dos compostos nitroaromáticos foi realizada através do monitoramento das áreas cromatográficas, estando os cromatogramas obtidos ilustrados comparativamente na Figura 36. Em geral, observa-se uma significativa redução de área para ambos os picos.

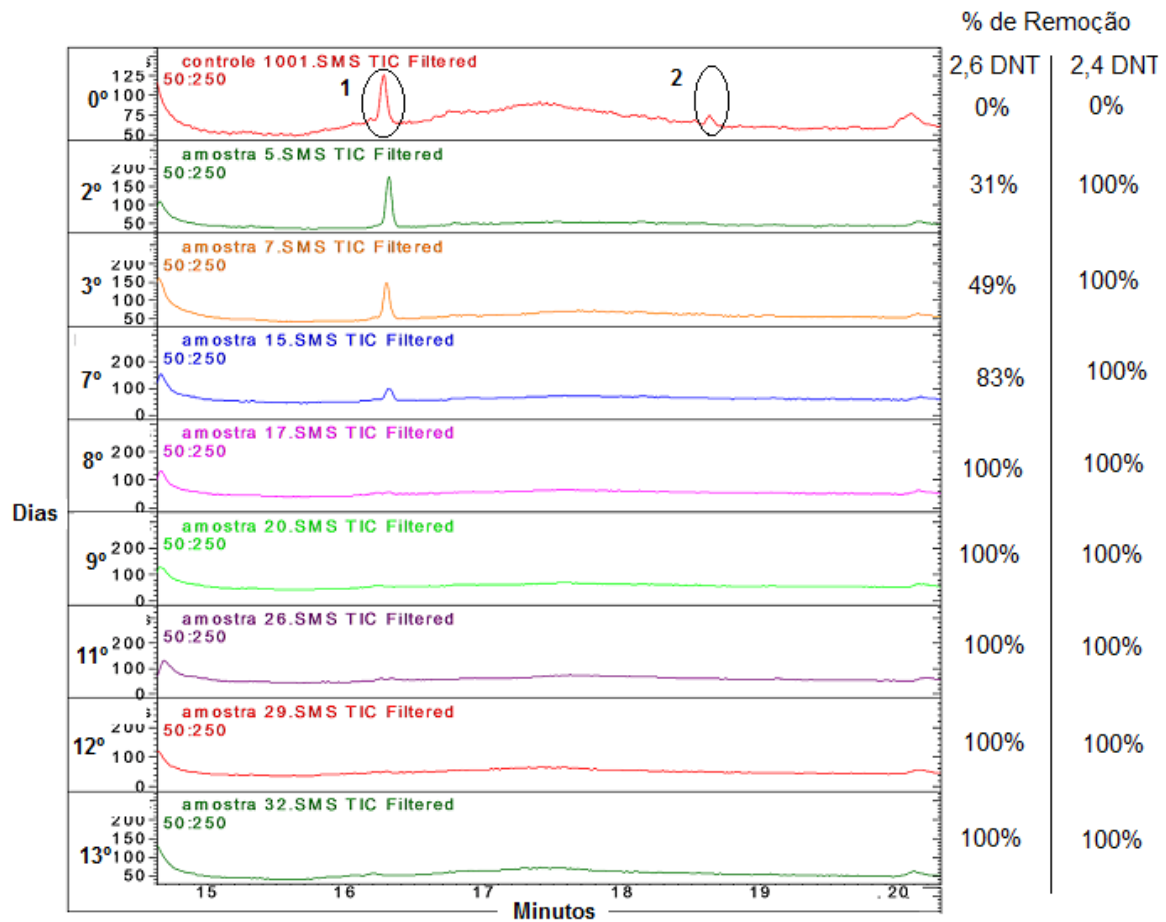


Figura 36 – Cromatograma de monitoramento de 2,6 dinitrotolueno (1) e 2,4 dinitrotolueno (2) referente ao controle e as amostras do tratamento fúngico.

Através da comparação das áreas dos picos indicados no cromatograma da Figura 36 foi possível verificar que o 2,4 DNT é totalmente degradado em 24 horas de tratamento, enquanto que o 2,6 DNT necessitou de 8 dias para sua completa degradação. Neste sentido, pode-se especular que estes processos se conduziram pela ação das enzimas peroxidase e logo após a MnP.

No 7º dia de tratamento o 2,6-dinitrotolueno apresentou uma redução da área do pico de 83%, sendo que o mesmo no 8º dia de estudo (Figura 37) alcançou 100% de redução para ambos os compostos monitorados, sendo tal processo atribuído as enzimas produzidas pelo fungo, principalmente a peroxidase e a MnP, visto que a lacase atinge níveis máximos de atividade enzimática somente a partir do oitavo dia.

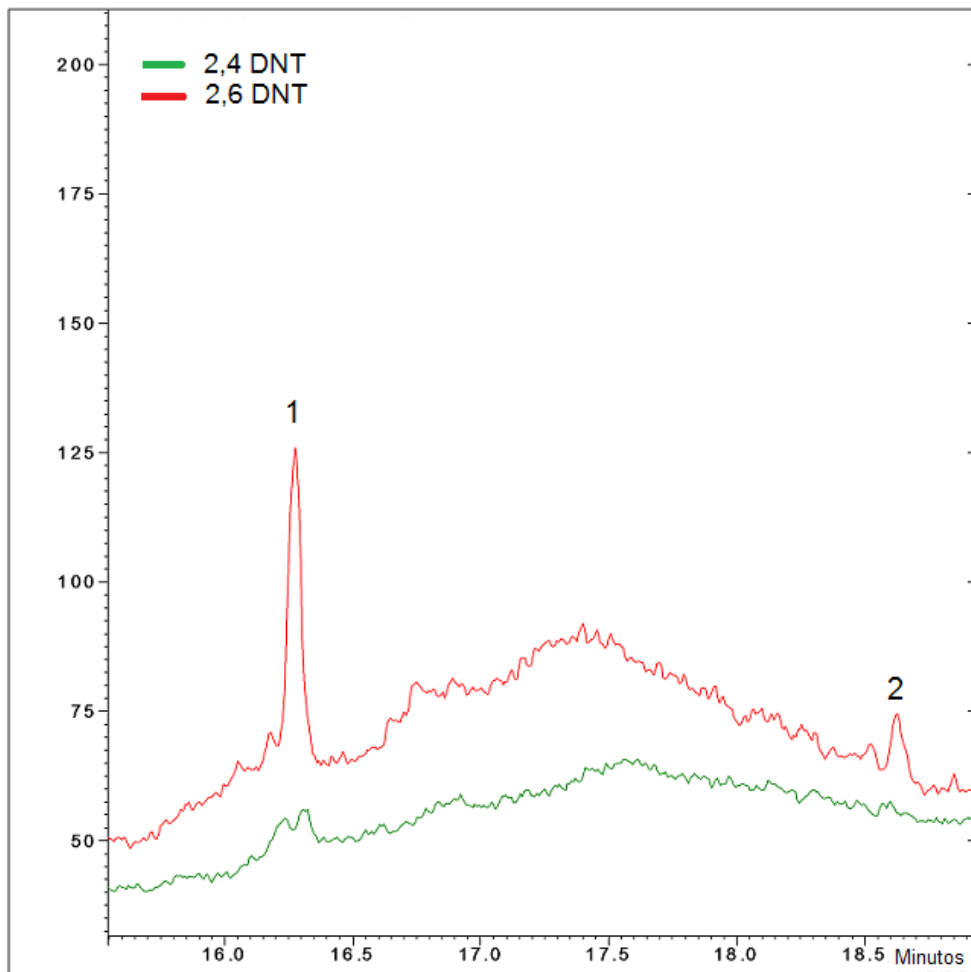


Figura 37 – Cromatograma do 8º dia mostrando os dois picos de monitoramento, sendo pico 1 o 2,6 DNT e pico 2 o 2,4 DNT.

Para justificar a eficiência da degradação do composto 2,4 e 2,6-dinitrotolueno pelas enzimas peroxidase e MnP, foi construído o gráfico ilustrado na Figura 38, neste é mostrada o final da degradação de 2,6-dinitrotolueno e o início da produção de lacase.

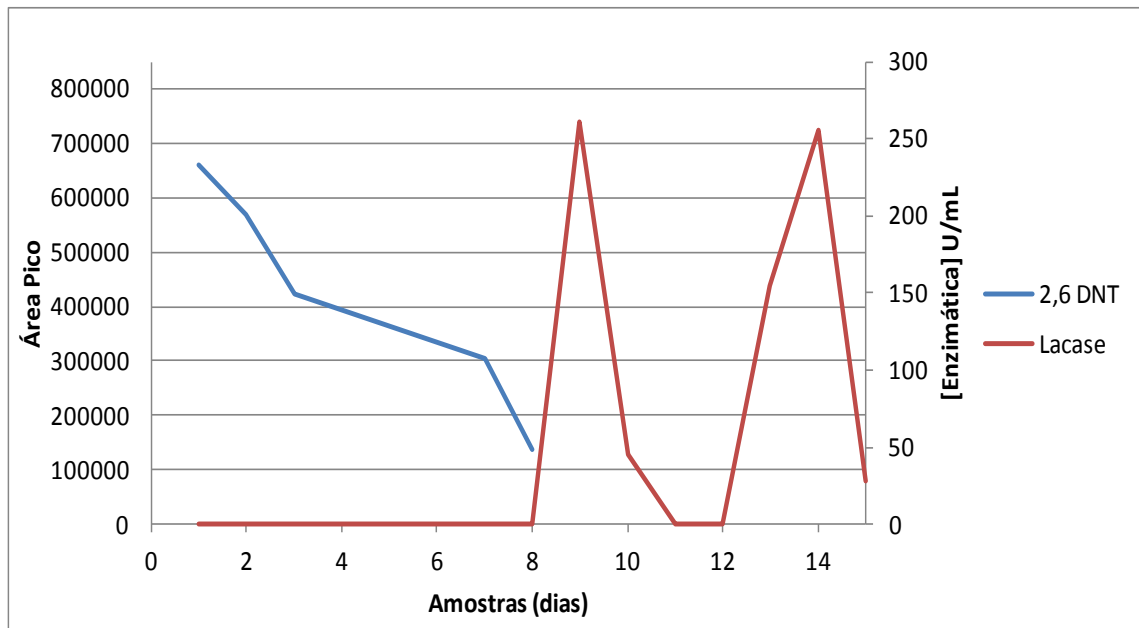


Figura 38 – Representação gráfica comparando a redução de 2,6-dinitrotolueno e a produção de lacase.

A maior degradação e possível mineralização dos nitroaromáticos aconteceu entre o 1º e 8º dia de experimento, dias em que iniciou-se a produção da enzima peroxidase e MnP por parte do fungo *P. floridae*. A lacase produzida posteriormente pode estar relacionada a quebra de algumas substâncias presentes na AV que podem ter servido de alimento para o fungo e esta também pode ter sido produzida devido ao estresse que o efluente causou ao fungo.

Estudo realizado com TNT por Muter et al. (2012) demonstrou que a quantidade total de TNT de 100 mg/L teve uma redução de 90% após 14 dias de incubação.

Scheibner et al. (1997) estudaram 91 cepas de fungos pertencentes a 32 gêneros diferentes, estes foram testados quanto à sua capacidade de metabolizar e mineralizar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT). A mineralização significativa de TNT foi observada apenas para os fungos basidiomicetos.

Oito fungos foram testadas para a capacidade de transformar e tolerar TNT em meio líquido. Os fungos *Trichoderma viride* e *C. resinae* foram mais tolerante ao TNT. *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*, *Trichoderma viride*, *Schizophyllum commune* e *Cladosporium resinae* converteram quantidades significativas de TNT (27%, 19%, 18% e 8%) (BAYMAN; RADKAR, 1997).

Samson et al. (1998) estudaram a degradação de 2,4,6-dinitrotolueno e 2,4-dinitrotolueno ambos em uma concentração inicial de 50 mg/L de TNT, em meio líquido, o TNT foi totalmente transformado pelos três fungos: *Ceratocystis coerulescens*, *Lentinus lepideus* e *Trichoderma harzianum*. O DNT somente foi degradado por *C. coerulescens* e *T. Harzianum*.

A degradação do TNT por sete espécies de fungos da podridão branca foi realizada em meio líquido com uma concentração de 50 mg/L de TNT. Durante a degradação foi possível detectar a produção de amino-dinitrotoluenos, que desapareceram no final da incubação (KIM; SONG, 2000).

5.6 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PÓS-TRATAMENTO FÚNGICO

Visando comparar o efluente AV antes e após tratamento fúngico realizou-se dois testes de toxicidade. O primeiro (Figura 39), sem tratamento fúngico, era composto por: efluente AV na concentração de 0,5%, 10 g/L de glicose e pH 6. O segundo (Figura 40), após o período de 15 dias em *Shaker* com o fungo *P. floridae*, era igualmente formado.

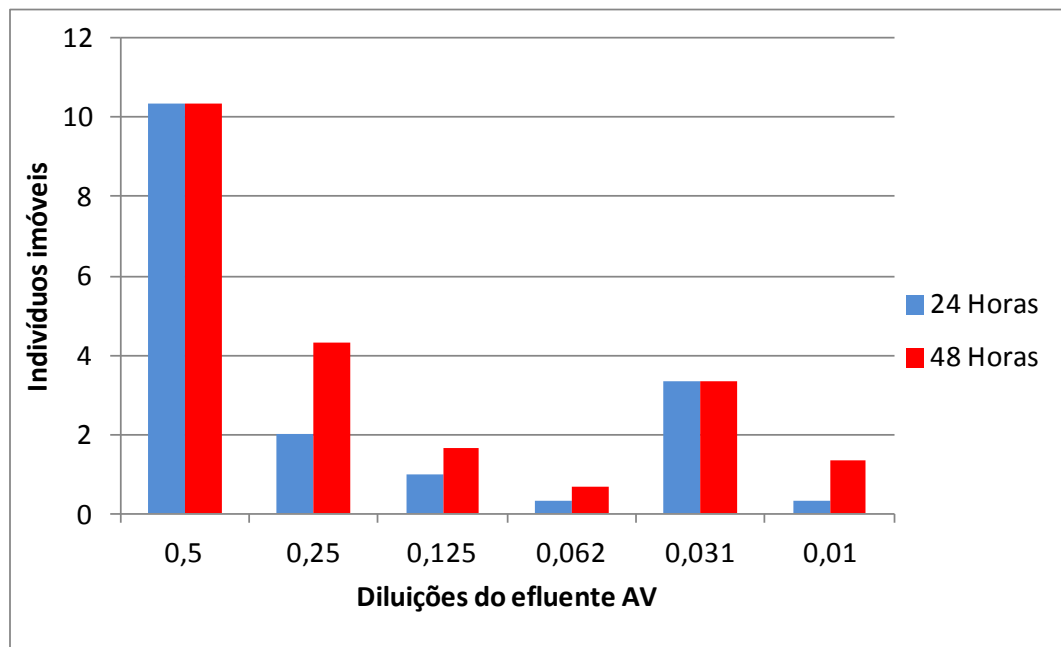


Figura 39 – Representação gráfica do estudo com *D. magna* mostrando imobilidade em diferentes diluições de Água Vermelha, em 24 e 48 horas com o meio de cultivo líquido, sem tratamento.

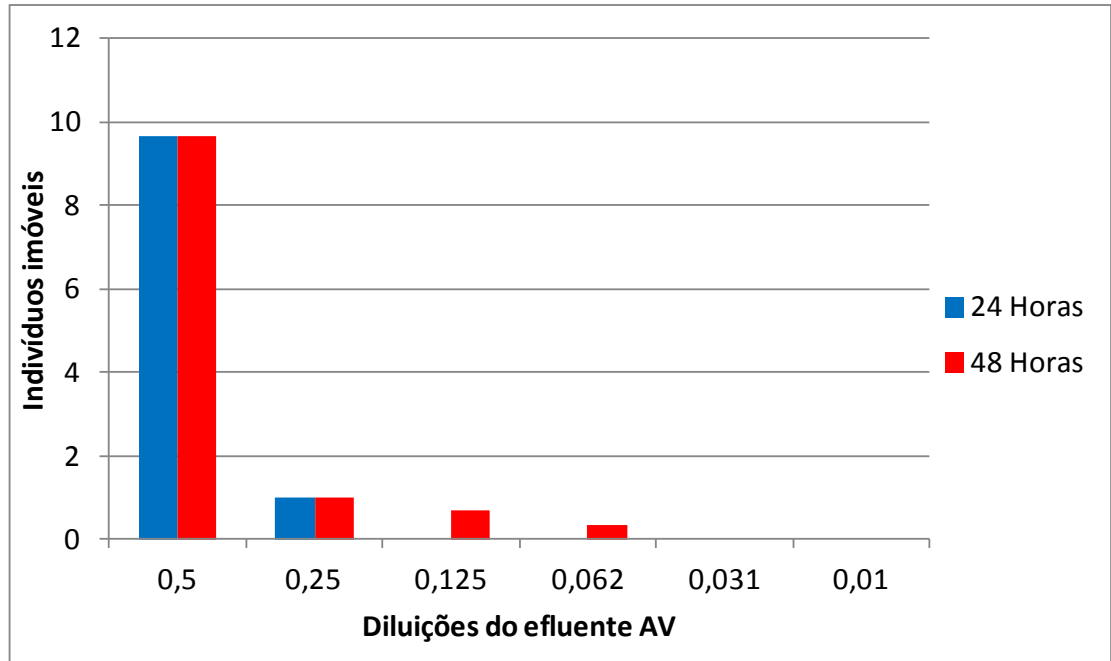


Figura 40 – Representação gráfica do estudo com *D. magna* mostrando imobilidade em diferentes diluições de Água Vermelha, em 24 e 48 horas com o meio de cultivo líquido, após o tratamento fúngico de 15 dias.

Comparando a toxicidade do meio tratado por 15 dias com o efluente não tratado, podemos observar a redução da toxicidade analisando o FT_D (Figura 41), porque de 8 passou para 4 em 48 horas de ensaio toxicológico, pois quanto maior o FT_D , maior a toxicidade.

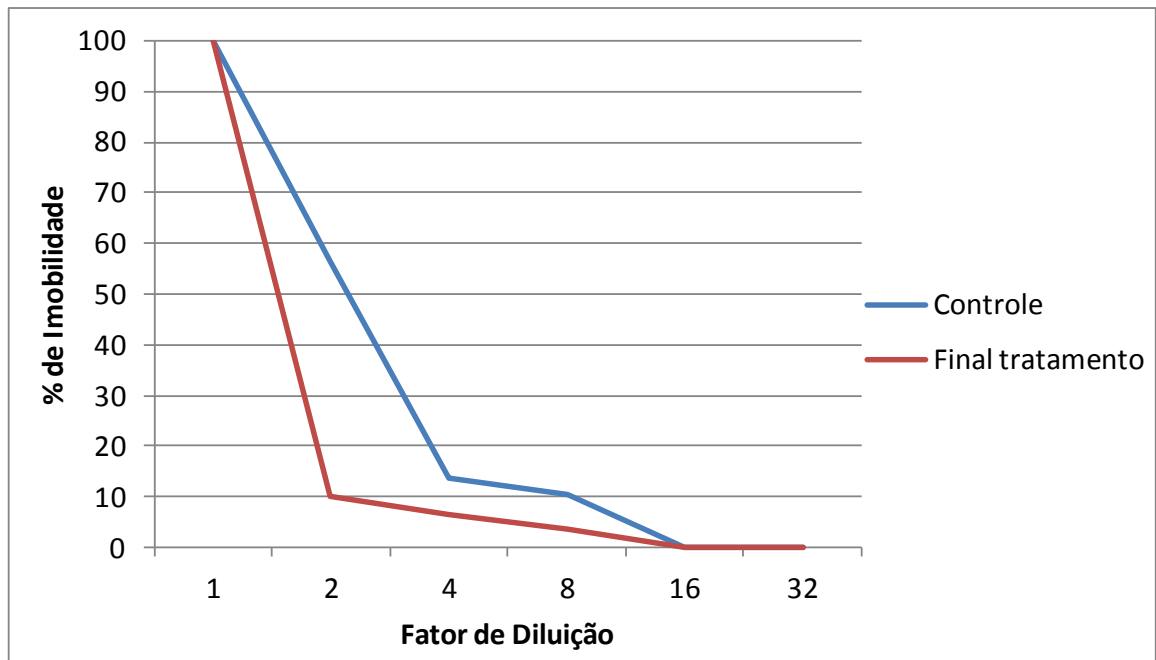


Figura 41 – Representação gráfica do FT_D comparando a toxicidade do meio com o final do tratamento fúngico de 15 dias.

No início do tratamento fúngico foi mantido um teste controle, sem o fungo. Este, após o término do tratamento foi submetido juntamente com o resultado do último dia de tratamento ao ensaio com *D. magna*. O tratamento teve êxito na diminuição da toxicidade para o microcrustáceo, e conforme diminuía a concentração do efluente, este não apresentou mais toxicidade alguma ao organismo-teste.

Resultados similares foram verificados por Forgiarini (2006) que observou a degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima peroxidase, portanto, no efluente não tratado apresentou um FT_D mais elevado do que o tratado, mostrando que houve redução da toxicidade após o tratamento enzimático.

Um teste de biotoxicidade realizado por Liu et al. (2012) com a bactéria *Vibrio qinghaiensis sp.*, mostrou que a toxicidade aguda da AV contendo o TNT foi reduzida em cerca de 94% como uma consequência do tratamento com ferro de valência zero.

Após o tratamento com processo redutivo, o substrato contendo trinitrotolueno teve sua toxicidade analisada com *Artemia salina*, e esta foi reduzida em 90% (CAVALOTTI, 2008).

Na avaliação da toxicidade aguda de efluentes de pesticidas utilizando *Daphnia magna*, Pawlowsky et al. (1997) também observaram uma redução da toxicidade de 93%.

A resolução SEMA/IAP 070/09 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes líquidos industriais, estabelece padrões e critérios para o lançamento destes no meio ambiente, bem como as condições e exigências para o Sistema de Automonitoramento, como parte integrante do Sistema de Licenciamento de Atividades Poluidoras, onde para todas as categorias de efluente não definidas, ficam estabelecidos os limites máximos de toxicidade. Assim um dos organismos que monitora a indústria química é *Daphnia magna*, onde o FT para *D. magna* deve estar em 8 (12,5%).

Desta forma, o efluente AV tratado neste trabalho não pode ser eliminado nos corpos hídricos sem o devido tratamento, pois o mesmo estava diluído (0,5%) e não foi tratado bruto, devido a sua toxicidade alta, porém os resultados indicam que o tratamento do efluente nesta concentração é eficaz e permite o seu lançamento no meio ambiente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização do efluente com a finalidade de conhecer o perfil químico dos compostos existentes foi importante para entender a composição da AV e como é difícil a degradação de seus compostos por tratamentos convencionais. Com este estudo, também foi possível propor a biorremediação por fungos, especificamente os do gênero *Pleurotus*, como uma alternativa aos processos de tratamento de resíduos das indústrias de explosivos.

O teste ecotoxicológico também evidenciou a importância do tratamento destes efluentes, devido aos resultados obtidos no ensaio de toxicidade com *D. magna*, que identificou o efluente AV à 0,5% como tóxico. O fator de toxicidade (FT) foi observado na concentração de 1% como 16 e na concentração de 0,5% como 4 em 24 horas.

Os ensaios preliminares em meio sólido para verificar o crescimento dos fungos nos meios de cultivo descritos no planejamento fatorial e também o meio líquido para confirmar os parâmetros, apresentaram tendência estatística de melhor crescimento do fungo *P. floridae* na concentração de efluente 0,5%, em pH 6 e com 10 g/L de glicose. Estas condições foram consideradas no segundo experimento em meio líquido com frascos agitados.

Os testes de toxicidade com *D. magna* demonstraram a eficiência do tratamento fúngico com o fungo *P. floridae*, pois ocorreu diminuição da toxicidade.

A adsorção da AV ao micélio fúngico mostrou-se insignificante, indicando a capacidade e a eficiência de *P. floridae* na biodegradação deste efluente.

O tratamento biológico do efluente da indústria de explosivos AV mostrou-se viável, uma vez que conseguiu reduzir a concentração de alguns nitroaromáticos, bem como a total mineralização de alguns compostos como o 2,6-dinitrotolueno e o 2,4-dinitrotolueno presentes no efluente, boa descoloração do meio, redução de fenóis, DQO e DBO. Sugere-se, entretanto, que para posteriores estudos com os fungos do gênero *Pleurotus*, mantenha-se o estudo por maior tempo, visto que o fungo *P. floridae* estava em crescimento no último dia deste estudo.

Para otimizar e elevar a redução da concentração de nitroaromáticos visualizada em escala de bancada, sugere-se a utilização de reatores do tipo *Air lift*

que é capaz de manter elevada concentração de biomassa ativa em movimento proporcionando maior área de interação com o substrato.

Embora este trabalho tenha estudado a biodegradação fúngica do efluente diluído, sua aplicabilidade se mantém, visto que, na condição original (sem diluição), em função da alta concentração de nitroaromáticos, não recomenda-se qualquer tratamento direto. Neste contexto, sugere-se a realização de estudos de aproveitamento e/ou recuperação destes, para somente depois realizar-se o tratamento biológico.

Outras formas de tratamento conjunto devem ser estudadas para que o processo biológico deste trabalho viabilize-se sem necessitar de uma diluição tão elevada do efluente. Dentre estes destacam-se o tratamento foto-fenton, lodos ativados e processos físicos e químicos. Também seria interessante para a indústria reaproveitar parte dos compostos presentes no efluente, como o TNT, visto que é a matéria prima da geração de explosivos, assim, a toxicidade e a concentração de alguns compostos tóxicos diminuiriam, podendo o tratamento biológico ocorrer de forma mais eficaz.

Para estudos posteriores seria importante realizar a extração direta e/ou produção das enzimas peroxidase e MnP, para aplica-las diretamente sobre o efluente para reduzir o tempo de tratamento e torna-lo mais efetivo, pois o tratamento com fungos precisa levar em conta o cuidado com o cultivo do mesmo, alimento, entre outros. Pois como afirma Forgiarini (2006), esta técnica apresenta especial vantagem para o tratamento de soluções fortemente concentradas, pois a reação pode ser procedida sem diluição da corrente poluída, e em um curto tempo de retenção.

O estudo realizado constitui uma contribuição para o reconhecimento da relevância ambiental dos compostos nitroaromáticos e para o desenvolvimento de tecnologias que reduzam ou minimizem o impacto causado por efluentes desta natureza.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. Ga. De; SOUZA, C. G. M. de; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007

ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclet. Quím.** [online]. vol.35, n.3, p. 17-43. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702010000300002>>. Acesso em: 14 de Out. 2012.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION in: **Standard Methods For Examination Of Water And Wastewater**, 19th Ed., American Public Health Association: Washington D.C, 1995.

_____. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th Ed. Washington: American Public Health Association, 1998.

ASSIS, I. S. de. **Síntese e Avaliação *in vivo* de Substâncias Bioativas de *Pleurotus sajor-caju***. 2011. 101 f. Dissertação – Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE. Santa Catarina, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 12614 - Águas - Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), Rio de Janeiro, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

AXTELL, C.; JOHNSTON, C. G.; BUMPUS, J. A. Bioremediation of Soil Contaminated with Explosives at the Naval Weapons Station Yorktown. **Journal of Soil Contamination - J SOIL CONTAM**, vol. 9, no. 6, pp. 537-548, 2000.

BABÁ, A. Y.; ROSADO, F. R.; ZONETTI, P. da C. Biorremediação de efluentes líquidos por meio da ação de *Pleurotus* spp. **V EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica – CESUMAR**. Paraná, 2009.

BALDRIAN, P. **Interactions of heavy metals with white-hot fungi.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, 78-91, 2003.

BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, Vol. 8, Num. 1, 2012.

BARBOSA, A. M.; CUNHA P. D. T. da; PIGATTO, M. M.; SILVA M. de L. C. da. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 2004.

BARNABE, A. S. **Processos de biodegradação dos herbicidas paraquat e diquat por fungos Basideomicetos. Uma proposta par biorremediação de solos.** São Paulo, 2003.

BAYMAN, P.; RADKAR, G. V. Transformation and tolerance of TNT (2,4,6-dinitrotolueno) by fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Vol.39(1), pp.45-53, 1997.

BITTON, G. **Wastewater Microbiology.** New York, 1994.

BONFANTI, P. **Utilização de *Pleurotus sajor-caju* na redução da concentração de compostos fenólicos presentes no efluente da indústria de papel e celulose.** 2006. 105 f. Dissertação em Biotecnologia - Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2006.

BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M. **Manuais práticos vida: cogumelos.** EditoraTrês. São Paulo, 1985.

BRASIL. Ministério do meio Ambiente. Conselho Nacional do meio Ambiente - **CONAMA**. Resolução n. 430. Diário Oficial da União, 13 Maio. 2011.

_____. Ministério do meio Ambiente. Conselho Nacional do meio Ambiente - **CONAMA**. Resolução n. 023. Diário Oficial da União, 12 Dezembro. 1996.

BRUM, T. **Remediação Ambiental de Áreas Contaminadas por Explosivos.** 2010. 123 f. Dissertação – Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2010.

CAMPOS, C; DIAS, D. C; VALLE, J. S; COLAUTO, N. B; LINDE, G. A. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 19-24, jan./jun. 2010.

CAVALOTTI, L. F. R. **Degradação de Espécies Nitroaromáticas E Remediação de Resíduos da Indústria de Explosivos por Processos Avançados Envolvendo Ferro Metálico.** 2008. 66 f. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Química Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

CAVALOTTI, L. F. R.; PERALTA-ZAMORA, P.; RODRIGUES, M. B.; PAIVA, T. C. B. de. Degradação de espécies nitroaromáticas e remediação de efluentes da indústria de explosivos, utilizando-se processos redutivos-oxidativos fundamentados no uso de ferro metálico. **Quím. Nova** [online]. 2009, vol.32, n.6, p. 1504-1508. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600027>>. Acesso em: 30 de Out. 2012.

CELESTINO, P.; BARBOSA, B.; AMARAL, W.; SAMPAIO, G.; RODRIGUES, K. Efeito do “Tamanho do Inóculo” na Remoção de Matéria Orgânica de Água Residuária Contaminada com BTX. **IV CONNEPI – Congresso de Pesquisa e Inovação de Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica.** Belém, 2009.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Investigação para Remediação.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/Capitulo_X.pdf>. Acesso em: 17 de Abr. 2012.

CHEONG, S.; YEO, S.; SONG, HG.; CHOI, HT. Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trameter versicolor*. **Microbiological Research**, vol 7, pg 198-203, Koreaia, 2003.

COLLA, L.M.; PRIMA, A.L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.809-813, 2008.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. DA. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

DAVIS, S.; BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 721-726, 1990.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP.** 2005. 137 f. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ecologia de Agroecossistemas. Piracicaba, 2005.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S. N. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, Vol.37(10), pp.1091-6, 2010.

ESTEVE-NÚÑEZ, A.; CABALLERO, A.; RAMOS, J. L. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** September, vol. 65 no. 3 335-352, 2001.

FAN, L; SOCCOL, C.R. Detoxificação da casca de café utilizando fungo comestível do Gênero *Pleurotus*. II **Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**. Paraná, 2001.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos.** 2009. 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERRONATTO, G. R.; SALMASO, M. H. S. **Avaliação de Atividade Antimicrobiana de Espécies de Macrófitas Aquáticas da Região Metropolitana de Curitiba.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Curitiba. Paraná, 2010.

FIGUEIRÓ, G. G. **Influência do Substrato no Cultivo e na Composição Química do Cogumelo *Pleurotus floridae*.** 2009. Dissertação UNESP – Pós Graduação Agronomia. São Paulo, 2009.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima *Horseradish Peroxidase (HRP)*.** 2006. 121 f. Dissertação - Programa de Mestrado em Engenharia Química do Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2006.

GABIATTI, C. Jr.; VENDRUSCOLO, F.; PIAIA, J. C. Z.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, J. A. V.; DURRANT, L. R.. Seleção de Fungos para Produção de Biossurfactante Através da Utilização da Velocidade de Crescimento Radial. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - **SINAFERM**, Florianópolis - SC, 2003.

GARCIA, F. F. **BIODEGRADAÇÃO DE 2,4 – DICLOROFENOL E 2,4,6 – TRICLOROFENOL POR FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus***. 2009. 94 f. Dissertação - Programa de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE. Santa Catarina, 2009.

GERN, R. M. M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso**. 2005. 156 f. Tese Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Pós-Graduação em Engenharia Química. Florianópolis, 2005.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

GUERRA, T. **Estudo por teoria do funcional da densidade da adsorção do 2,4,6-trinitrotolueno sobre a superfície de óxido de magnésio**. 2011. 109 f. Dissertação - Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2011.

GUIMARÃES, M. S. de O. **Coleta, Isolamento e Identificação de Fungos Presentes em Sistemas de Tratamento de Efluentes de Indústria Petroquímica para Utilização em Processos Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos**. 2009. 56 f. Dissertação, Programa de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2009.

HELFERICH, O. K. **Estudos de Degradação de Espécies Nitroaromáticas em Efluente da Indústria de Explosivos por Processos Redutivos e Oxidativos Avançados**. 2012. 53 f. Qualificação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Curitiba, 2012.

HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos**. 2009. 117 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2009.

HOFRICHTER, M.; SCHEIBNER, K.; SCHNEEGAß, I.; FRITSCH W. Enzymatic Combustion of Aromatic and Aliphatic Compounds by Manganese Peroxidase from *Nematoloma frowardii*. **Appl Environ Microbiol**. February; 64(2): 399–404, 1998.

IAL- **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz**. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. São Paulo, 1985.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. de O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, V.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

KERN, D. I. **Avaliação da Eficiência da Ozonização Fotocatalítica no Tratamento de Efluentes de Lavanderia Hospitalar, por meio de Ensaio Ecotoxicológicos e Genotóxicos.** 142 f., 2012. Programa de Mestrado em Tecnologia Ambiental - Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Santa Cruz do Sul, 2012.

KEUM YS, LI QX. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. **Chemosphere**. Volume 56, Issue 1, July, pages 23-30. USA, 2004.

KHALIL, Md. I.; HOQUE, M. M., BASUNIA, M. A.; ALAM, N.; KHAN, Md. A. Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. Turkish **Journal of Agriculture and Forestry**, 2012.

KIM, HY ; SONG, HG. Comparison of 2-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. **Current Microbiology**, Vol.41(5), pp.317-320, 2000.

_____. Simultaneous Utilization of Two Different Pathways in Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by White Rot Fungus *Irpex lacteus*. **The Journal of Microbiology**, December 2000, p.250-254 Vol. 38, No. 4, 2000.

KOMURA, D. L. ***Pleurotus ostreatus* variedade *florida*: Caracterização Estrutural de Polissacarídeos do Micélio e Exopolissacarídeos.** 79 f., 2009. Dissertação em Ciências - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. de; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, 2002.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.**, V. 169, p. 247-250. Oregon, 1984.

LACERDA, L.K.V.; GOMES, R.B.; BUARQUE, H.L.B.; MUNIZ, C.R.; ARAÚJO, S.F. Estudo Morfofisiológico de Fungos Filamentosos em Efluentes de uma Indústria Têxtil Localizada na Região Metropolitana de Fortaleza/CE. In: **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica.** João Pessoa – PB, 2007.

LIMA, S.; SOUZA, B.; SARAIVA, L. **Utilização de Microrganismos Isolados dos Resíduos do Processamento de Cupuaçu na Oxidação Biológica de Compostos Fenólicos.** Disponível em: <<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/anais/conteudo/anais/files/conferences/1/schedConfs/1/papers/1528/public/1528-5077-1-PB.pdf>>. Acesso em: 25 de Abr. 2012.

LIU, Guo-hua; ZHU, Shi-Ni; YE, Zhengfang. Reduction in the Acute Toxicity of Explosive Wastewater Containing Toxic Nitroaromatic Compounds by a Nanoscale Zerovalent Iron Pretreatment Process. *Water Air Soil Pollut* 223:5049–5055. **Science and Business Media**, 2012.

LOPES, A. C.; CAVASOTTO, T. **Caracterização Química e Físico-Química do Efluente Água Vermelha da Indústria de 2,4,6-Trinitrotolueno.** 46 f. 2011. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Paraná, 2011.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Biodegradação do azul brilhante de remazol R pelo complexo enzimático ligninolítico produzido por *Pleurotus ostreatus*. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2006, vol.37, n.4, pp. 468-473. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400012>>. Acesso em 22 de Nov. 2011.

MAIO, C. S. da S.; PADILHA, E.; CORRÊA, F. V.; COSTA, J. A. V. **Influência da Composição do Substrato na Velocidade de Crescimento do Cogumelo Comestível *Pleurotus ostreatus*.** Rio Grande-RS, 2004.

MARQUES, T. E. T.; PAIVA, T. C. B. Avaliação ecotoxicológica de efluentes provenientes da fabricação de explosivos utilizando o organismo *Danio rerio*. Escola de Engenharia de Lorena, EEL/USP, Lorena. **FAPESP**, 2008.

MARINO, R.H.; ABREU, L.D.; MESQUITA, DE, J.B.; RIBEIRO, G.T. Crescimento e Cultivo de Diferentes Isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da Casca de Coco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.1, p.29-36, jan./mar., 2008

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.77-84, 1999.

MELO, N. M; SIQUEIRA, C. D.; PAIVA, T. C. B. de. Análise da série de nitrogênio e toxicidade de despejo de indústria de explosivos e corpo receptor. 18º Simpósio Internacional de Iniciação Científica - **SIICUSP**. 2010.

MINOTTO, E. **Aproveitamento de Resíduos de Chorume no Cultivo do Cogumelo Comestível *Pleurotus spp.*** 2007. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Pelotas- RS, Rio Grande do Sul, 2007.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized *Horseradish* peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, V. 58, p. 1097 – 1105, 2005.

MUTER, O.; POTAPOVA, K.; LIMANE, B.; SPROGE, K.; JAKOBSONE, I.; CEPURNIEKS, G.; BARTKEVICS, V. The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil. **Journal of Environmental Management**, Vol.98, pp.51-55, 2012.

NASCIMENTO, C. R. S. do. **Avaliação do Potencial de Descoloração e Detoxificação de Corantes Utilizados em Indústria Têxtil por Fungos Isolados de Sedimento do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI)**. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2008.

NEDER, R.N. **Microbiologia: manual de laboratório**. São Paulo, editora Nobel, 1992.

NETO, B. C. de M. **Cogumelos comestíveis e medicinais**. Disponível em: <<http://cogumeloscomestiveis.blogspot.com.br/2010/10/shimeji-preto-cogumelo-ostra-o-shimeji.html>>. Acesso em: 25 Nov. 2012.

NETO, A. M.; CRUZ, S. H. da; MONTEIRO, R. T. R. **Degradação de Pigmentos de Efluentes Industriais por Fungos Basidiomicetos**. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/14Siicusp/35.pdf>>. Acesso no dia: 04 de Nov. 2010.

NEVES, J. C. Dos S. **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO BASIDIOMA DE *Pleurotus ostreatus* variedade *florida***. 2007. 77 f. Dissertação - Pós Graduação em Ciências da Universidade Federal do Paraná, 2007, Paraná.

OLIVEIRA, E. C.; FÉLIX, J. P. L.; LEITÃO, R. C.; MELO, V. M. M.; SANTAELLA, S. T. Degradação de Fenóis por Fungos Presentes em Águas Residuárias de

Refinarias de Petróleo. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Campo Grande/MS, 2005.

PARK, J.S.; IN, B.H.; NAMKOONG, W. Toxicological evaluation for bioremediation processes of TNT-contaminated soil by *Salmonella* mutagenicity assay. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Vol.29(8), pp.1074-1080, 2012.

PAWLOWSKY, U.; GLOWSKI, A. M. N.; FERRANTE, E. M. de; BOSA, M. N. Aplicação de Testes de Toxicidade na Tratabilidade de Efluentes de Pesticidas. **19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Foz do Iguaçu: ABES, p. 1-12. 1997.

PEÑA-MIRANDA, M; BENITO, G.G.; CRISTOBAL, N.S.; NIETO, C.H. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. Volume 57, Issue 3, Pages 229–235, Spain, 1996.

PEDRA, W.N.; MARINO, R.H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.73, n.2, p.219-225, São Paulo, 2006.

PEREIRA, P. M. **Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

PINTO, A. C. V. V.; PAIVA, T. C. B. Avaliação da sensibilidade do organismo *Artemia salina* quanto ao potencial de detecção de toxicidade de efluentes oriundos da fabricação da nitrocelulose. Escola de Engenharia de Lorena, EEL/USP, Lorena. **FAPESP**, 2007.

POZDNYAKOVA, N.N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O. V.; HABER, J. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* DI in the presence of synthetic mediators. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 1242- 1249, 2006.

RAVEN P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Guanabara Koogan S.A. 5º ed. 728p, Rio de Janeiro, 1992.

RIBEIRO, E. N. **Avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade nos efluentes das indústrias de explosivos: seleção de uma**

bateria de testes na busca dos “organismos ideais”. 2008. Tese doutorado – São Paulo, 2008.

RIBEIRO, E. N.; SILVA, F. T. Da; PAIVA, T. C. B. De. Ecotoxicological evaluation of wastewater from 2,4,6-TNT production. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. Volume 47, Issue 2, pages 184-191, 2012.

RHO, D.; HODGSON, J.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G.; HAWARI, J. Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by Immobilized *Phanerochaete chrysosporium* Under Fed-Batch and Continuous TNT Feeding Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 73, no. 4, may 20, 2001.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. 130 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RODRIGUES, K.; VIDAL, C. B.; ANDRADE, M. V. F.; PESSOA-WANDERLEY, C. R.; DUARTE, I. C. S.; MARINHO, G. Influência da Glicose e da Concentração do Inóculo Fúngico no Tratamento de Efluente da Castanha de Caju. **Conex. Ci. e Tecnol.** v. 4, n. 1, p. 41-51, Fortaleza/CE, 2010.

RODRIGUES, M. **Tratamento de efluente proveniente da fabricação de TNT de uma indústria de explosivos utilizando processos redutivos e oxidativos avançados**. 2005. 132 f. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

RODRIGUES, M. B.; SILVA, F. T. da PAIVA, T. C. B. de. Caracterização física, química e ecotoxicológica de efluente da indústria de fabricação de explosivos. **Quím. Nova** [online]. 2007, vol.30, n.7, pp. 1623-1627. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700023>>. Acesso em 22 de Abr. de 2011.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. **Current Microbiology**, Vol.38(1), pp.27-32, 1999.

ROSOLEN, L. A.; MONTEIRO, R. T. R.; DELLAMATRICE, P. M.; KAMIDA, H. M. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos

basidiomicetos. **XVII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUIMICA TEXTIL**. Piracicaba – SP, 2004.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30(1): 126-131, jan.-mar. 2010.

RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido γ -Linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP**. Tese doutorado – Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2001.

SALES-CAMPOS, C. **Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica**. 2008. 182f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F. da; JESUS, M. A. de; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. de. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de Simarouba amara. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43 (11), 1633-1635. Retrieved November 29, 2008.

SALVI, M. B. de. **Fungos Basidiomicetos em Biorremediação**. Instituto de Botânica de São Paulo – IBt - Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo 2011. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_basidiomicetos_em_biorremediacao_Marina_Bianchini.pdf> Acesso em: 17 de Abr. de 2012.

SAMSON, J.; LANGLOIS, É.; LEI, JI. ; PICHÉ, Y. ; CHÊNEVERT, R. Removal of 2,4,6-trinitrotoluence and 2,4-dinitrotoluene by fungi (*Ceratocystis coerulea*, *Lentinus lepideus* and *Trichoderma harzianum*). **Biotechnology Letters**, Vol.20 (4), pp.355-358, 1998.

SANJUST, E.; POMPEI, R.; RESCIGNO, A.; RINALDI, A.; BALLERO, M. Olive milling wastewater as a médium for growth of four *Pleurotus* species. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 31: 223- 235, 1991.

SANTAELLA, S. T., CAMPOS, J. R., LINARES, I. L. Perspectivas de remoção de cor (substâncias húmicas) de águas destinadas ao abastecimento público, mediante tratamento biológico. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.1 n.1, p. 14-17, janmar, 1996.

SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C.; MENEZES, E. A.; SILVA, F. J. A. DA.; ARAGÃO, K. S. DA.; GIFFONI, D. A. Emprego de fungos para tratamento biológico dos efluentes da indústria de beneficiamento de Castanha de Caju. **ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. VI SIBESA - Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vitória – ES, 2002.

SARTORI, S. B. **Atividade enzimática e valores nutricionais de Pleurotus spp. Cultivados em vinhaça**. 2011. 134 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SCALIZE, P. S.; LEITE, W. C. de A.; RODRIGUES, J. M.; CORREA, M. de S.; VENUZO, S. B.; LOMBARDI, R.; OLIVEIRA, S. C. de; SANTOS, M. F. dos. Correlação Entre os Valores De DBO e DQO no Afluente e Efluente de duas Etes da Cidade de Araraquara. In: Associação Nacional dos Serviços Municipais de Saneamento. Saneamento ambiental: a hora da solução. **ASSEMAE**, Rio Grande do Sul, p.13, 2004.

SCHEIBNER, K. ; HOFRICHTER, M. ; HERRE, A. ; MICHELS, J. ; FRITSCH, W. Screening-trinitrotoluene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol.47(4), pp.452-457, 1997.

SCHEIBNER, K.,; M. HOFRICHTER. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. **J. Basic Microbiol.** 38:51–59, 1998.

SILVA, É. S. da. **Aplicação de Fungos de degradação Branca na Biorremediação de efluente de Branqueamento ECF de polpa Kraft: Utilização de Sistema Contínuo de Células Imobilizadas e Combinação com Tratamento Fotocatalítico**. 2005. 94 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. São Paulo, 2005.

SILVA, R. R. da. **Biorremediação de solos Contaminados com Organoclorados por Fungos Basidiomicetos em Biorreatores**. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SILVA, C. M. M. de S. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado / Célia Maria M. de S. Silva, Itamar Soares de Melo, Pablo Roberto Oliveira. - Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004.

SOARES, I.A.; FLORES, A.C.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.P.; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.2, p.341-350, abr./jun., 2011.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R.; DOMINGOS, S. D.; ROCHA, C. L. DE M. S. C. DA; BARONI, S.. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 30, n. 3, Sept. Campinas, 2010.

SOARES, P. R. S.; CARMO, C. da C.; SILVA, A. C.; DAMASCENO, A. A.; BATISTA, V. T.; SANTOS, L. O. dos. Estudo da Otimização das Condições de Crescimento Micelial do Fungo *Lentinus crinitus*, em Diferentes Meios de Cultura e pH. **62ª Reunião Anual da SBPC**. Natal, 2010.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de Fungos Basidiomicetes em Biodegradação de Efluentes Têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009.

SPIER, M. R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidasases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

TIEN, M.; KIRK, T.T. "Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1984.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMTERTZ, O.; SCANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed., Editora Ateneu, p. 588. São Paulo, 1999.

U.S. EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. EPA-821-R-02-13., 4 ed. Washigton, U.S.A. 2002.

VAN AKEN, B., M. HOFRICHTER, K. SCHEIBNER, A. I. HATAKKA, H. NAVEAU, AND S. N. AGATHOS. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. **Biodegradation** 10:83–91, 1999.

VALLI, K.; BROCK, B. J.; JOSHI, D. K.; GOLD, M. H. Degradation of 2,4-Dinitrotoluene by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 58, No. 1, pg. 221-228, 1992.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 175 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. SC, 2003.

ANEXO

Carta controle para *Daphnia magna*Tabela: Valores médios de CE50-24 h (mg de $K_2Cr_2O_7/L$) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).

Nº do teste	CE 50-24h (mg/L)	R
1	0,93	0,718
2	0,64	0,806
3	0,91	0,970
4	0,96	0,937
5	0,69	0,800
6	0,66	0,628
7	0,99	0,952
8	0,89	0,853
9	0,67	0,921
10	0,88	0,952
Média	0,82	
Desvio Padrão (S)	0,13926793	

Fonte: Própria.

A CE50-24h média obtida foi de 0,82 mg/L, dentro da faixa recomendável por padrões internacionais (ISO 6341), entre 0,6 mg/L e 1,7 mg/L (KNIE; LOPES, 2004).

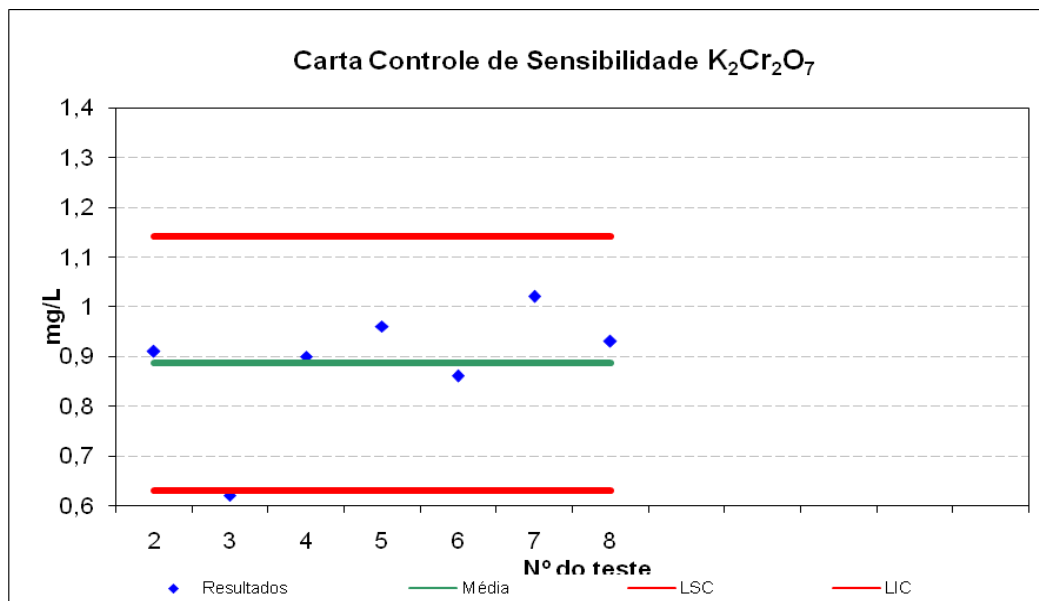


Figura: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de CE50-24 horas do dicromato de potássio a *Daphnia magna* (LSC = limite superior calculado; LIC = limite inferior calculado).