



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT

**FUNGOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAR
CHORUME *IN NATURA* OBTIDO DO LIXÃO MUNICIPAL DE
PARINTINS – AM**

ADRIANA DA SILVA NUNES

MANAUS

2012

ADRIANA DA SILVA NUNES

**FUNGOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAR
CHORUME *IN NATURA* OBTIDO DO LIXÃO MUNICIPAL DE
PARINTINS – AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador (a): Prof. Dr. ADEMIR CASTRO E SILVA

MANAUS

2012

Ficha catalográfica elaborada na Biblioteca CESP- UEA

N972f Nunes, Adriana da Silva

Fungos amazônicos com potencial para degradar Chorume in natura obtido do lixão municipal de Parintins. / Adriana da Silva Nunes. – Manaus: UEA, 2012.

xx, 122p. : il color ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Curso de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

1. Biotecnologia – fungos 2. Fungos – amazônicos 3. Resíduos sólidos 4. Chorume I. Silva, Ademir Castro e. II Título.

CDU – 60:582.28(043)

PARECER

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a arguição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata Adriana da Silva Nunes sob o título “Fungos Amazônicos com potencial para degradar chorone *in natura* obtido do lixão municipal de Parintins – Am”, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Após análise do referido trabalho e arguição da candidata, os membros dão o parecer pela **APROVAÇÃO** da dissertação.

Manaus, 26 de Abril de 2012.

Dra. Arelis Abalos Rodriguez

Universidade Estadual do Amazonas (UEA) – Membro Titular

Dr. Enrique Ramon Molina Perez

Universidade Estadual do Amazonas (UEA) – Membro Titular

Dr. Ademir Castro e Silva

Universidade Estadual do Amazonas (UEA) – Presidente da Banca e Orientador

*“Porque as mais simples
coisas levam às mais
valiosas vitórias...”*

(Adriana Nunes)

DEDICAÇÃO

Primeiramente à **Deus** pelas oportunidades diárias, por ser o meu escudo e o meu incentivo nas horas difíceis, pela capacidade intelectual e por ter me concedido a família maravilhosa e os amigos que passaram e aqueles que irei levar para sempre no coração.

Aos meus pais **Francisco Valeriano Nunes e Francisca da Silva Nunes** por todos os minutos, horas, meses e anos que dedicaram a minha educação e a formação do meu caráter oferecendo todo o seu amor, incentivo e paciência, vocês são o meu exemplo de perseverança e para vocês eu dedico o meu melhor!

Ao meu irmão **Itamar Nunes**, pelo exemplo de paciência e amor desde os momentos da infância, você sempre será o meu herói!

Aos meus irmãos **César Nunes, Valério Nunes e Silvia Nunes** pelas horas de descontração, pelas gargalhadas de alegria e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu esposo **Lundrigo Pantoja de Sá**, pela paciência em dias ausentes destinados à pesquisa, pela compreensão, carinho e pelo amor infinito a mim dedicado, eu vencerei ao seu lado.

AGRADECIMENTOS

A **Ademir Castro e Silva**, meu orientador, pela amizade, incentivo, paciência, pelas longas horas de conversa e conhecimento, compreensão, atenção, confiança e oportunidades concedidas durante este trabalho.

À **Priscila Valente** pela ajuda nas horas burocráticas e pelas risadas descontraídas, aqui conquistei uma amizade.

À **Joice Melo** pela presente ajuda no laboratório, apesar de todas as advertências que recebi, um obrigada especial.

À **Patrícia Loureiro**, um obrigada especial pela ajuda e parceria no decorrer desta pesquisa, você foi uma parcela importantíssima para o êxito desse projeto.

Aos alunos de iniciação científica que foram uma parcela importante neste trabalho: Obrigada à **Esmeralda Andrade, Bruno Pantoja, Ecimar Gomes, Mariane Gonçalves, Nêmora Pinto, Aldenize Viana, Franciane Andrade, Valda Bittencourt**, e **Veranilce Muniz** pelas risadas em laboratório, pela amizade e conhecimentos adquiridos.

Aos amigos que conquistei neste mestrado: **Izabel Santos** pela amizade descontraída, **Aaron Ferreira** pelos momentos maravilhosos, **Elaine Pires** pelo incentivo e compreensão, **Vanessa Galúcio** pela proteção materna, **Paula Mara Valente** pela incrível autoestima e **Ádrya Figueiredo** pelo desafios vencidos.

Aos amigos de longa caminhada **Mikielen Shoji, Kenny Rocha, Soray Gonçalves, Karine Lopes, Adanilson Batista e Rodrigo Senna** que me acompanham desde a graduação, obrigada pelos impagáveis e inesquecíveis momentos de felicidade.

As amigas **Cássia Vieira** e **Josiara Reis** que me acompanham desde o ensino médio e aguentam me ouvir falar de fungos todas as horas que nos encontramos, vocês eu levo para sempre no coração.

À **Silvia Maria Ferreira** pela ajuda nas leituras de espectrofotômetro, meu muito obrigada, você foi uma parcela importante para o sucesso dessa pesquisa.

Ao amigo **Andrey Damasceno** pelo incentivo e descontração.

Ao **Prof. Dr. Everson Miranda** da UNICAMP, que me recebeu com carinho e paciência durante a estadia em Campinas.

A **Prof^a. Naímy Farias de Castro** pelas gargalhadas em seu apartamento, meu muito obrigada.

Aos professores **Dr. Aldo Procópio, Dra. Helena Camarão, Dra. Helen, Dr. Everson Miranda, Dr. Wilson Castro Silva, Dra. Arelis Ábalos Rodrigues, Dr. Enrique Ramon Molina Perez**, pelo conhecimento compartilhado nas aulas do curso de mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

À **Capes** pela bolsa de estudos concedida.

À **Universidade do Estado do Amazonas**, mas precisamente ao **Centro de Estudos Superiores de Parintins – CESP**, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo Geral	4
3.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Município de Parintins.....	5
3.1.1 Aspectos fisiográficos e geológicos.....	5
3.1.2 Lixeira Pública de Parintins.....	6
3.2 Resíduos Sólidos Urbanos.....	8
3.3 Formas de Destinação Final dos Resíduos Sólidos.....	9
3.4 Chorume.....	10
3.5 Remediação de lixões municipais e tratamento do chorume....	12
3.6 Processos Enzimáticos.....	13
3.7 Fungos.....	14
3.7.1 O Potencial Fúngico da Região Amazônica.....	17
3.7.2 Enzimas.....	20
3.7.2.1 Lignina-Peroxidase (LiP).....	21
3.7.2.2 Manganês-Peroxidase (MnP).....	22
3.7.2.3 Lacase (Lac).....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Coleta e isolamento de fungos.....	24
4.2 Capacidade enzimática oxidativa.....	25
4.3 Coleta e tratamento do chorume.....	25
4.4 Crescimento dos fungos em meio suplementado com chorume	26
4.5 Avaliação do crescimento micelial.....	26
4.6 Determinação da biomassa e atividade enzimática.....	26
4.6.1 Fermentação líquida.....	26

4.6.2	Biomassa.....	27
4.6.3	Atividade enzimática.....	27
4.6.3.1	Atividade de Lacase.....	28
4.6.3.2	Atividade de Manganês – Peroxidase (MnP)	28
4.6.3.3	Atividade de Lignina – Peroxidase (LiP).....	28
4.6.3.4	Cálculo da Atividade enzimática.....	29
4.7	Teste de toxicidade do chorume.....	29
4.8	Determinação de proteínas totais.....	30
4.9	Ensaio analítico de cor.....	30
4.10	Análise estatística.....	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Seleção de fungos.....	32
5.2	Influência do indutor no crescimento micelial.....	33
5.3	Produção de biomassa.....	36
5.4	Atividade enzimática.....	38
5.5	Relação atividade enzimática <i>versus</i> biomassa.....	42
5.6	Proteínas totais.....	45
5.7	Toxicidade.....	46
5.8	Degradação da cor do chorume.....	48
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	PUBLICAÇÕES	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Destino final dos resíduos sólidos, por unidades de destino dos resíduos.....	10
Tabela 02: Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca.....	21
Tabela 03: Fungos produtores de fenoloxidasas em períodos de 24, 48 e 72 horas.....	32
Tabela 04: Biomassa fúngica produzida por <i>P. sanguineus</i> e FV-12 em cem dias de incubação.....	36
Tabela 05: Atividade de lacase, MnP e LiP em diferentes concentrações de chorume por um período de incubação de 100 dias.....	38
Tabela 06: Modelo de regressão para diferentes distribuições.....	43
Tabela 07: Degradação de Proteínas Totais do chorume após 30 dias de incubação com fungos amazônicos.....	46
Tabela 08: Valores médios da Inibição da Redução (RT) do chorume após 30 dias de incubação.....	46
Tabela 09: Degradação da cor do chorume.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alguns organismos degradadores de lignina.....	16
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mapa demonstrando a localização da cidade de Parintins – AM.....	05
Figura 02: Lixeira pública de Parintins/AM.....	07
Figura 03: Estrutura proposta para lignina de madeira moída do <i>Eucalyptus grandis</i>	17
Figura 04: Carpóforo do fungo basidiomiceto <i>Pycnoporus sanguineus</i>	19
Figura 05: Local de coleta dos carpóforos fúngicos.....	25
Figura 06: Teste de toxicidade do chorume com raízes de cebolas.....	29
Figura 07 Crescimento do fungo <i>P.sanguineus</i> em meio com acréscimo do indutor seringaldazine (M2).....	33
Figura 08: Crescimento do fungo <i>P.sanguineus</i> em meio sem acréscimo do indutor seringaldazine (M1).....	34
Figura 09: Crescimento do fungo FV-12 em meio com acréscimo do indutor seringaldazine (M2).....	34
Figura 10: Crescimento do fungo FV-12 em meio sem acréscimo do indutor seringaldazine (M1).....	35
Figura 11: Biomassa produzida por <i>P.sanguineus</i> em meio acrescido com chorume.....	37
Figura 12: Biomassa produzida por FV-12 em meio acrescido com chorume.....	37

Figura 13: Atividade enzimática de lacase do fungo FV-12.....	39
Figura 14: Atividade enzimática de lacase do fungo <i>P.sanguineus</i>	39
Figura 15: Atividade enzimática de MnP do fungo FV-12.....	40
Figura 16: Atividade enzimática de MnP do fungo <i>P.sanguineus</i>	40
Figura 17: Atividade enzimática de LiP do fungo FV-12.....	41
Figura 18: Atividade enzimática de LiP do fungo <i>P.sanguineus</i>	41
Figura 19: Modelo logarítmico e coeficiente de determinação (R^2) para a relação de atividade de lacase e produção de biomassa para <i>P.sanguineus</i>	42
Figura 20: Modelo exponencial e coeficiente de determinação (R^2) para a relação de atividade de ligninase (LiP) e produção de biomassa para <i>P.sanguineus</i>	44
Figura 21: Modelo linear e coeficiente de determinação (R^2) para a relação de atividade de manganês-peroxidase (MnP) e produção de biomassa para <i>P.sanguineus</i>	45
Figura 22: Redução da toxicidade do chorume pelo fungo <i>P. sanguineus</i>	47
Figura 23: Redução da toxicidade do chorume pelo fungo FV-12.....	48

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AM	Amazonas
CESP	Centro de Estudos Superiores de Parintins
CPRM	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LabEF	Laboratório de Estudos Fúngicos
MBT	Mestrado em Biotecnologia
pH	Potencial Heterogênico
PNSB	Plano Nacional de Saneamento Básico
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
UEA	Universidade do Estado do Amazonas

LISTA DE SÍMBOLOS

μM – micromolar	M – molar
Abs - absorbância	Mg – magnésio
BDA – batata dextrose ágar	ml – mililitro
BOD – Demanda Química de Oxigênio	mm – milímetro
C – carbono	mM – milimolar
Ca – cálcio	MnP – manganês peroxidase
CH₄ – metano	MnSO₄ – sulfato de manganês
CO₂ – dióxido de carbono	MOD – Matéria Orgânica Dissolvida
COX - Composto Orgânico Xenobiótico	Na – sódio
Fe – ferro	NaOH – hidróxido de sódio
H₂O – água	nm - nanômetro
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio	O – oxigênio atômico
HCl – ácido clorídrico	° C – grau Celsius
kDa – kilodalton	pH – potencial hidrogênico
kg – kilograma	rpm – rotação por minuto
km – quilômetro	SO₄ - íon sulfato
Lac – lacase	UC – unidades de cor
LiP – lignina peroxidase	

RESUMO

Existem diversas técnicas de tratamento para efluentes tóxicos, como o chorume, porém os fungos de podridão branca têm obtido notoriedade nas últimas décadas no que condiz a degradação de persistentes ambientais. Porém ainda pouco se conhece sobre os fungos da região amazônica e o seu comportamento em meio de cultivo suplementado com compostos tóxicos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial de fungos amazônicos na degradação de chorume in natura obtido do lixão municipal de Parintins/AM. As linhagens *Pycnoporus sanguineus* e FV-12 foram inoculados em meios de cultivo diferentes, o primeiro com glicose e diferentes concentrações de chorume (M1) e o segundo com a adição do indutor seringaldazine (M2). As linhagens apresentaram crescimento máximo em diferentes meios de cultivo, *P. sanguineus* obteve maior crescimento micelial em meio M2, enquanto FV-12 se destacou no meio M1. Porém outros fatores nutricionais e fisiológicos afetam o crescimento dos fungos em meio contendo compostos tóxicos. *P. sanguineus* produziu maior quantidade de biomassa à medida que aumentou-se a concentração de chorume (1%, 2%, 4%) no meio, todavia, comportamento contrário foi observado em tratamentos com o fungo FV-12. No que se refere à degradação de proteínas totais FV-12 apresentou maiores percentuais, porém menores em relação a inibição da toxicidade e descoloração, neste sentido o fungo *P. sanguineus* destacou-se, possivelmente pela formação de subprodutos mais tóxicos resultantes da ação do fungo FV-12. Este por sua vez, excretou maiores níveis de MnP e LiP no período de trinta dias, observando-se ação conjunta dessas enzimas, que podem ter influenciado na maior degradação de proteínas totais por FV-12. Em relação à enzima Lacase foram detectados pequenos níveis de atividade nos períodos testados para *P. sanguineus* e FV-12, possivelmente por influências de fatores como tempo de incubação e fonte de carbono. O fungo *P. sanguineus* apresentou maiores percentuais de degradação do chorume, sendo possível sua aplicação no tratamento do chorume.

Palavras chaves: Chorume, Fungos Amazônicos, Degradação, Enzimas Oxidativas, Parintins-/AM.

ABSTRACT

There are several techniques for treating toxic effluents as manure, but the white rot fungi have achieved notoriety in recent decades in fits of continuing environmental degradation. But little is known about the fungi of the Amazon region and their behavior in culture medium supplemented with toxic compounds. The aim of this study was to evaluate the potential of fungi in the degradation of Amazonian fresh manure obtained from the municipal landfill Parintins / AM. The strain *Pycnoporus sanguineus* and FV-12 and were inoculated into culture media different to the first glucose and different concentrations of slurry (M1) and second with the addition of inducer seringaldazine (M2). The strains grew up in different culture media, *P. sanguineus* obtained the highest mycelial growth in M2 medium, while FV-12 stood out in the middle of M1. However, other nutritional and physiological factors affecting the growth of fungi in a medium containing toxic compounds. *P. sanguineus* produced a larger amount of biomass is increased as the concentration of the slurry (1%, 2%, 4%) in the middle, however, the opposite behavior is observed in treatment with the fungus FV-12. With regard to the degradation of total protein FV-12 had higher percentages, but smaller in relation to inhibition of toxicity and discoloration, that effect *P. sanguineus* said fungus is possibly by the formation of byproducts resulting from the more toxic action of the fungus FV-12. This in turn, increased levels of excreted MnP and LiP within thirty days, noting combined action of these enzymes, which may have influenced the further degradation of total protein per FV-12. In relation to the enzyme laccase were detected low levels of activity in the periods tested for *P. sanguineus* and FV-12, possibly due to influences of factors such as incubation time and carbon source. The fungus *P. sanguineus* had the highest percentage of degradation of manure, and their possible application in the treatment of manure.

Keywords: Slurry, Fungi Amazon, Degradation, Oxidative Enzymes, Parintins/AM.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção industrial, aliado ao crescimento populacional são um dos fatores que dão origem a produção do lixo urbano e que tem como consequência a degradação do meio ambiente (MEIRA, 2009). Este cenário deu origem a áreas contaminadas por substâncias tóxicas, nocivas à saúde humana. (SOARES et al., 2008), o que tem contribuído para o aumento de impactos ambientais negativos.

De modo geral, o crescimento das áreas urbanas não levou em consideração a necessidade de adequação de locais específicos para depósito e tratamento dos resíduos sólidos. Atualmente no Brasil, por exemplo, estima-se que a produção anual de lixo esteja em torno de 44 milhões de toneladas (CEMPRE, 2010).

Por outro lado, a falta de saneamento básico mostra um cenário na destinação de resíduos sólidos urbanos, que são os lixões, local onde os resíduos são depositados diretamente no solo sem nenhuma técnica de engenharia para deposição e operação, ou qualquer preocupação com contaminação do solo e corpos d'água superficiais e subterrâneos, a proliferação de vetores e geração de gases (SILVEIRA, 2004).

Os resíduos sólidos podem poluir direta e indiretamente os recursos hídricos superficiais e subterrâneos. A poluição pode ser física, compreendendo o transporte de sedimentos, a formação de bancos de lodos, mudanças de cor, alteração de velocidade e química, quando ocorrem alterações das características de potabilidade das águas pelo lançamento de resíduos industriais perigosos, como metais pesados, organoclorados, óleos, etc. No caso das descargas de resíduos domésticos e industriais, há migrações de um líquido perigoso, denominado chorume, que no início do processo de decomposição é altamente tóxico, pois eleva a demanda química de oxigênio e aumenta a quantidade de metais pesados (LIMA, 2005; SANTOS et al., 2006; SANTANA E BARRONCAS, 2007).

O chorume é constituído basicamente por água rica em sais, metais pesados e matéria orgânica. As concentrações desses constituintes no lixiviado variam de acordo com a composição dos próprios resíduos sólidos depositados e com as condições ambientais como a precipitação, umidade, o oxigênio disponível, a temperatura e o pH do meio (COSTA, 2002). Dependendo das espécies químicas dos metais pesados, estes podem apresentar risco efetivo ou potencial à saúde humana, além de gerar impactos ambientais e sócio-econômicos. (AMARAL SOBRINHO et al., 1998).

Nos últimos anos diversas técnicas de tratamento para efluentes têm sido desenvolvidas no intuito de amenizar ou eliminar o contaminante do meio ambiente. Processos químicos, físicos e biológicos são empregados e desenvolvidos. Nesta perspectiva, pesquisas recentes apontam para o tratamento enzimático utilizando fungos.

A existência de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para a biorremediação, sendo os fungos de decomposição branca um dos grupos que tem obtido maior notoriedade em estudos relacionados a esta área (CHANDRA e RUSTGI, 1998). Este grupo de fungos são capazes de degradar o composto lignina presente na parede celular dos vegetais e têm obtido crescente êxito em pesquisas relacionadas à biodegradação de poluentes, pois são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares (CLEMENTE, 2002). Estes microrganismos secretam um “pool” complexo de enzimas lignolíticas para este propósito, e que podem ser produzidas em várias combinações. Esse complexo de enzimas lignolíticas é responsável pela degradação dos principais componentes do substrato em compostos de baixo peso molecular que podem ser utilizados para a nutrição do fungo (ERDEN et al., 2009).

O sistema enzimático ligninolítico produzido por fungos basidiomicetos se caracteriza por sua inespecificidade e é produzido em resposta às condições de cultivo, como exemplo, a presença de moléculas aromáticas. É cada vez mais evidente o fato de basidiomicetos serem de alta eficácia na degradação de compostos recalcitrantes devido ao sistema enzimático ligninolítico produzido (YAMANAKA e MACHADO, 2007).

As enzimas responsáveis pela degradação do polímero lignina são: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. O potencial de uso das enzimas lignolíticas na biotecnologia têm estimulado pesquisas nesse sentido (VIKINESWARY et al., 2006), e o entendimento sobre a síntese dessas enzimas na bioconversão de lignocelulósicos é importante para aprimorar processos biotecnológicos (SONGULASHVILI et al., 2007).

As enzimas secretadas por fungos vêm adquirindo destaque em função das suas diversas aplicabilidades em vários tipos de indústria, uma vez que existe a possibilidade de melhorar vários aspectos do produto final (CASTRO E SILVA; SILVA; CAVALCANTE, 2002). Entretanto, no caso específico das enzimas ligninases produzidas pelos basidiomicetos, há a necessidade de se intensificar as pesquisas em busca de microorganismos capazes de produzi-las em grande quantidade, em função do seu potencial de uso na biorremediação ambiental, indústria de celulose e papel, indústria de bebidas (MAYER e STAPLES, 2002), na degradação de compostos aromáticos recalcitrantes (MIELGO et al., 2001), produção de energia renovável (SETTE et al., 2008), na síntese de compostos medicinais (NICOTRA et al., 2004), na indústria de cosméticos (CUOTO e HERRERA, 2006), e em aplicações de nanotecnologia (KUNAMENI et al., 2008).

Neste sentido, este projeto objetivou a avaliar do perfil enzimático de dois fungos basidiomicetos da região do Baixo Amazonas, região de Parintins, com potencial para degradação de chorume obtido do lixão municipal de Parintins/AM.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Verificar o potencial dos fungos *P.sanguineos* e FV-12 na degradação do chorume *in natura* obtido do lixão do municipal de Parintins-Am.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar o crescimento dos fungos em teste de placa de Petri, em meio acrescido de chorume, com e sem indutor;
- Determinar a produção de biomassa fúngica em meio suplementado com diferentes concentrações de chorume;
- Determinar as atividades enzimáticas de lacase, lignina-peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) em períodos de 30, 60, 100 dias de incubação;
- Avaliação da degradação do chorume através dos testes de proteínas totais, cor e inibição da toxicidade após tratamento com fungos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MUNICÍPIO DE PARINTINS

3.1.1 Aspectos fisiográficos e geológicos

Parintins (Figuras 01) é um município amazonense localizado em uma ilha cercada pelas águas do Rio Amazonas e do Lago Parananema. Situado na porção leste do Estado do Amazonas, fronteira com o Pará, abrange uma superfície de 45 km² e conta com uma população estimada em 102.945 pessoas (IBGE, 2010). Localizada aproximadamente 350 km de Manaus e se destaca como o principal pólo turístico do interior do Estado.



Figura 1: Mapa demonstrando a localização da cidade de Parintins – AM.

Com relação à geologia, a cidade está assentada sobre rochas sedimentares, predominantemente arenosas, de idade cretácea, da Formação Alter do Chão. Possui uma crosta laterítica (pedra-jacaré), com pelo menos dois metros de espessura,

observada ao longo do barranco do rio Amazonas, notadamente nas imediações do “Curral do boi Garantido”. Esse nível laterítico se estende, em sub-superfícies, por boa parte da ilha, dificultando sobremaneira a infiltração natural, mas constituindo uma eventual defesa contra possíveis contaminações, como no terreno da lixeira municipal (MARMOS e AGUIAR, 2005).

A decomposição dos sedimentos da Formação Alter do Chão, localizados próximo a lixeira pública, em especial solos muito arenosos (areais), já sofreram exploração em anos passados para atender a demanda da construção civil nesta parte central da ilha, ocasionando rupturas ou falhas na porção laterítica que cobre o terreno na lixeira pública. De acordo com dados do CPRM – Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (MARMOS e AGUIAR, 2005), estas rupturas oferecem riscos de contaminação das águas subterrâneas dos poços tubulares próximos à lixeira, merecendo mais atenção do poder público municipal neste perímetro.

Nesta perspectiva os lixões urbanos são grandes fontes de contaminação das águas subterrâneas e podem continuar ativos por décadas. Ainda conforme Marmos e Aguiar, (2005) a zona não saturada de aquífero, que em Parintins varia anualmente de 4,5 a 9,5m de profundidade, representa a primeira e mais importante defesa natural contra a contaminação das águas subterrâneas. Como as argilas apresentam maior capacidade de troca iônica, quanto maior o teor de argila, maior será a capacidade de retenção, principalmente de cátions.

3.1.2 Lixeira pública de Parintins

O crescimento populacional do município de Parintins e o conseqüente acúmulo de resíduos sólidos urbanos (RSU) caracterizam um dos problemas ambientais mais preocupantes deste município. A lixeira pública localizada atrás do Centro de Estudos Superiores de Parintins-CESP/UEA tem nos últimos anos influenciado negativamente na qualidade de vida das populações próximas ao local, pelo acúmulo de lixo sem pré-tratamento, proliferação de vetores de doenças como cães, gatos, insetos, moscas, aves, entre outros, e somado a isto a poluição visual, mau cheiro e contaminação do ambiente.

O município de Parintins, interior do Estado do Amazonas, segue o modelo de destino de lixo da maioria das cidades brasileiras, onde os resíduos sólidos são

depositados em um lixão. Em cidades com população entre 100 a 200 mil habitantes, como é o caso desse interior amazônico, cada morador produz a quantidade de 0,5 kg de lixo por dia. Isso significa que em média são jogados na lixeira 60 toneladas de material que poderá contaminar o solo e principalmente as águas (RELEM, 2010).

A lixeira pública do município existe há pelo menos 25 anos. Ela foi construída em uma área considerada distante do centro urbano, mas com o crescimento demográfico ela acabou ficando no centro da cidade. Tudo começou em 1999, com a doação das terras onde funcionava o Colégio Municipal Agrícola para a Universidade Estadual do Amazonas. Desde 1997 os fundos do terreno já serviam de depósito do lixo produzido pela população da cidade de Parintins (RELEM 2010).

Uma década depois do acondicionamento de detritos nas terras da universidade é possível observar o resultado. “O chorume escoar pela rua Maçaranduba (que margeia a UEA) e passa pelos quintais das casas do bairro Dejará Vieira rumo ao Lago do Macurany”, que pode resultar em algo ainda pior, a contaminação dos aquíferos subterrâneos.

Neste sentido, o descarte indiscriminado dos resíduos sólidos urbanos, o número crescente de materiais e de substâncias identificadas como perigosas e a produção desses resíduos em quantidades cada vez maiores tem exigido soluções mais eficazes e investimentos maiores tanto por parte de seus geradores quanto da sociedade em geral.



Figura 02: Lixeira pública de Parintins/AM.

3.2 RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS

Com o passar dos tempos a capacidade de produzir bens de consumo tem influenciado na salubridade do ambiente. O aumento da produção de bens de consumo incrementa também a quantidade de rejeitos originados na extração das matérias-primas, fabricação, utilização e descarte de produtos (VALT, 2007).

A legislação brasileira (ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas) considera resíduos sólidos não somente materiais no estado físico “sólido”, mas todos os resíduos, exceto os emitidos para a atmosfera e os líquidos dentro dos padrões para serem lançados em sistema de esgoto ou em corpos d’ água. Os resíduos sólidos industriais são aqueles que se encontram no estado sólido ou semi-sólido e que tiveram origem em uma atividade industrial, incluindo-se aqui os produtos pós-consumo, como papel e vidro, os quais podem ser considerados resíduos industrializados de geração domiciliar.

Essa quantidade de resíduos sólidos dispostos inadequadamente, sem qualquer forma de manejo e tratamento, poluem o solo, alterando suas características físicas, químicas e biológicas, além de ser um problema de ordem estética e, mais ainda, uma séria ameaça à saúde humana. Cerca de 98% das cidades brasileiras adotam práticas obsoletas e inadequadas de dar destino final aos resíduos, com destaque para os lixões, aterros controlados, aterros sanitários e usinas de compostagem (IBGE, 2006).

Faz-se necessário reduzir a quantidade de lixo e dar a ele a correta destinação. O lixo é hoje o grande desafio da maioria das cidades, visto que os impactos socioambientais do lixo são cada vez mais preocupantes, com destaque para a contaminação das fontes de água usadas para abastecimento público e a degradação das paisagens e seus atributos naturais (SILVA e SILVA, 2009).

As áreas degradadas, ou lixões, em função de sua proximidade aos centros urbanos, podem se constituir em focos permanentes de vetores prejudiciais à saúde pública. Nessas áreas podem ser encontrados dois grandes grupos de vetores, os macrovetores: ratos, aves de rapina, moscas, cães, suínos, bovinos, inclusive o próprio homem, o catador de lixo, e microvetores: vermes, bactérias, fungos, vírus, sendo estes

últimos, os de maior importância epidemiológica, particularmente por sua invisibilidade, resistência, capacidade de reprodução e patogenicidade (LIMA, 2005).

3.3 FORMAS DE DESTINAÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS SÓLIDOS

No Brasil, a coleta do lixo cobre cerca de 70% da população das áreas urbanas e tem os lixões como um destino final, representado por cerca de 21,2% de todo resíduo produzido. Caracterizam-se por serem depósitos a céu aberto onde o lixo é apenas dispensado, sem nenhum tipo de tratamento. Por isso, há alta contaminação do solo e da região ao redor desses lixões, e contaminação do lençol freático pela percolação do chorume no solo (PIRATOBA MORALES et al., 2001; RODRIGUES e TAIOLI, 2001).

No Brasil, constitucionalmente, é de competência do poder público local o gerenciamento dos resíduos sólidos produzidos em suas cidades. Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - PNSB (2008), 61,2% das prestadoras dos serviços de manejo dos resíduos sólidos eram entidades vinculadas à administração direta do poder público; 34,5%, empresas privadas sob o regime de concessão pública ou terceirização; e 4,3%, entidades organizadas sob a forma de autarquias, empresas públicas, sociedades de economia mista e consórcios (IBGE, 2010).

Os serviços de manejo dos resíduos sólidos compreendem a coleta, a limpeza pública bem como a destinação final desses resíduos, e exercem um forte impacto no orçamento das administrações municipais, podendo atingir 20% dos gastos da municipalidade (IBGE, 2010).

De 1989 a 2008 observou-se um decréscimo na quantidade de lixões a céu aberto e aumento no número de aterros controlados (Tabela 1). De acordo com dados do IBGE (2010) em 1989 a quantidade de vazadouros a céu aberto era de 88, 2%, já em 2008 observa-se declínio para aproximadamente 50%.

Tabela1: Destino final dos resíduos sólidos, por unidades de destino dos resíduos.

Brasil 1989/2008			
Ano	Destino final dos resíduos sólidos, por unidades de destino dos resíduos (%)		
	Vazadouro a céu aberto	Aterro controlado	Aterro sanitário
1989	88,2	9,6	1,1
2000	72,3	22,3	17,3
2008	50,8	22,5	27,7

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2008.

A destinação final adequada dos resíduos sólidos urbanos constitui um dos maiores problemas da atualidade, uma vez que sua composição tem-se modificado ao longo dos últimos anos e a geração de lixo tem crescido surpreendentemente, sobretudo nos países em desenvolvimento. Esses dois fatores associados têm criado uma necessidade de se buscar novos conceitos e soluções, dentro de uma visão de sustentabilidade abrangente e comprometida com a proteção ambiental.

3.4 CHORUME

De acordo com o IBGE (2007) no Brasil, a população estimada era de 183.888.411 milhões de habitantes, que produziram em torno de 241.614 toneladas de resíduos sólidos urbanos por dia. A realidade das cidades brasileiras é de que 11,7% possuem aterros sanitários e mais de 88% depositam seus resíduos em lixões. A composição gravimétrica para esses resíduos é de aproximadamente 2,15% para trapos; 2,58% para madeira, borrachas e couros; 2,76% para vidros; 5,59% para diversos materiais; 12,06% para plásticos; 20,44% para papel e papelão; e 54,42% para material orgânico.

A elevada concentração de resíduos biodegradáveis gera um lixiviado com elevada concentração de matéria orgânica, o chorume, e quando esses resíduos são depositados no solo inadequadamente, as características do lixiviado causarão impactos ambientais muito maiores.

A composição físico-química do chorume é extremamente variável e é influenciada por fatores que vão desde as condições pluviométricas locais até tempo de disposição e características do próprio lixo. A presença de substâncias altamente solúveis no chorume pode fazer com que atinja o lençol freático mais superficial ou até mesmo a atingir as águas subterrâneas, comprometendo sua qualidade e potenciais usos (SISINO, 1996; BERTAZZOLI, 2002).

Embora não seja possível estabelecer uma composição fixa para o chorume. CHRISTENSEN et al. (2001) dividem os compostos presentes no chorume em quatro grandes categorias:

- **Matéria Orgânica Dissolvida (MOD):** correspondem a macromoléculas como ácidos húmicos e fúlvicos, lignina e ácidos graxos. Na fase ácida de decomposição quase a totalidade desses compostos têm massa molecular menor que 500 daltons, enquanto na fase metanogênica esse número sobe para 1000 daltons. A presença de substâncias húmicas e fúlvicas no chorume em grandes quantidades faz com que este apresente características bem definidas, como elevada cor (MOZA et al., 1995) tensoatividade (RAUEM et al., 2002), atividade fotoquímica (MOZA et al., 1995; AGUER e RICHARD, 1996), alta capacidade de tamponamento (CHRISTENSEN et al., 2001), as quais afetam o comportamento das substâncias químicas no ambiente e modificam processos redox, solubilizando determinados metais (CALACE et al., 2001) e variando a toxicidade (SILVA, 2002).
- **Compostos Orgânicos Xenobióticos (COX):** constituem-se de hidrocarbonetos aromáticos, compostos halogenados, compostos fenólicos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, além de outras substâncias caracteristicamente tóxicas, presentes em concentrações muito menores que os compostos húmicos e fúlvicos, porém com toxicidade muitas vezes maior que os outros componentes presentes no chorume.
- **Macrocomponentes Inorgânicos:** caracterizam-se por apresentar substâncias inorgânicas essenciais em grandes quantidades, como sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), cloretos (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}) e amônio

(NH₄⁺). A elevada concentração desses compostos está associada à sua alta solubilidade em água, variando consideravelmente sua concentração ao longo das várias fases de decomposição do chorume.

- **Metais Potencialmente Tóxicos:** estes compostos em geral estão presentes em pequenas concentrações, as quais ainda diminuem ao longo dos anos. A formação de sulfeto na fase metanogênica faz com que grande quantidade desses metais seja precipitada. Uma pequena parcela presente no chorume está na forma complexada, e outro fator importante é a presença de colóides. Metais pesados têm alta afinidade com colóides e por isso são adsorvidos na matéria orgânica dissolvida presentes no chorume.

Existem diversas outras substâncias nocivas à saúde, porém a toxicidade do chorume não pode ser associada a uma substância isoladamente e nem à soma de todas as substâncias presentes, mas, sim, ao efeito sinérgico entre as diferentes substâncias existentes (FREIRE et al., 2000).

3.5 REMEDIAÇÃO DE LIXÕES MUNICIPAIS E TRATAMENTO DO CHORUME

A remediação de áreas degradadas passou a ser uma exigência legal e um compromisso social que precisa ser executado. Existem inúmeras tecnologias para remediação de solos de áreas degradadas, envolvendo tanto processos químicos quanto físicos, ambos tecnicamente difíceis e de custo elevado (CHAVES, 2008).

Na verdade, é a continuidade das práticas inadequadas que levam à degradação de grandes áreas situadas nas proximidades dos centros urbanos, requerendo, para reversão do quadro crítico e controle do processo de poluição instaurado, elevado dispêndio de recursos. Neste contexto, salienta-se a importância da tecnologia de biorremediação de lixões, a qual é vista como uma eficiente ferramenta capaz de auxiliar na busca de solução para questão da poluição do solo por deposição inadequada de detritos.

A contaminação ambiental ocorre, principalmente, devido aos resíduos orgânicos e inorgânicos e produtos químicos tóxicos presentes no efluente residual, que é produzido quando água e outros líquidos percolam resíduos sólidos, depositados em aterros sanitários e/ou aterros industriais (BARBOSA et al., 1999), comumente chamado de chorume. Estes líquidos percolados, ou chorume, que apresentam alto poder de poluição e toxicidade necessitam de um tratamento adequado antes do seu descarte em um corpo receptor, segundo os padrões de lançamento descritos pela legislação reguladora vigente (FERREIRA et al., 2001).

Em diversos estudos referentes à tratabilidade dos líquidos percolados, os pesquisadores têm explorado uma série de diferentes opções de tratamento, incluindo métodos de tratamento químico, físico-químico e biológico (ENZMINGER et al., 1987; FORGIE, 1988; FERREIRA et al., 2001).

Tratamentos biológicos são os processos mais utilizados, não só para o tratamento dos líquidos percolados, como por exemplo, o chorume, mas também para outros efluentes em geral. Esses processos permitem tratar efluentes transformando compostos tóxicos em CO_2 e H_2O ou CH_4 e CO_2 , com custos relativamente baixos. Esses processos de tratamento são baseados na nutrição dos microorganismos com substrato poluente podendo ser divididos em aeróbios e anaeróbios (PACHECO, 2004).

De maneira geral, não há tecnologia que, atuando isoladamente, consiga tratar resíduos tão recalcitrantes e com elevada carga orgânica como o chorume. Os processos convencionais são baseados em sistemas cujas preocupações fundamentais estão associadas principalmente ao custo desse tratamento.

Os principais métodos de tratamento para o chorume podem ser divididos em físicos, químicos e biológicos (enzimáticos) (PACHECO, 2004), com destaque nos últimos anos para os processos enzimáticos.

3.6 PROCESSOS ENZIMÁTICOS

Os processos enzimáticos correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento biológico de efluentes. Dentro deste contexto, cabe às enzimas ligninolíticas (lignina peroxidase e manganês peroxidase) um papel de destaque, em

função da sua capacidade para degradar um grande número de substâncias tóxicas e recalcitrantes (FREIRE et al., 2000).

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Em função dessa capacidade têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais destaca-se a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados - solo, águas superficiais e subterrâneas (OLIVEIRA, 2004).

Fungos da classe dos basidiomicetos degradadores de lignina, são eficientes na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (KAMIDA et al., 2005). As enzimas encontradas, nestes organismos são em grande parte lacases, MnP (Manganês peroxidases) e LiP (Lignina peroxidases) (MAYER e STAPLES, 2002).

3.7 FUNGOS

Os fungos são organismos amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais que necessitam de carboidratos para o seu desenvolvimento (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios, unicelulares ou pluricelulares. Possuem pigmentos responsáveis pelas cores variadas que apresentam, mas nenhum capaz de absorver energia para síntese de carboidratos a partir do dióxido de carbono. Assim, são heterotróficos, mas se nutrem por absorção, podendo viver como saprófitos, parasitas ou simbiontes com outros organismos (LACAZ et al. 2002; PUTZKE e PUTZKE, 2004).

A parede celular de alguns fungos contém celulose, como alguns fungos aquáticos inferiores, mas a maioria deles possui a parede celular com quitina (BLACK, 2002). A constituição da parede celular dos fungos é uma das características que levou a

sua separação em um reino a parte entre os seres vivos. O material de reserva dos fungos é o glicogênio (LAURENSE, 2005). Por causa da parede celular rígida, os fungos não são capazes de absorver micro-organismos ou outras partículas, e para tal os fungos secretam enzimas através do micélio sobre a fonte de alimento e absorvem pequenas moléculas que são disponíveis (RAVEN, 2001).

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, fármacos, produção de enzimas de interesse industrial, produção de bebidas fermentadas, como o vinho e a cerveja, fermentação de queijos e outros alimentos, realização de controle biológico, controle de pragas em plantas, produção de etanol, etc. (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004).

Na natureza os fungos da classe dos basidiomicetos são os maiores degradadores da madeira. Estes são classificados de acordo com as diferenças de padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em conta a característica macroscópica da degradação. Desta forma podem ser divididos em fungos de degradação ou podridão branca, podridão parda e podridão mole. Os fungos de podridão branca degradam três componentes principais da madeira, a saber, 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 actinomicetes realizam a degradação da madeira dura em ecossistemas florestais (SOARES, 1998), conforme Quadro 1.

Quadro 1. Alguns organismos degradadores de lignina.

Organismo	Filo	Degradação da lignina	Ambiente	Alguns gêneros
Fungos da podridão branca	Basidiomicota (Ascomicota)	Mineralização da lignina Deslignificação seletiva ou não seletiva	Principalmente madeira dura	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>trametes</i>
Fungos da podridão parda	Basidiomicota	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungos da podridão mole	Ascomicota ou Fungos Anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos com umidade elevada, serrapilheira	<i>Chaetomium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>
Bactérias	Actinomicetes ou mixobactérias	Limitada degradação da lignina	Sapwood, madeira saturada de água, madeira em estágio avançado de decomposição, serapilheira	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

Fonte: Tuomela et al. (2000).

Existem inúmeras espécies de fungos da podridão branca, sendo a maioria destas Basidiomycotina, seguidas por algumas Ascomycotina (ERIKSSON et al., 1990). Porém os basidiomicetos são os únicos microrganismos conhecidos com a capacidade de metabolizar completamente a molécula de lignina a gás carbônico e água, sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (KIRK e FARREL, 1987).

Recentemente, tem havido um crescente interesse em estudar as enzimas ligninolíticas de uma ampla variedade de fungos de podridão branca, não só do ponto de vista da biologia comparativa, mas também com a expectativa de encontrar melhores

sistemas de degradação da lignina para uso em várias aplicações biotecnológicas (ROCA et al., 2009).

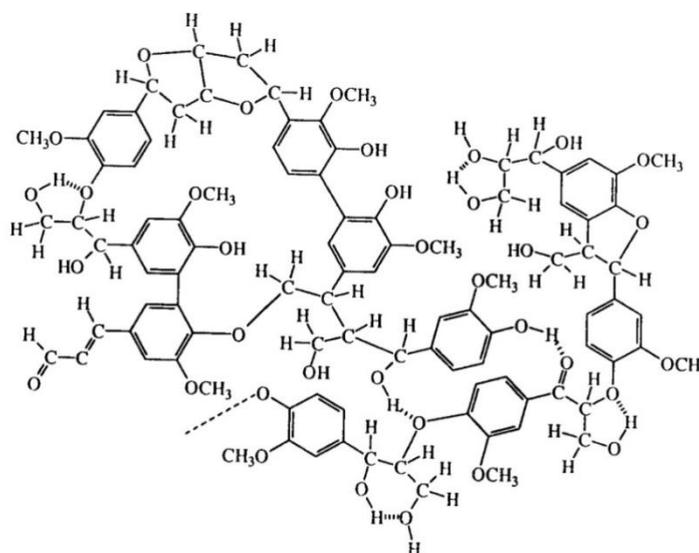


Figura 03: Estrutura proposta para lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis* (PILÓ-VELOSO et al., 1993).

Desta maneira os fungos podem ser empregados em uma gama de aplicações sejam elas ambientais, industriais, farmacêuticas ou biotecnológicas, devido ao seu potencial enzimático altamente diversificado.

3.7.1 O Potencial Fúngico da Região Amazônica

Em nenhum lugar do mundo existem mais espécies de animais e de plantas do que na Amazônia, tanto em termos de espécies habitando a região como um todo (diversidade gama), como coexistindo em um mesmo ponto (diversidade alfa). Entretanto, apesar da Amazônia ser a região de maior biodiversidade do planeta, apenas uma fração dessa biodiversidade é conhecida (BIODIVERSIDADE DA AMAZÔNIA, 2012).

Estimou-se a magnitude da diversidade fúngica nos ecossistemas mundiais em 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 1991). Porém May (1991) avaliou que um novo sítio visitado poderia render cerca de 95% de novas espécies para a ciência. Neste sentido, apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos ainda permanece num nível incipiente, onde estima-se

que somente cerca de 5% das espécies é conhecida, e que muito pouco é conhecido sobre a sua biologia (CASTRO e SILVA; SILVA; CAVALCANTE, 2002).

No que diz respeito ao potencial biotecnológico dos fungos amazônicos, notadamente da região do Baixo Amazonas, as pesquisas ainda são modestas diante da magnitude que a biodiversidade amazônica apresenta, principalmente àquelas relacionadas ao potencial enzimático e suas aplicações nos mais diversos setores da indústria biotecnológica. Com destaque para o grupo dos fungos lignolíticos que nos últimos anos tem apresentado resultados significantes na biorremediação de áreas contaminadas por compostos altamente resistentes à degradação como efluentes da indústria têxtil, papel, derivados do petróleo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pesticidas, chorume e etc.

Os produtos finais da degradação do substrato pelas enzimas fúngicas podem ser utilizados como fertilizantes em plantações, suplementos para ração de animais ou ainda serem reciclados e misturados a outros materiais orgânicos para cobertura de plantações (MACIEL et al., 2010). Os fungos são também utilizados como fonte de alimentação por possuírem até cinco vezes mais proteínas que as carnes de bovinos e suínos (RIBEIRO DA SILVA e COELHO, 2006).

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos baseia-se nos seus produtos metabólicos como: fermentação, enzimas e polissacarídeos, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além dessas utilizações estas enzimas são utilizadas na biodegradação de compostos xenobióticos, como, por exemplo, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (MATHEUS e OKINO, 1998; MACIEL et al., 2010).

Os fungos, em particular os Basidiomicetes, são conhecidos, seja pelas suas propriedades nutricionais e medicinais, seja pela sua toxidez. É uma subclasse de grande importância econômica por abranger fungos parasitas, fungos degradadores da madeira e os fungos comestíveis que sustentam a atividade industrial (LACAZ et al, 1970).



Figura 04: Carpóforo do fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*.

Nos últimos anos além do emprego em larga escala de fungos na fabricação de fármacos, aromas, aminoácidos e vitaminas também têm avançado o número de pesquisas utilizando fungos para processos de recuperação ambiental, principalmente aqueles causados pela contaminação gerada por efluentes da indústria têxtil, papel e celulose, petróleo, e esgotos sanitários. Neste sentido, têm-se utilizado como estratégia alternativa a biorremediação para contornar o problema da contaminação.

O objetivo da biorremediação, quando usada como técnica de tratamento em áreas contaminadas, é induzir ou acelerar os processos biológicos naturais de reciclagem de compostos de interesse, incluindo compostos orgânicos ou inorgânicos. Assim, o desafio principal é utilizar a capacidade intrínseca dos microrganismos de degradar matéria orgânica para degradar compostos orgânicos tóxicos, tanto de origem natural como compostos sintéticos (DIAS, 2000).

Na última década, têm sido identificadas e caracterizadas diferentes espécies de fungos filamentosos com potencial para uso nos processos de biorremediação. São capazes de crescer sob condições ambientais de estresse como meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microrganismos (ATAGANA, 2006).

A existência de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para a biorremediação (CHANDRA e RUSTGI, 1998), pois são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares (CLEMENTE, 2002).

3.7.2 Enzimas

As enzimas são as peças chaves da biotecnologia e da bioindústria. São elas que, na engenharia microbológica catalisam as reações metabólicas acionadas e asseguram a sua regulação. Da mesma forma, elas levaram a engenharia genética a realizar modificações no equipamento enzimático de alguns microrganismos com vistas a torná-los aptos à biossíntese de metabólitos de interesse (RICHARD, 1985).

Muitas enzimas microbianas são utilizadas no tratamento de efluentes e resíduos industriais, para resolver problemas específicos. Assim, pode-se citar a remoção por precipitação ou transformação de compostos tóxicos ou recalcitrantes, e a alteração das características de um determinado efluente, como o aumento da degradabilidade ou diminuição da toxicidade, permitindo o tratamento posterior por processos biológicos convencionais ou a formação de materiais em produtos de valor agregado (KARAM e NICELL, 1997).

Os fungos, por exemplo, possuem grande capacidade em degradar parcialmente, e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes a degradação, através da ação de enzimas específicas produzidas por estes microrganismos como lignina peroxidase (LiP) e mangânes peroxidases (MnP), ou ainda lacases (Lac) (TABELA 2).

Tabela 2: Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca.

Enzima	No EC	Reações catalisadas	Fungo
Lacase	1.10.3.2	Oxidação de fenol	<i>Trametes versicolor</i>
Lignina peroxidase	1.11.1.14	Polimerização de fenol	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Manganês peroxidase	1.11.1.13	Oxidação de fenol; Oxidação Mn ²⁺ a Mn ³⁺ +	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Celobiose-quinona oxireductase	1.1.5.1	Redução de quinona; Degradação de celobiose	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Aril álcool oxidase	1.1.3.7	Produção de H ₂ O ₂	<i>Pleurotus sabor-caju</i>
Glioxal oxidase	1.2.3.5	Produção de H ₂ O ₂	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Manganês independente de peroxidase	1.11.1.7	Atividade em substratos aromáticos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Versátil peroxidase	1.11.1.16	Oxida Mn ²⁺ ; Potencial alto redox em componentes aromáticos	<i>Pleurotus sp.</i>
Celobiose desidrogenase	1.1.99.18	Degradação de lignina; Une o sistema hidrolítico e oxidativo; Dispõe manganês (MnII) para MnP através da redução do precipitado da oxidação do manganês (MnO ₂)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Fonte: Maciel et al., 2010

3.7.2.1 Lignina-Peroxidase (LiP)

No ano de 1983, dois grupos relataram a descoberta de enzima extracelular degradadora de lignina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. A enzima, primeiramente chamada ligninase, é uma glicoproteína que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (ESPOSITO E AZEVEDO, 2004).

Lignina peroxidase tem a capacidade de degradar diversos compostos fenólicos e não fenólicos, como também álcoois benzílicos e dimetilas, e provoca rearranjos intramoleculares. Avalia-se que o melhor pH para a remoção de fenóis desta enzima seja 4, sendo controlado preferencialmente pelo H_2O_2 (SOARES, 2000).

No processo de degradação da lignina, LiP é inicialmente oxidada pelo H_2O_2 e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H_2O) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática“ onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos (KIRK e FARREL, 1987).

3.7.2.2 Manganês-Peroxidase (MnP)

Esta enzima é uma glicoproteína que atua com isoenzimas, oxidando diretamente Mn (II) a Mn (III), que atua como espécie ativa nos processos de oxidação catalítica; este é quelado por ácidos orgânicos como o oxalato, formando um complexo estável de alto potencial de oxidorredução, porém a MnP oxida somente estruturas fenólicas. A MnP assemelha-se à LiP pela presença do grupo heme, também dependente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade. Sua produção se dá juntamente com a LiP durante o metabolismo secundário, porém a regulação é realizada pela concentração de carbono e nitrogênio do meio (REYS, 2003).

A manganês peroxidase (MnP) foi descoberta em *Phanerochaete chrysosporium* junto à LiP. Essa enzima é muito semelhante à LiP, é extracelular, glicosidada, massa molar de 45-47 KDa e possui um grupo prostético heme. Além do peróxido de hidrogênio também é dependente do íon Mn^{+2} , α -acetoácidos como lactato estabilizam sua atividade oxidativa. Elas se apresentam em formas múltiplas e podem ser encontradas em numerosos fungos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A atuação de MnP durante a peroxidação lipídica está envolvida na degradação de compostos xenobióticos recalcitrantes. Assim, a avaliação da capacidade de culturas fúngicas para promover a peroxidação lipídica é de grande importância. O estímulo da

peroxidação de ácidos graxos insaturados com concomitante produção de radicais lipídicos é reconhecido como atividade pró-oxidante (KAPICH et al., 2005).

3.7.2.3 Lacase (Lac)

Lacases (EC 1.10.3.3) é um grupo de enzimas multi-cobre que catalisam a oxidação de elétrons de componentes fenólicos com concomitante redução de oxigênio à água. Fungos são os principais produtores de lacase, especialmente Basidiomicetos (GOCHEV e KRASTANOV, 2007).

Tipicamente o sítio ativo da lacase inclui quatro átomos de Cu em três grupos. Os átomos de Cu diferem um do outro nos sinais do elétron paramagnético ressonante (GIANFREDA et al.; 1999). Lacases fúngicas são principalmente induzíveis, extracelulares, glicoproteínas monoméricas com conteúdo de carboidrato de 8% a 50% (HEINZKILL et al., 1996).

Vários parâmetros de cultivo como limitação de carbono, fonte de nitrogênio, e concentração de microelementos influenciam na produção de lacase (GOCHEV e KRASTANOV, 2007). O uso de excessivas concentrações de glicose como fonte de carbono em cultivo de linhagens fúngicas para produção de lacase tem um efeito inibitório na produção. Um modo simples, mas efetivo para superar este problema é o uso de celulose como fonte de carbono para o cultivo (EGGERT et al., 1996).

O interesse científico por lacases fúngicas é influenciado pelo largo espectro de aplicações da lacase. Lacases fúngicas encontram aplicações dentro da indústria de comida, polpa e indústria de papel, indústria têxtil, química sintética, cosméticos, biorremediação de solos, biodegradação de xenobióticos e remoção de disruptores endócrinos (CUOTO e HERRERA, 2006). Estas enzimas apresentam grande capacidade em despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos, como os corantes presentes nos efluentes devido a sua falta de especificidade ao substrato (FORGACS et al., 2004; NOVOTNY et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E ISOLAMENTO DE FUNGOS

Doze (12) carpóforos de fungos basidiomicetos foram coletados na região da comunidade do Limão, especificamente na propriedade particular Fazendinha, interior do município de Parintins-AM. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel poroso e transportados para o Laboratório de Estudos Fúngicos – LabEF, do Centro de Estudos Superiores de Parintins-CESP, onde foi realizado o isolamento das culturas axênicas.

Para efetuar a inoculação do material fúngico foi utilizada a metodologia proposta por Bettucci e Guerrero (1971). Utilizou-se um estilete no qual foi retirado de cada carpóforo fúngico fragmentos de 5mm das extremidades, que passou por um procedimento de assepsia através de lavagens sucessivas em solução de álcool 70% (1 ou 2 minutos), hipoclorito de sódio a 3% (1 ou 2 minutos) e água destilada (2 minutos).

O álcool 70% quebra a tensão superficial do material, o hipoclorito de sódio mata os microorganismos como bactérias e fungos, a água destilada retira o excesso das soluções e evita a oxidação. Em seguida as amostras foram colocadas em papel filtro para retirada do excesso de água.

Após assepsia os fragmentos foram inoculados em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) e mantidas em temperatura de 30° C em estufa BOD por 5 dias. Três repicagens sucessivas foram realizadas para a aquisição de cultura pura para utilização nos testes biológicos posteriores.

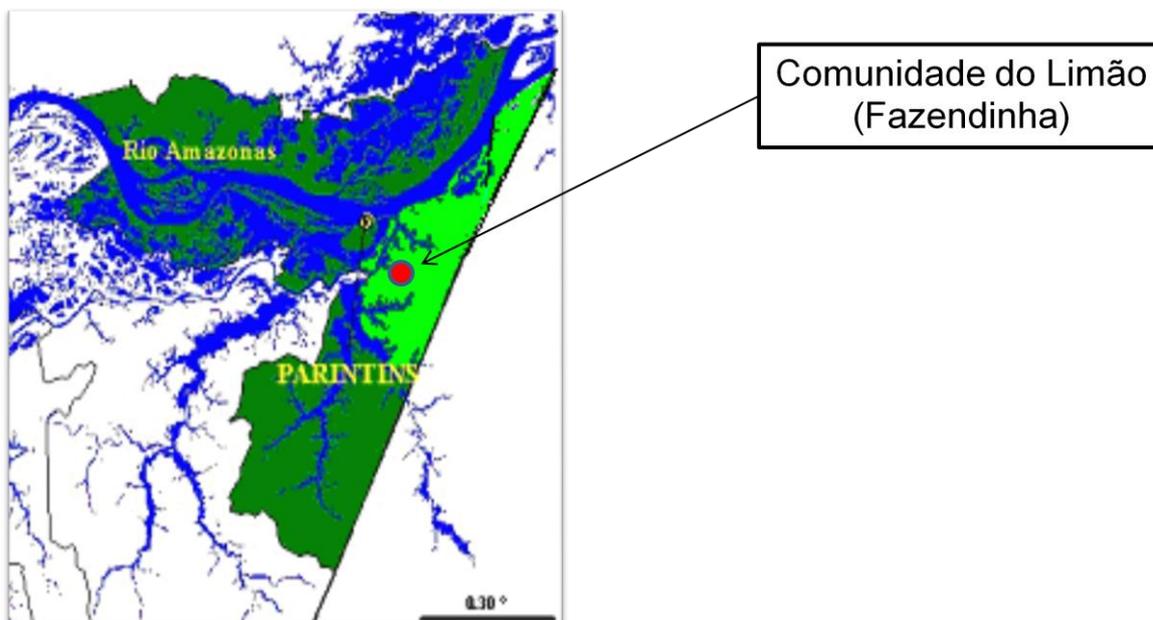


Figura 05: Local de coleta dos carpóforos fúngicos.

4.2 CAPACIDADE ENZIMÁTICA OXIDATIVA

A capacidade de distinguir isolados capazes de produzir fenoxidase foi determinada pelo teste de Bavendamm. Para isso discos de micélio com 5mm de diâmetro foram retirados das bordas de colônias com 5 dias de crescimento e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e ácido tânico (5gL^{-1}). Para o preparo do meio utilizou-se 500 ml do meio de cultura BDA com 50 mL a menos de água destilada, que foi esterilizada separadamente em autoclave. Após esterilização e resfriada a água acrescentou-se em condições assépticas 2,5g de ácido tânico e agitou-se até a formação da mistura homogênea. Após esse procedimento adicionou-se esta solução ao meio de cultura BDA levemente morno. Os fragmentos fúngicos previamente miceliados foram inoculados no centro da placa e incubados em estufa BOD a 30°C para observação dos aspectos de indicação de fenoxidases. Após 24 horas de incubação, realizou-se a avaliação visual quanto à formação de um halo marrom considerado como reação positiva para produção de fenoxidases. Os fungos que apresentaram reação positiva em menor tempo foram utilizados para teste biológicos com chorume.

4.3 COLETA E TRATAMENTO DO CHORUME

O chorume foi coletado na lixeira pública do município de Parintins em frascos âmbar de 1000 mL previamente autoclavados a 1,5 atm. O chorume *in natura* foi

trazido para o Laboratório de Estudos Fúngicos do Centro de Estudos Superiores de Parintins-CESP onde foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos, esterilizado em autoclave a 121 °C e posteriormente oxigenado por um período de 2 horas. Após este processo o chorume foi utilizado como fonte de carbono para o crescimento fúngico em estado de fermentação semi-sólida e líquida.

4.4 CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM CHORUME

O teste de crescimento fúngico foi realizado em placa de Petri em meios de cultivo acrescidos das concentrações: 1%, 1,5%, 2% de chorume. O primeiro meio foi composto de 15g de ágar, 1g de glicose, as diferentes concentrações de chorume para 1000 mL de água destilada (M1). O segundo meio de cultivo foi composto de 15g de ágar, 1 grama de glicose, as diferentes concentrações de chorume, 2 mL da solução estoque de 5mg de seringaldazine/ 1mL de etanol (M2). O controle foi composto apenas por ágar. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Fragmentos fúngicos com aproximadamente 5mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e transferias em condições assépticas para o centro das placas de Petri acrescidos dos meios M1 e M2. As placas foram incubadas em estufa BOD a 30 °C por um período de 5 dias.

4.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

A avaliação foi realizada através do avanço da fronteira micelial em teste de placa de Petri, mensurada com régua milimetrada a cada 24 horas, sendo as medidas tomadas em duas direções perpendiculares, por um período de 5 dias ou até que atingisse todo o diâmetro da placa.

4.6 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.6.1 Fermentação líquida

Foram retiradas fragmentos fúngicos de 5mm de diâmetro das bordas das placas e transferidos para 100ml de meio de cultivo composto por água destilada estéril e

chorume nas concentrações de 1%, 2% e 4% (ml de chorume/ 100 ml de água) em erlenmeyer com capacidade de 250 ml, os quais posteriormente foram incubadas em estufa BOD em condição estacionária à temperatura de 30°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.2 Biomassa

A biomassa foi determinada em tempos de 30, 60 e 100 dias de crescimento. A determinação foi realizada após filtração do meio em papel filtro Whatman nº 1 previamente pesado. O caldo filtrado foi centrifugado a 1800 rpm por 5 minutos e seu sobrenadante utilizado para determinação enzimática. A massa micelial resultante foi lavada com 50 mL de água destilada. Posteriormente, esse papel filtro com massa fúngica foi colocado em estufa elétrica até secagem completa e o peso constante.

A biomassa foi avaliada em porcentagem pela diferença de peso do papel filtro antes e depois da filtração através da seguinte fórmula:

$$M(Y) = \frac{(Pf - Pi)}{Pi} \times 100$$

Pi

onde,

Pi= peso do papel filtro antes da filtração

Pf= peso do papel filtro após secagem.

4.6.3 Atividade Enzimática

Foram determinadas as atividades das seguintes enzimas oxidativas na solução enzimática bruta obtida: lacase, manganês-peroxidase (Mn-P) e lignina-peroxidase (Li-P), nas diferentes concentrações de chorume testadas nos períodos de 30, 60 e 100 dias. Para determinação das atividades das enzimas foi utilizado o aparelho espectrofotômetro de absorvância para leitura das amostras coletadas.

4.6.3.1 Atividade de Lacase

O substrato seringaldazina foi utilizado para determinação da enzima lacase, utilizando-se o método proposto por Szklarz et al. (1989), que baseia-se na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina para sua forma de quinona. A mistura reacional foi composta de 50 μL da amostra filtrada; 0,95 mL tampão tartarato de sódio pH 4,5; 0,1mL seringaldazina (produção estoque de 5mg/ 1mL de etanol) e 0,1mL de água destilada, sendo monitorado o aumento da absorvância em 525 nm durante 60 segundos, utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de produto (μmol) liberada em um minuto por mL de amostra ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

4.6.3.2 Atividade de Manganês – Peroxidase (MnP)

A atividade de MnP na solução enzimática bruta foi determinada a 30 °C numa mistura reacional composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio a 0,05 M (pH 4,5), 0,1mL de MnSO_4 a 0,4M e 0,1mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 μM) e a absorvância medida a 270 nm. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $8,1 \times 10^3 / \text{mol} / \text{cm}$ (GLEN et al., 1986; AITKEN e IRVINE, 1990).

4.6.3.3 Atividade de Lignina – Peroxidase (LiP)

A atividade de Li-P na solução enzimática bruta foi determinada a 30 °C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão tartarato dissódico a 0,05 M (pH 3,0), ou tampão fitalato ácido de potássico – HCl a 0,05 M (pH 3,0), 0,1 mL de solução álcool veratrílico a 40Mm e 0,1 mL de solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorvância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido à 310 nm. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3 / \text{mol} / \text{cm}$. (TIEN e KIRK, 1988).

4.6.3.4 Cálculo da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi calculada da seguinte maneira: (LEONIWICZ e GRZYWNOWICZ, 1981).

$$U/L = \frac{10^6 \Delta E}{\varepsilon \cdot \Delta T}$$

onde:

ε = coeficiente de extinção de cada substrato, conforme dados da literatura;

ΔE = aumento da absorbância no comprimento de onda específico;

Δt = tempo de reação em minutos.

4.7 TESTE DE TOXICIDADE DO CHORUME

Foram utilizados bulbos de *Allium cepa* (cebola) adquiridos comercialmente, sendo que em todos os bioensaios, foram utilizadas cebolas da mesma procedência. Os bulbos foram inicialmente preparados e colocados em água destilada durante 24 horas a temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após este período, os bulbos foram colocados nas soluções-teste por um período de 5 dias (RANK *et al.* , 1993). O teste foi realizado antes e após 30 dias de tratamento com os fungos.



Figura 6: Teste de toxicidade do chorume com raízes de cebolas.

As concentrações de choroume para cada tratamento foram de 1%, 2%, 4% acompanhados de seus controles negativos (água autoclavada). O comprimento das raízes foi utilizado como índice de toxicidade. Para cada bulbo, o comprimento das raízes foi medido com auxílio de uma régua e, então estimado o comprimento médio. Cada tratamento foi comparado com o controle negativo e avaliado o percentual de toxicidade do choroume através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Comprimento da raiz do teste} - \text{Comprimento da raiz do controle}}{\text{Comprimento da raiz do teste}} \times 100$$

4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas totais foram determinadas com reagente Biureto modificado, utilizando-se o caldo enzimático filtrado e centrifugado a 2400 rpm durante 20 minutos. O kit para determinação de proteínas continha reagente de biureto (solução concentrada), hidróxido de sódio 6M e solução padrão (solução de albumina bovina). A leitura foi realizada a 550nm e a avaliação da quantidade de proteínas presentes avaliadas através da fórmula:

$$\text{Proteínas totais (g/L)} = \frac{\text{abs. teste}}{\text{abs. padrão}} \times 4$$

Para avaliação do percentual de degradação de proteínas totais presentes no meio de cultura utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Valor do controle} - \text{Valor do teste}}{\text{Valor do controle}} \times 100$$

4.9 ENSAIO ANALÍTICO DE COR

O ensaio analítico de cor foi realizado com amostras filtradas em papel filtro e centrifugadas a 2400 rpm por 20 minutos. A redução da cor da cultura com choroume foi monitorada pela queda da absorvância em 465 nm. A conversão em L/C foi feita pela equação $UC = (500 \times Abs_{465}) / 0,132$ onde 0,132 corresponde à absorvância de 500 L/C

de uma solução padrão de cobalto de platina (DAVIS & BURNS, 1990). As análises foram realizadas antes e após 30 dias de tratamento com os fungos.

Para avaliação do percentual de degradação da cor do chorume utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Valor do controle} - \text{Valor do teste}}{\text{Valor do controle}} \times 100$$

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 para obter os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a inferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para contraste das médias o Teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DE FUNGOS

Dos doze fungos testados, codificados de acordo com a localidade onde foram coletados, oito apresentaram-se positivos para enzimas oxidativas, através do aparecimento do halo marrom ao redor da colônia na presença do ácido tânico (Tabela 3). Os fungos *Pycnoporus sanguineus* e FV-12 foram selecionados para os testes.

Tabela 3: Fungos produtores de fenoloxidasas em períodos de 24, 48 e 72 horas.

nº	Fungos	24h	48h	72h
1	FBL	+		
2	FI-02		+	
3	FV-12	+		
4	FI-11			+
5	<i>P.sanguineos</i>	+		
6	FV-06	-	-	-
7	FI-09	-	-	-
8	FI-03		+	
9	CV-50	-	-	-
10	CV-24	-	-	-
11	CV-25			+
12	CV-29			+

*FI: Fungo de região de igapó

*FV: Fungo de região de várzea

*FBL: Fungo basidiomiceto encontrado em lago da região de Parintins

*CV: Carpóforos de várzea encontrados próximos às margens do rio Amazonas (próximo à comunidade do Limão/Parintins).

Os fungos *P.sanguineus* e FV-12 destacaram-se pelas características de crescimento rápido e detecção de fenoloxidasas em menor tempo de cultivo na presença do ácido tânico.

5.2 INFLUÊNCIA DO INDUTOR NO CRESCIMENTO MICELIAL

De modo geral, a presença da seringaldazina influenciou no crescimento micelial dos fungos. O meio de cultura acrescido de seringaldazina foi onde ocorreu o maior valor médio de crescimento para *P. sanguineus* em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o fungo codificado como FV-12 apresentou maior valor médio de crescimento na concentração de 2% de chorume em meio sem acréscimo desse indutor enzimático.

O padrão diário de crescimento foi similar para ambos os fungos em meio com ou sem acréscimo de indutor, sendo que para *P. sanguineus* o crescimento na presença de seringaldazina foi mais rápido, preenchendo a placa em apenas três dias de incubação, enquanto que no meio sem o indutor o preenchimento da placa ocorreu com oitos dias de incubação (Figuras 7 e 8).

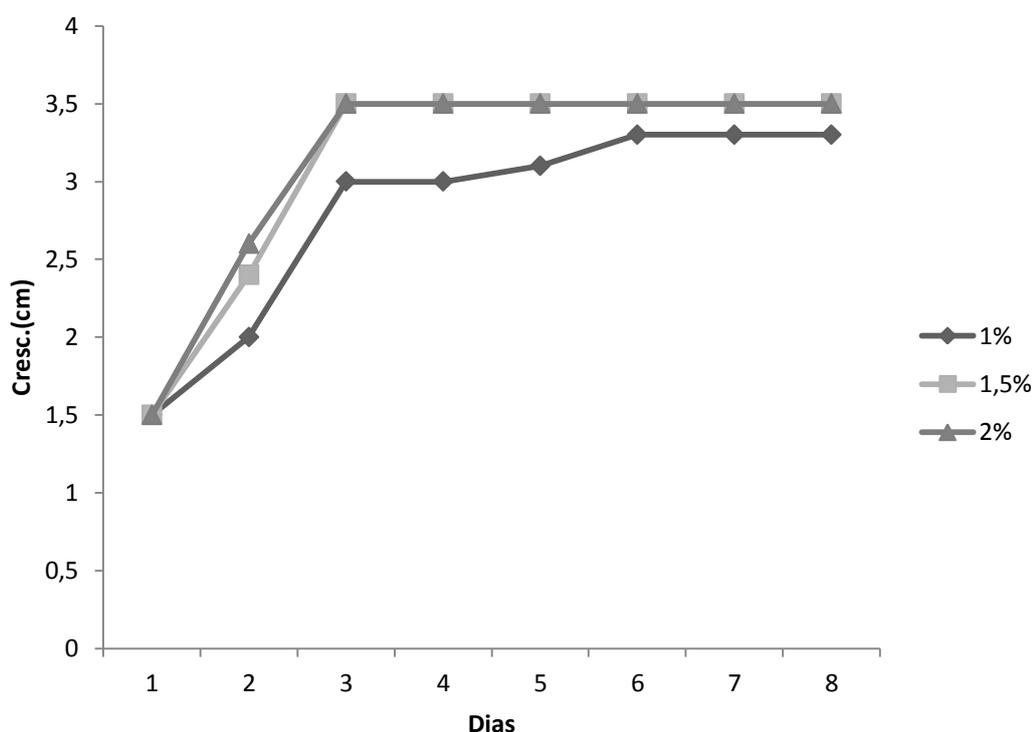


Figura 7: Crescimento do fungo *P. sanguineus* em meio com acréscimo do indutor seringaldazine (M2).

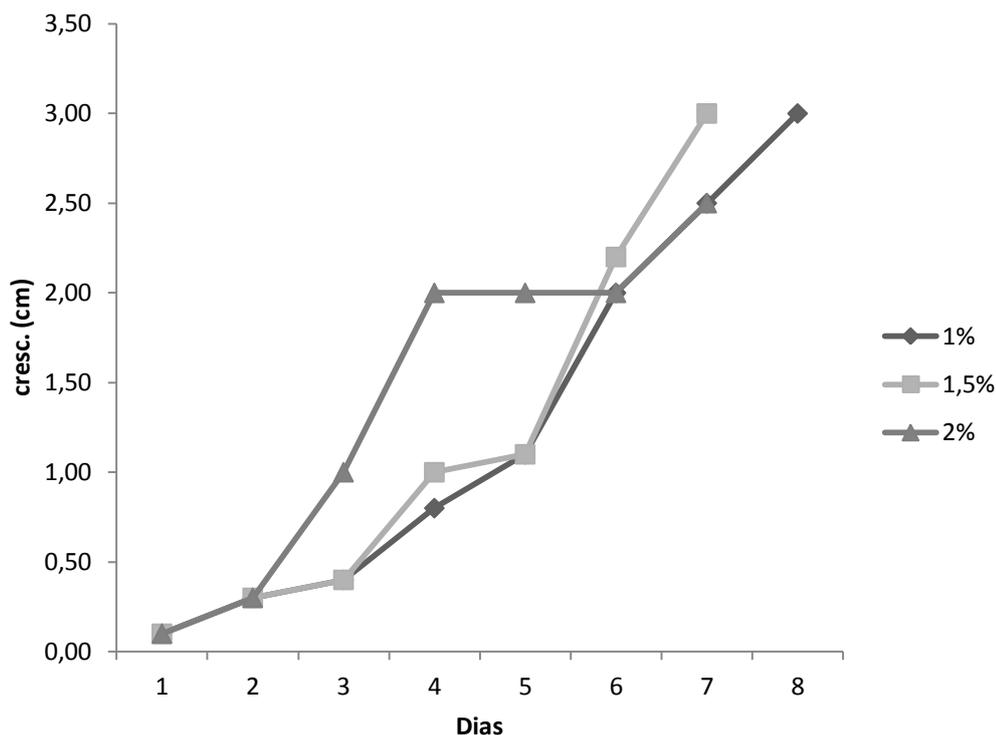


Figura 8: Crescimento do fungo *P.sanguineus* em meio sem acréscimo do indutor seringaldazine (M1).

Após 24 horas de incubação no meio acrescido de seringaldazina e concentração de 1,5% de chorume, o avanço da fronteira micelial foi 93,3 % maior do que no meio sem acréscimo do indutor (Figura 8), na mesma concentração. Em três dias de incubação o *P.sanguineus* alcançou crescimento 86,6 %, 88,5% e 71,4% maior nas concentrações 1%, 1,5% e 2% respectivamente, no meio com indutor (Figura 7) comparado com aquele sem a presença deste, e no mesmo tempo de incubação.

Assim como ocorreu para *P. sanguineus* o padrão de crescimento diário do fungo FV-12 seguiu a tendência de crescimento linear, sendo que a presença do indutor no meio fez com que o crescimento fosse acelerado nos primeiros dias de incubação (Figura 09), porém no meio sem a presença do indutor o preenchimento da placa foi mais rápido, alcançando seu crescimento máximo aos 6 dias de incubação. Na concentração de 2% de chorume sem a presença de seringaldazina o fungo FV-12 apresentou o maior crescimento micelial, destacando-se pelo maior raio micelial apresentado quando comparado a M1(Figura 10).

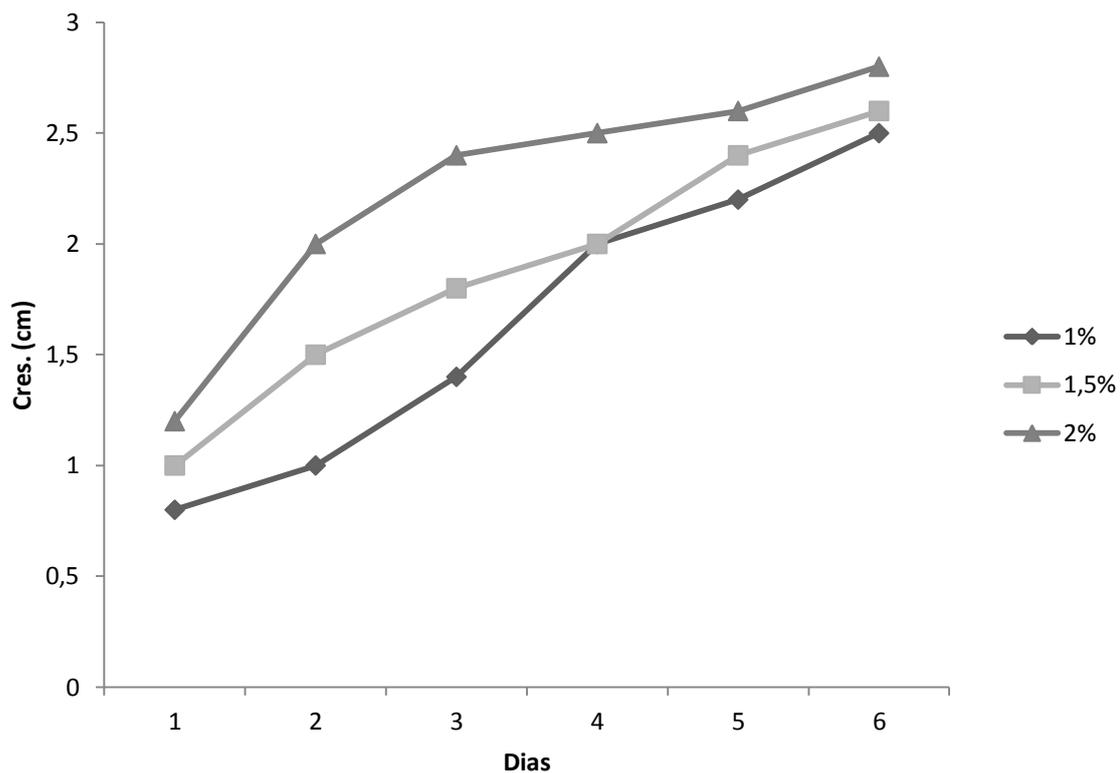


Figura 09: Crescimento do fungo FV-12 em meio com acréscimo do indutor seringaldazine (M2).

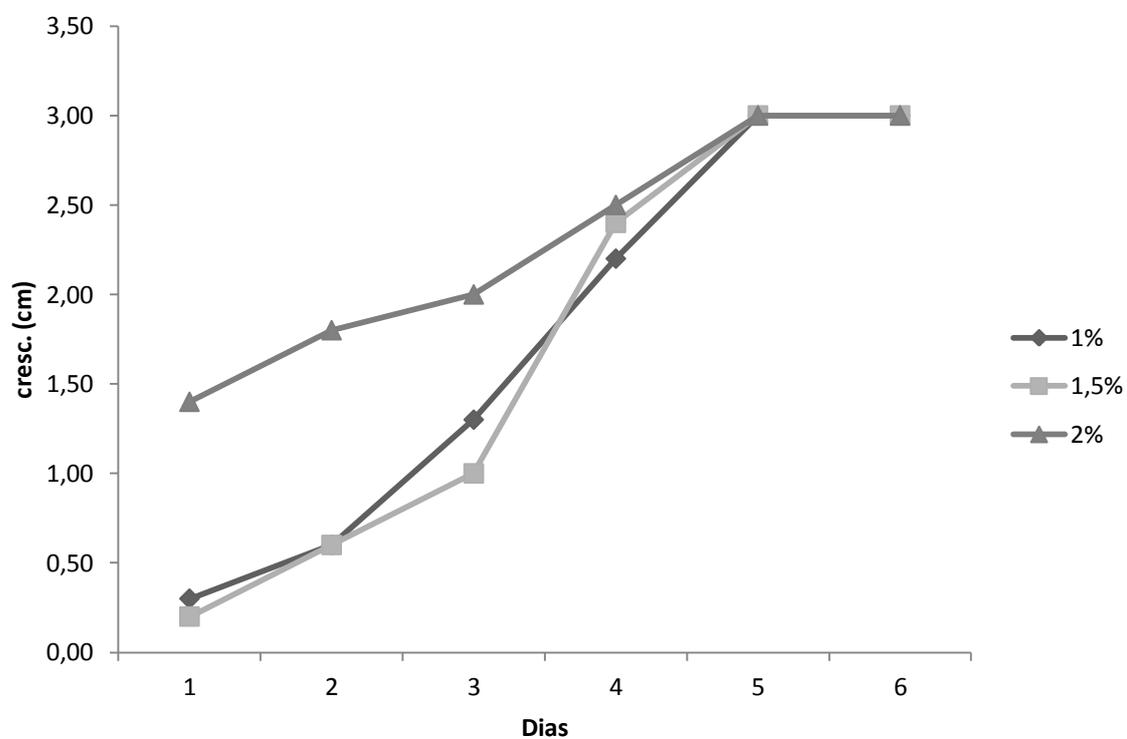


Figura 10: Crescimento do fungo FV-12 em meio sem acréscimo do indutor seringaldazine (M1).

Após 24 horas de incubação o crescimento do fungo FV-12 no meio contendo seringaldazina mostrou-se 80% maior na concentração de 1,5% em relação ao crescimento sem a presença desse indutor.

5.3 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

O percentual de biomassa produzido em meio com diferentes concentrações de chorume ficaram próximos para os dois fungos testados (Tabela 4). Para o fungo FV-12, entretanto, observou-se uma tendência negativa na relação biomassa/concentração, onde à medida que a concentração aumenta a biomassa diminui. Relação inversa foi encontrada para o *P. sanguineus* onde com o aumento da concentração de chorume há um aumento do valor absoluto da biomassa.

Teste ANOVA para os tratamentos evidenciou que ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$) não há diferença estatística na biomassa produzida pelos fungos nas diferentes concentrações testadas. A exceção ocorreu na concentração de 4%, onde teste de Tukey evidenciou diferença estatística na produção de biomassa entre os fungos. Nesta concentração *P. sanguineus* produziu 2,1 vezes mais biomassa do que o fungo FV-12. (Tabela 4).

Tabela 4: Biomassa fúngica produzida por *P. sanguineus* e FV-12 em cem dias de incubação.

Tratamentos	BIOMASSA (%)		
	Concentrações (%)		
	1	2	4
<i>P.sanguineus</i>	3.68	4.53	4.77 a,b
FV-12	3.41	2.85	2.27 a

Médias seguidas de letras diferentes na direção vertical indicam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O padrão diário de produção de biomassa mostrou-se crescente em função da concentração de chorume para *P. sanguineus* nos períodos de trinta e sessenta dias (Figura 11); por outro lado, o fungo FV-12 apresentou padrão contrário, quanto maior

foi a concentração menor produção de biomassa nos mesmos períodos de teste. (Figura 12).

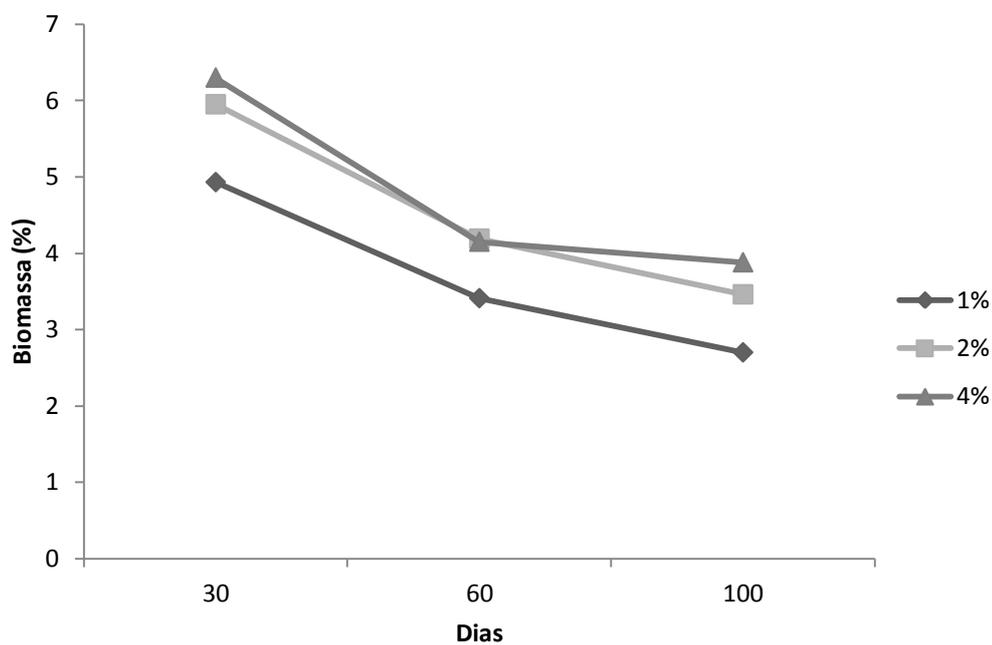


Figura 11: Biomassa produzida por *P.sanguineus* em meio acrescido com chorume.

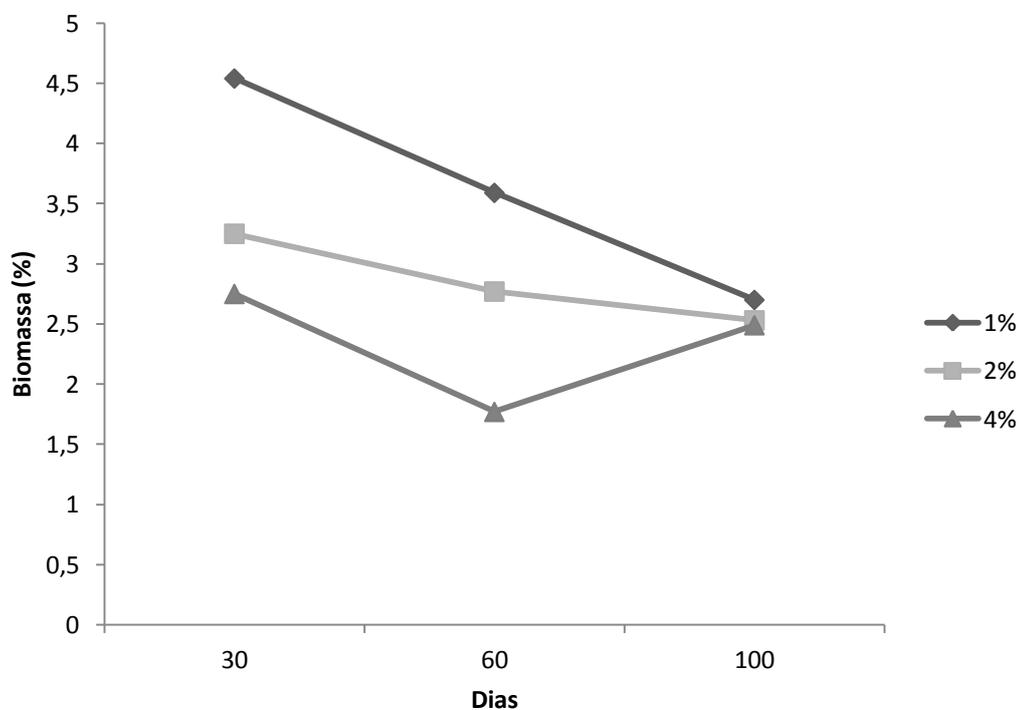


Figura 12: Biomassa produzida por FV-12 em meio acrescido com chorume.

5.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Valores médios da atividade enzimática mostraram-se crescente com o aumento da concentração de chorume para ambos os fungos. Em termos de valores absolutos médios o fungo FV-12 apresentou maior atividade enzimática (Tabela 5).

Em relação à lacase FV-12 apresentou um percentual 51% maior de atividade em relação ao *P. sanguineus* na concentração de 1%, diminuindo esse percentual nas demais concentrações consideradas. Por outro lado, para MnP esse percentual de atividade do fungo FV-12, também em relação a *P. sanguineus*, foi maior 35% na concentração de 4% de chorume. Para LiP o fungo FV-12 apresentou um percentual de 24% de atividade na concentração de 2%, em relação ao *P. sanguineus*.

Tabela 5: Atividade de lacase, MnP e LiP em diferentes concentrações de chorume por um período de incubação de 100 dias.

Fungos	Enzima	Concentrações (%)		
		1	2	4
<i>P.sanguineus</i>	Lacase	3,72	3,97	4,73
	MnP	33,31	31,62	33,46
	LiP	50,55	52,50	54,16
FV-12	Lacase	5,63	5,79	5,89
	MnP	38,43	40,95	45,33
	LiP	61,22	65,17	62,64

Na maior concentração (4%) o fungo FV-12 mostrou atividade enzimática de lacase 24,5 % maior do que *P. sanguineus*. Este mostrou valor médio crescente de atividade LiP a medida que aumentou-se a concentração de chorume no meio de

incubação, porém o valor médio da atividade de MnP na concentração 2% foi 5% menor em relação a concentração 1% de chorume (Tabela 5).

Por outro lado, o fungo FV-12 apresentou essa tendência crescente para as atividades de lacase e MnP, enquanto que para LiP o valor médio dessa atividade para a concentração de 4% foi ligeiramente menor do que na concentração de 2%.

O padrão da atividade de lacase do FV-12 apresentou pico de atividade em trinta dias de incubação nas concentrações de 1% e 2%, enquanto que na concentração de 4% a máxima atividade foi observada em cem dias de incubação (Figura 13). O mesmo padrão foi observado para *P. sanguineus* para essa atividade enzimática. (Figura 14).

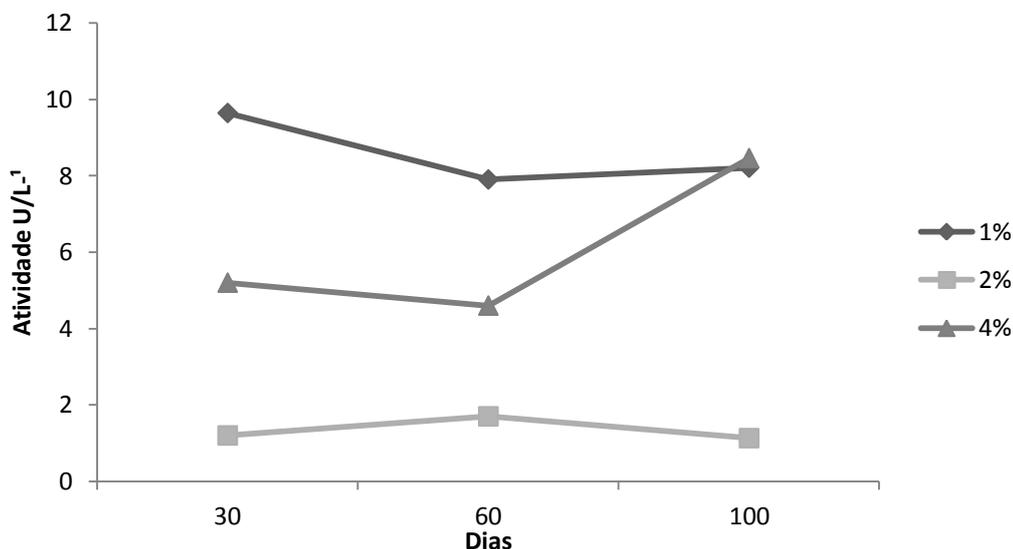


Figura 13: Atividade enzimática de lacase do fungo FV-12.

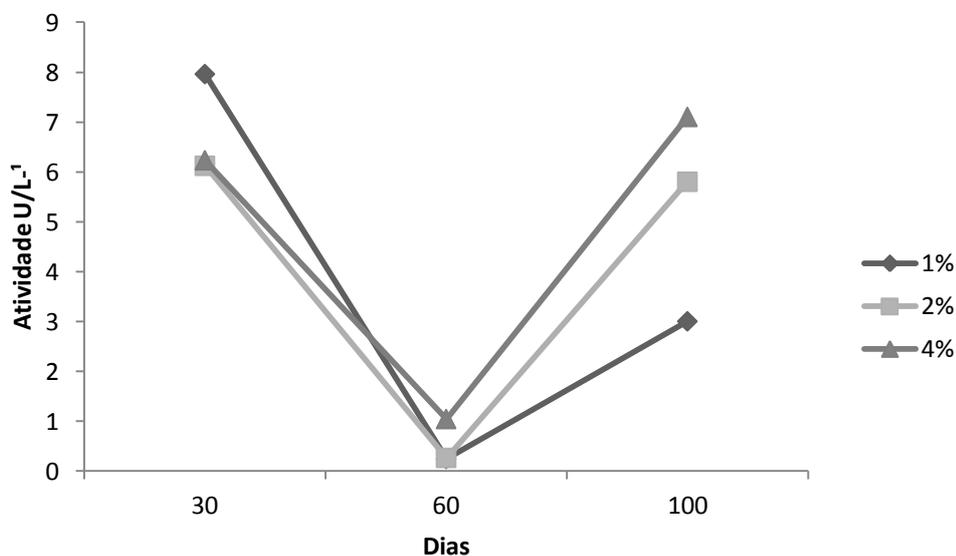


Figura 14: Atividade enzimática de lacase do fungo *P. sanguineus*.

Para MnP o fungo FV-12 apresentou pico de atividade em trinta dias nas concentrações de 2% e 4%, enquanto que na concentração de 1% uma máxima atividade enzimática foi observada em cem dias de incubação (Figura 15). Por outro lado, a atividade de MnP para *P. sanguineus* apresentou pico de atividade em cem dias de incubação para todas as concentrações (Figura 16).

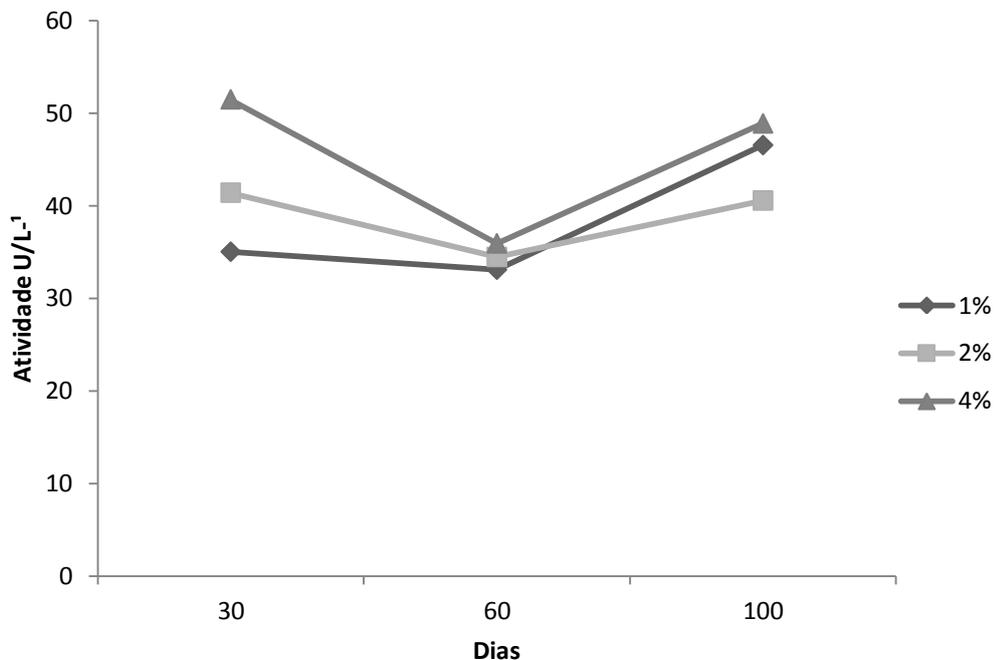


Figura 15: Atividade enzimática de MnP do fungo FV-12.

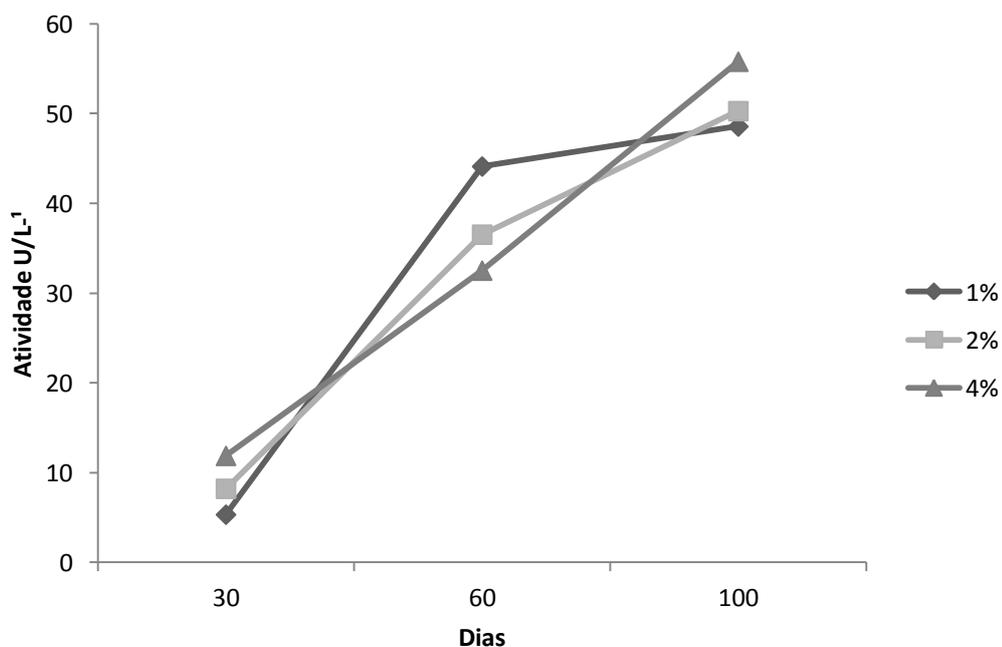


Figura 16: Atividade enzimática de MnP do fungo *P.sanguineus*.

A LiP excretada pelo fungo FV-12 apresentou pico de atividade em sessenta dias de incubação para as concentrações de 1% e 4%, enquanto que para 2% a máxima atividade foi observada em cem dias (Figura 17). Para *P. sanguineus*, assim como ocorreu para MnP, a atividade máxima de LiP também aconteceu em cem dias de incubação (Figura 18).

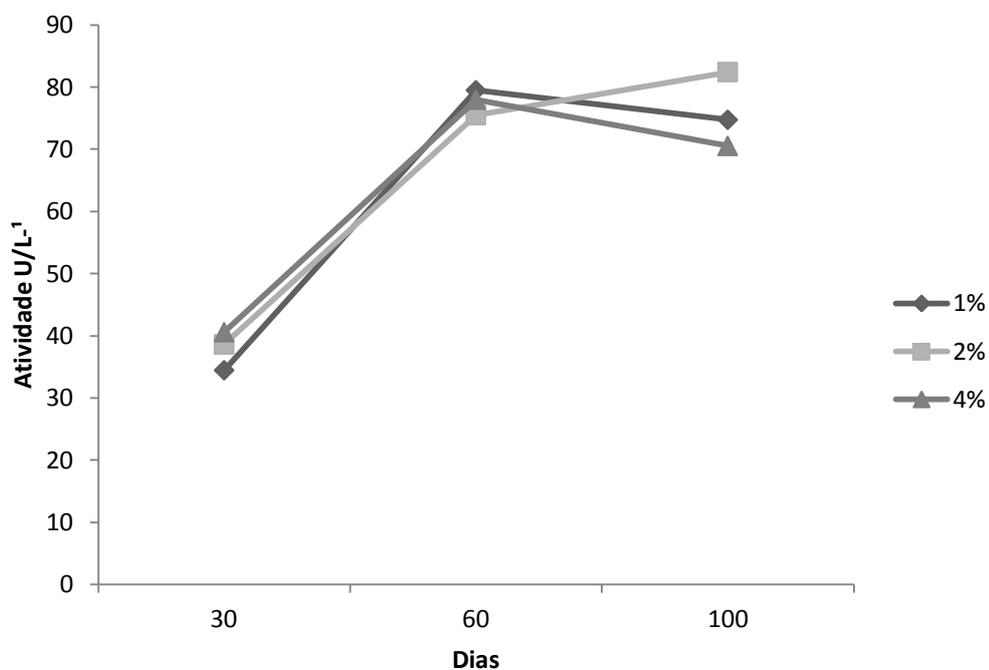


Figura 17: Atividade enzimática de LiP do fungo FV-12.

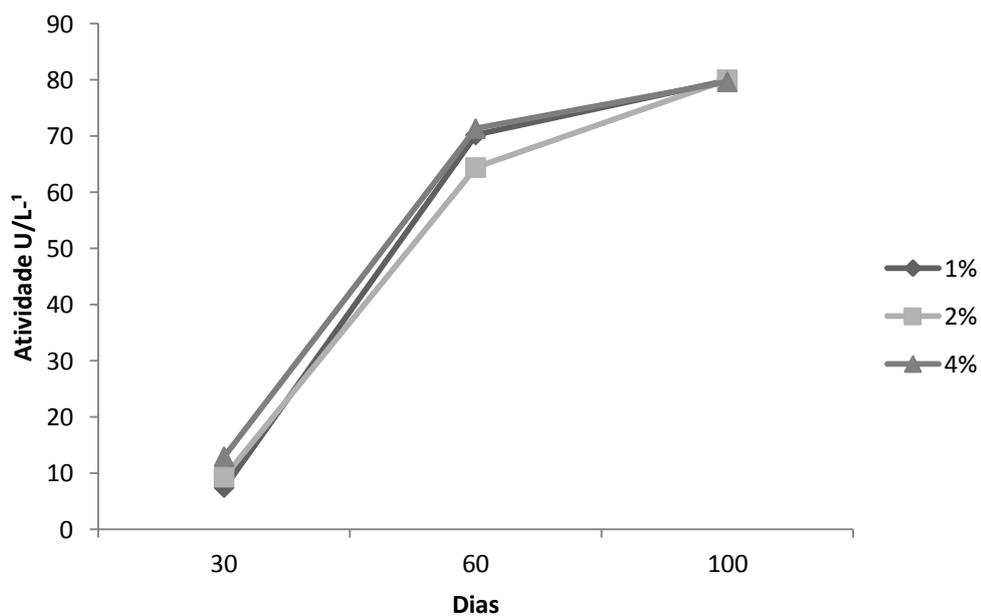


Figura 18: Atividade enzimática de LiP do fungo *P.sanguineus*.

5.5 RELAÇÃO ATIVIDADE ENZIMÁTICA *versus* BIOMASSA

Com o intuito de verificar a existência de dependência da variável “atividade enzimática” em relação à biomassa produzida foi realizado teste de regressão com ajustamento de curvas para distribuição linear, exponencial, logarítmica e geométrica verificando-se através do coeficiente de determinação, qual a curva que mais se ajustava aos dados coletados (Tabela 6).

A relação da atividade de lacase com a biomassa em *P. sanguineus* foi melhor ajustada para distribuição logarítmica com um índice de determinação (R^2) igual a 44,5% mostrando uma relação fraca entre essas variáveis, e significando que esse percentual corresponde a influência da biomassa nessa atividade enzimática (Figura 19). O restante do percentual deve-se a influência de outros fatores preditores que podem influenciar nessa atividade.

Para o fungo FV-12 essa relação mostrou-se muito fraca com coeficientes de determinação (R^2) entre 8,9% e 17,5% (Tabela 6).

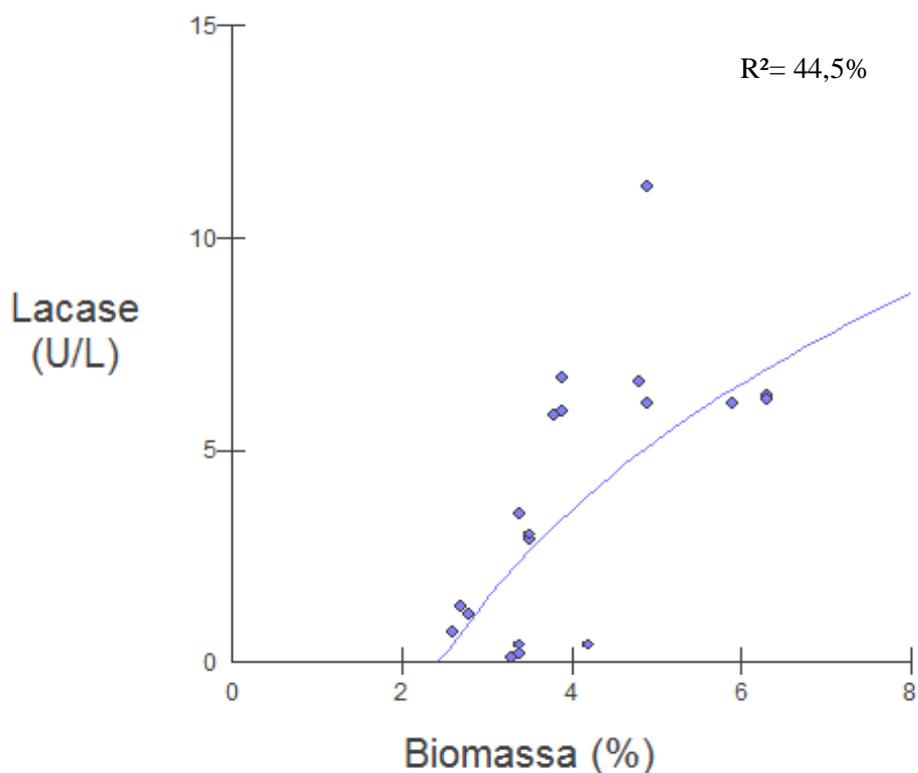


Figura 19: Modelo logarítmico e coeficiente de determinação (R^2) para a relação de atividade de lacase e produção de biomassa para *P.sanguineus*.

Tabela 6: Modelo de regressão para diferentes distribuições.

Lac				
	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
<i>P. sanguineus</i>	$y = 3,2783 - 1,6575x$ R ² = 42,84%	$y = 0,1225 * e^{0,7665 x}$ R ² = 33,5%	$y = 6,6124 + 7,3574 * \ln(x)$ R ² = 44,5%	$y = 0,059 * x^{2,8617}$ R ² = 31,3%
FV-12	$y = 0,5161 - 1,6609x$ R ² = 17,2%	$y = 1,5361 * e^{0,73264 x}$ R ² = 8,9%	$y = 0,3978 + 4,8087 * \ln(x)$ R ² = 17,5%	$y = 1,3965 * x^{1,0154}$ R ² = 10,5%
LiP				
<i>P. sanguineus</i>	$y = 127,516 - 16,7348x$ R ² = 40,7%	$y = 626,2845 * e^{-0,6576x}$ R ² = 41,4%	$y = 158,214 - 72,405 * \ln(x)$ R ² = 39,9%	$y = 2006,9314 * x^{-2,808}$ R ² = 39,8%
FV-12	$y = 104,8166 - 14,436x$ R ² = 38,17%	$y = 130,971 * e^{-0,271x}$ R ² = 40,80%	$y = 130,954 - 39,95 * \ln(x)$ R ² = 35,56%	$y = 128,171 * x^{-0,7418}$ R ² = 37,48%
MnP				
<i>P. sanguineus</i>	$y = 80,7435 - 11,6882x$ R ² = 59,2%	$y = 230,6100 * e^{-0,5350x}$ R ² = 56,8%	$y = 99,7854 - 48,7562 * \ln(x)$ R ² = 54,31%	$y = 590,3777 * x^{-2,2395}$ R ² = 54,0%
FV-12	$y = 49,2623 - 2,7303x$ R ² = 10,9%	$y = 49,683 * e^{-0,0677x}$ R ² = 11,91%	$y = 47,3234 - 5,8207 * \ln(x)$ R ² = 6,03%	$y = 47,4621 * x^{-0,1465}$ R ² = 6,8%

Considerando-se os valores dos coeficientes de determinação (R^2), consta-se que a regressão exponencial é a curva que mais se ajusta aos dados obtidos para ligninase (LiP) para ambos os fungos, apresentando, entretanto, uma relação fraca entre as variáveis (Tabela 6). Assim, a estimativa da LiP pela produção de biomassa deve obedecer o modelo exponencial, $Y = 626,2845 * e^{(-0,6576x)}$ e $Y = 130,971 * e^{(-0,271 x)}$ para *P. sanguineus* e FV12 respectivamente.

Coefficiente de determinação do fungo *P. sanguineus* foi ligeiramente maior ($R^2 = 41,4\%$) (Figura 20).

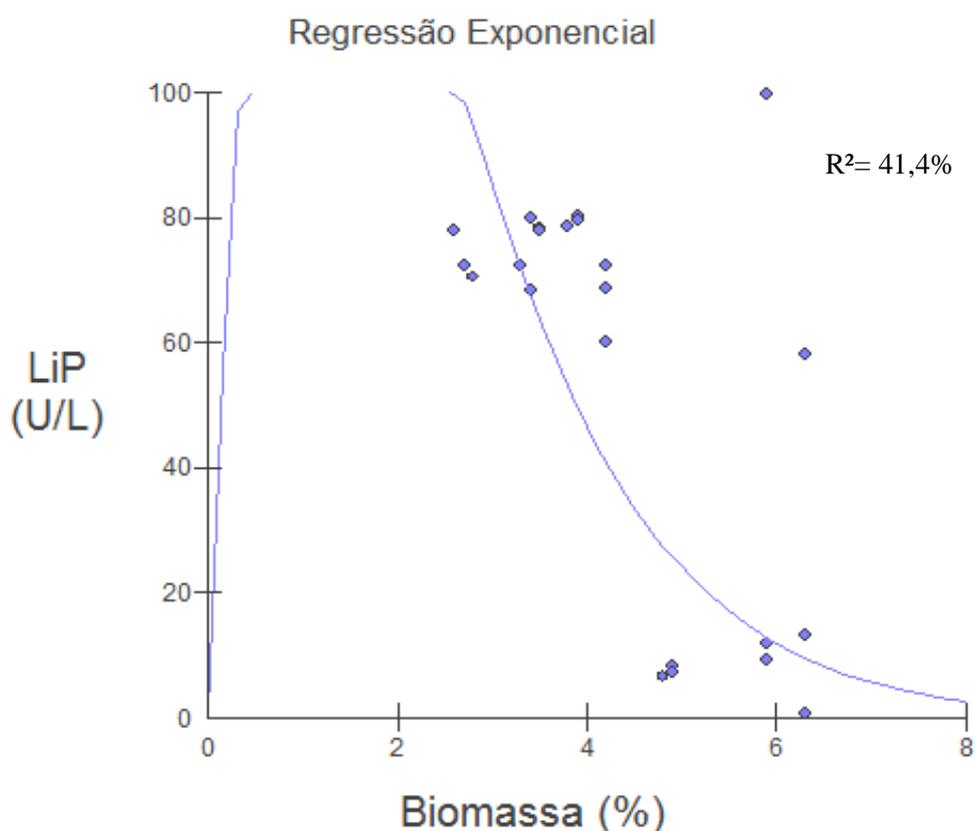


Figura 20: Modelo exponencial e coeficiente de determinação (R^2) para a relação de atividade de ligninase (LiP) e produção de biomassa para *P. sanguineus*.

Por outro lado, para a variável atividade de MnP de *P. sanguineus* constata-se, pelo coeficiente de determinação (R^2), que 59,2% é explicada pela variável “biomassa”, devendo outros fatores atuar como preditores do aumento da atividade enzimática (Figura 21).

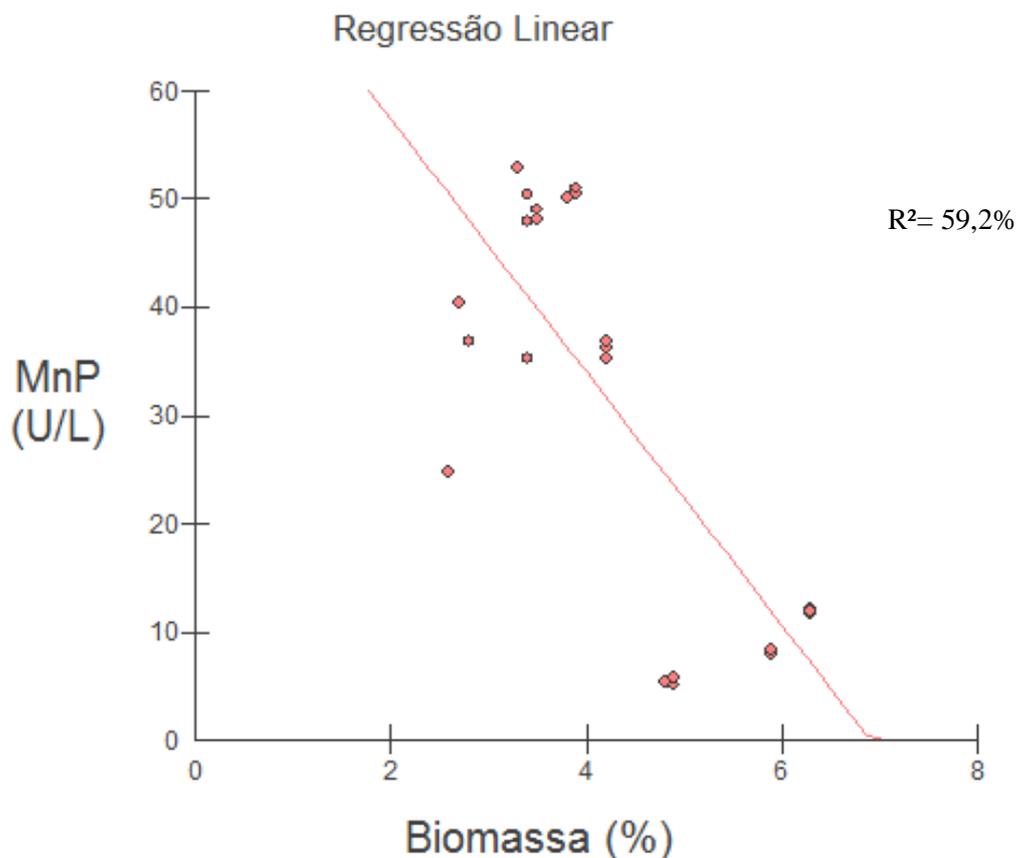


Figura 21: Modelo linear e coeficiente de determinação (R^2) para a relação de atividade de manganês-peroxidase (MnP) e produção de biomassa para *P.sanguineus*.

Para FV-12 o modelo exponencial foi o melhor ajuste obtido; ressalta-se, entretanto, que o coeficiente de determinação foi muito baixo ($R^2 = 11,9\%$) mostrando uma fraca dependência da atividade de MnP em relação a biomassa (Tabela 6).

5.6 PROTEÍNAS TOTAIS

Segundo o método utilizado para determinação de proteínas totais presentes nos tratamentos com chorume, foram observados menores níveis de proteínas totais à medida que se aumentava a concentração do efluente (Tabela 7). Com destaque para o fungo FV-12, que apresentou maiores valores absolutos de degradação. Possivelmente consequência da ação de enzimas extracelulares produzidas durante o metabolismo secundário.

Tabela 7: Degradação de Proteínas Totais do chorume após 30 dias de incubação com fungos amazônicos.

Tratamentos	Degradação de Proteínas (%)		
	Concentrações de chorume		
	1%	2%	4%
<i>P.sanguineus</i>	25,73	57,30	57,89
FV-12	45,02	61,15	64,38

A degradação das proteínas totais por FV-12 na concentração 1% de chorume foi 42,8% maior do que com o fungo *P. sanguineus*, apresentando diferenças percentuais, porém, menores nas duas outras concentrações de chorume estudadas.

5.7 TOXICIDADE

De modo geral *P. sanguineus* após trinta dias de incubação apresentou redução na toxicidade do chorume, indicando a quebra de compostos tóxicos presentes no efluente à medida que foi aumentada a concentração de chorume (Tabela 8). Comportamento também observado com o fungo FV-12.

Tabela 8: Valores médios da Redução da Toxicidade (RT) do chorume após 30 dias de incubação.

Tratamentos	RT do chorume (%)		
	Concentrações		
	1%	2%	4%
<i>P. sanguineus</i>	49,75	61,27	86,53
FV-12	25,07	45,14	78,66

Em valores percentuais o fungo amazônico *P.sanguineus* na menor concentração de chorume (1%) apresentou diminuição no percentual de toxicidade 49,6% maior que FV-12, comportamento semelhante foi observado nas concentrações de 2% e 4% do percolado com 26,3% e 9,09% respectivamente, melhor desempenho na redução do percentual de toxicidade do chorume em relação à FV-12.

Níveis de toxicidade do chorume foram avaliados diariamente por um período de cinco dias. *P. sanguineus* apresentou diminuição no percentual de toxicidade para todas as concentrações de chorume testadas, evidenciando um decréscimo de toxicidade à medida que aumenta-se a concentração do chorume (Figura 22).

Ressalta-se que na concentração 1% de chorume *P.sanguineus* no primeiro dia de teste conseguiu reduzir aproximadamente 50% da toxicidade do chorume, porém esse comportamento prossegue sem grandes mudanças, diferentemente do observado nas demais concentrações de chorume (Figura 22), onde na concentração 2% na metade do período ocorreu o aumento da toxicidade do meio. Fato também observado na concentração 4% no final do experimento.

De modo geral, observou-se uma relação direta positiva da concentração do chorume com a redução da toxicidade, onde aumentando aquela variável o percentual de RT também aumenta em valores percentuais.

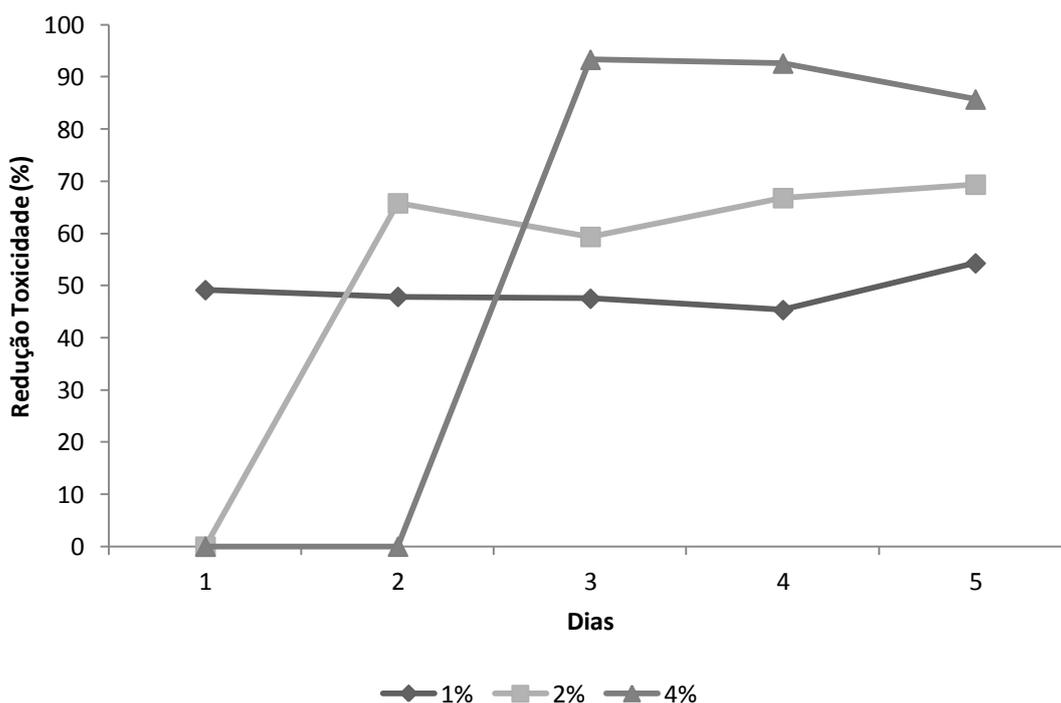


Figura 22: Redução da toxicidade do chorume pelo fungo *P. sanguineus*.

Padrão de comportamento similar foi observado para o fungo FV-12 (Figura 23) sendo que neste caso os percentuais obtidos para redução da toxicidade foram menores do que aqueles do *P. sanguineus*, indicando que os resíduos de toxicidade após tratamento enzimático com o fungo FV-12 foi maior do que com o fungo *P. sanguineus*.

Interessantemente, o mesmo padrão da relação concentração/inibição de toxicidade foi observado para *P. sanguineus*, foi aqui observado para FV-12, onde à medida que a concentração do chorume aumenta há um aumento nos valores de inibição da toxicidade.

Na concentração 4% de chorume, o fungo FV-12 atingiu seu pico máximo para redução da toxicidade no quarto dia de fermentação, e posteriormente decresceu até o final do experimento (Figura 23).

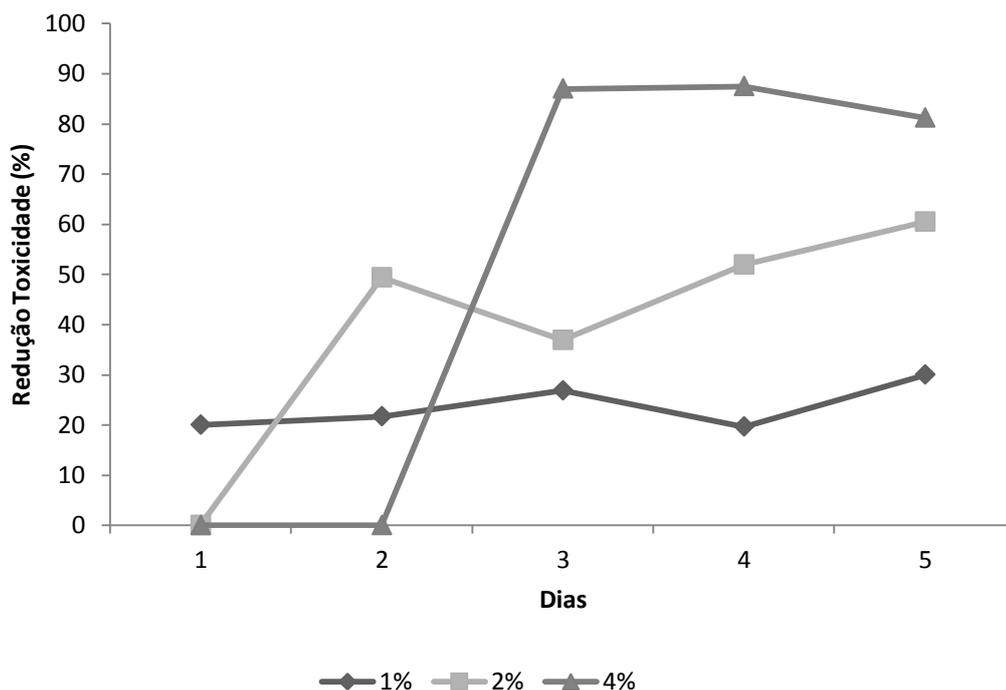


Figura 23: Redução da toxicidade do chorume pelo fungo FV-12.

5.8 DEGRADAÇÃO DA COR DO CHORUME

O fungo *P. sanguineus* teve atuação marcante na descoloração do chorume. A metodologia detectou ação do fungo FV-12 apenas na concentração de 4%, ao contrário do que ocorreu com o *P. sanguineus* onde houve aumento na descoloração à medida que a concentração de chorume aumentou. Na mais alta concentração testada o percentual de descoloração do *P. sanguineus* foi cerca de 79,4% maior do que o FV-12 (Tabela 9).

Tabela 9: Degradação da cor do chorume.

	Degradação da cor (%)		
	Concentrações		
	1%	2%	4%
<i>P.sanguineus</i>	2.39	6.25	14.20
FV-12	-11.00	-6.22	2.92

6 DISCUSSÃO

No que diz respeito ao crescimento micelial tanto *P. sanguineus* quanto FV-12 apresentaram crescimento micelial nos dois meios testados (M1, M2), porém com comportamentos distintos. *P. sanguineus* mostrou melhor crescimento micelial na presença de seringaldazine, indutor da enzima oxidativa lacase, enquanto FV-12 aparentou ter seu crescimento influenciado contrariamente. Nosso resultado é corroborado com estudos de Garcia (2006), que afirma que existe relação específica entre microorganismo e indutor, onde o meio de cultura e sua condição são considerados como fonte influenciadora na resposta do indutor. Segundo Leonowicz et al. (2001) enzimas oxidativas também podem interferir no crescimento celular de muitos fungos, e podem ser fonte de carbono ou participar na indução da síntese enzimática. Por outro lado, Giese et al. (2004) e Vasconcelos (2000) evidenciaram que a biomassa fúngica do *Botryosphaeria sp.*, diminuiu consideravelmente em cerca de 65% na presença do indutor, o que é evidenciado também para o fungo FV-12 onde a presença do indutor no meio influenciou no seu crescimento.

Por outro lado, existem diversos fatores que podem influenciar no crescimento fúngico, um deles é a glicose. Neste estudo foi adicionada 1 g de glicose a cada 1000 mL de meio de cultivo. Segundo Trabulsi et al. (1999) a glicose é inicialmente preferida pelos fungos no processo de decomposição do substrato. Neste estudo a fonte de glicose possivelmente pode ter influenciado no crescimento micelial dos fungos amazônicos testados promovendo sua adaptação aos componentes do meio com chorume, resultando em maior crescimento. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Rodrigues (2006), que verificou que a adição de glicose estimularia o crescimento na fase inicial proporcionando melhores condições para o crescimento de alguns fungos. Royer et al. (1985) utilizando *Coriolus versicolor* mostraram que para ocorrer o processo oxidativo do efluente resultante da indústria papeleira foi necessária glicose como fonte adicional de carbono, porém esse comportamento é singular, dependendo do organismo em questão.

De modo geral, o crescimento fúngico de FV-12 foi maior em meio M1 do que em M2, diferindo de *P.sanguineus* em seus aspectos nutricionais e consequentemente na resposta do crescimento hifal. Neste sentido, segundo Ly e Nan (2009) as exigências nutricionais são uma das características fisiológicas fundamentais não somente para o crescimento dos fungos, mas também para um melhor entendimento do papel ecológico destes. Os requisitos nutricionais de qualquer organismo são determinados pelo seu metabolismo energético característico e pela sua capacidade biosintética (SANTOS 2009). Moraes (2001), afirma que cada fungo responde com seu próprio comportamento ao ambiente e é este comportamento que lhe provê uma seletiva e competitiva vantagem sobre outros organismos.

Em relação à biomassa produzida, nas maiores concentrações de chorume foi onde ocorreu a maior produção. Munari et al. (2003), estudando a cinética de produção de biomassa do fungo *Pleurotus sajor-caju* em cultivo submerso com efluentes da indústria de papel, observaram maior quantidade de biomassa em tratamentos com o efluente. Situação semelhante foi observada em pesquisas de Cai et al. (1993), onde evidenciou-se o crescimento radial do basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* em meio de cultivo com a presença de compostos fenólicos, e em alguns tratamentos a biomassa aumentou em concentrações tóxicas para outros fungos. Podemos inferir que na presença de compostos tóxicos, como o chorume, os fungos desenvolvem novos mecanismos para acumular componentes intracelulares (polissacarídeos e lipídeos), que podem contribuir para aumentar a biomassa e evitar o efeito do poluente (COSTA et al. (2004).

O aumento de biomassa não seguiu a tendência de aumento das enzimas, indicativo da relação fraca que encontramos entre essas duas variáveis. Neste caso, outras variáveis podem estar influenciando a secreção dessas enzimas. Ressalta-se, entretanto, que as enzimas MnP e LiP mostraram um maior coeficiente no relacionamento com a produção de biomassa. Neste sentido, outras variáveis como temperatura, pH, umidade, fonte de carbono, glicose e tempo de cultivo podem ter interferido nessa relação. Faz-se necessário estudos mais aprofundados em relação a estas variáveis e seus momentos de ação.

Nos testes de degradação de proteínas o fungo FV-12 apresentou o melhor desempenho, porém apresentou maiores índices de toxicidade e menores níveis de

descoloração do efluente quando comparados ao fungo *P.sanguineus* nas mesmas condições de teste. Possivelmente pode ter ocorrido a quebra de compostos tóxicos presentes no meio em moléculas menores, porém formando subprodutos ainda mais tóxicos (RODRIGUES, 2006). Diversas são as variáveis que influenciam o processo de degradação, no caso específico de FV-12, Nunes et. al. (2011) estudando uma cepa demonstraram que o pH exerce um papel fundamental no metabolismo do fungo, uma vez o mesmo apresenta grande versatilidade ao desenvolver-se em ampla faixa de pH entre 3 e 11 em diferentes concentrações de chorume. Resultados corroboram com a afirmação de Trabulsi e Alterthum (2008) de que fungos filamentosos podem desenvolver-se na faixa de pH entre 1,5 e 11. O pH do chorume da lixeira pública de Parintins está na faixa 9, e Nunes et. al. (2011) avaliaram que em seus estudos ocorreu uma variação do pH. Nüske et al. (2002) comentam que essas oscilações estejam possivelmente relacionadas à secreção de oxalato, visto que é conhecida a secreção deste ácido por fungos da degradação branca em cultivos líquidos durante a fase de crescimento. Ácidos orgânicos são provenientes da degradação dos compostos presentes no efluente, o que reflete melhoria da atividade metabólica da espécie fúngica (RODRIGUES, 2006).

Em função da sua complexidade as proteínas constituem fator limitante para o tratamento biológico de águas residuárias. Um sistema de tratamento mais eficiente pode estar diretamente relacionado com a concentração de proteínas. Estudos analíticos baseados na determinação de proteínas podem render informações sobre a influência das condições ambientais sobre os processos predominantes nos sistemas de tratamento biológico de efluente e também sobre a eficiência dos mesmos (MIWA et al., 2008). Neste sentido FV-12 foi mais eficaz na degradação de proteínas, fato relacionado à maior degradação da matéria orgânica presente no meio de cultivo a base de chorume.

O fungo *P.sanguineus* apresentou menores percentuais de degradação das proteínas totais, por outro lado mostrou melhores percentuais de descoloração do efluente estudado. Fato que pode estar possivelmente ligado à formação de alguns grupos cromóforos durante o processo de degradação do chorume pelo fungo FV-12, os quais apresentaram maior resistência à descoloração. Pesquisas de Paiva et al. (2004) atribuem o aumento da cor a geração de compostos cromóforos oriundos da degradação e ou excreção de material intracelular.

Nossos resultados corroboram com estudos Souza et al. (2011) em estudos sobre degradação do corante alaranjado de metila com os fungos *P.sanguineus*, FV-12 e outros fungos amazônicos de decomposição branca, onde comprovaram maior degradação da cor do corante pelo fungo *P.sanguineus* em 5 dias de incubação, enquanto FV-12 apresentou total descoloração apenas no 13º dia. O potencial de *P. sanguineus* também foi avaliado em estudos de Balan e Monteiro (2001), onde utilizaram os fungos basidiomicetos *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* e *P.saguineus* na degradação do corante índigo em meio líquido. Após quatro dias verificou-se a remoção da cor em 100% para *Phellinus gilvus*, 94% para *Pleurotus sajor-caju* e 91% para *P.saguineus*, e remoção da toxicidade para *Daphnia similis* de 41%; 96% e 93%, respectivamente.

O processo de degradação de compostos recalcitrantes é consequência de reações oxidativas, algumas vezes enzimas extracelulares oxidam o efluente e formam compostos menores e menos tóxicos, possibilitando sua remoção do ambiente, porém processo oposto pode ocorrer e formar subprodutos mais tóxicos e de difícil remoção.

Em nossos estudos, a atividade da enzima MnP produzida pelo fungo FV-12 em 1% de chorume após trinta dias foi 84, 2% maior do que a produzida por *P. sanguineus*. Possivelmente esta enzima pode estar relacionada com os maiores percentuais de degradação de proteínas do chorume por FV-12. Estes resultados podem ser relacionados aos estudos de Rodrigues-Couto et al. (2000) que estudaram a degradação do corante Poly R-478 e aderiram a degradação à presença de MnP produzida por *Phanerochaete chrysosporium*. Domingues et al. (2001) também observaram maior atividade de MnP por *Phanerochaete chrysosporium* em reator semi-sólido, onde produziu 1350 U/l-1 e resultou em 19% de degradação do corante Poly R-478 após 15 minutos de ação.

O aumento da atividade manganês peroxidase também pode estar relacionado à atividade de outras enzimas, e ter agido em ação conjunta na degradação do chorume. Neste estudo, no período de trinta dias a atividade de LiP excretada por FV-12 apresentou comportamento semelhante à de MnP. Corroborado com os estudos de Bavutti (2002), que estudou a degradação do chorume por linhagens de fungos lignolíticos, onde ocorreu maior degradação do percolado quando foi observado maiores atividades de LiP e MnP no mesmo período. De acordo com Buswell e Odier (1987),

MnP é produzida concomitantemente com a LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono disponíveis no meio.

Avaliando-se os percentuais de atividade das enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase excretadas por *P.sanguineus* e FV-12 em diferentes períodos e submetidos a concentrações de chorume, observamos comportamentos enzimáticos diferenciados após os períodos de trinta e sessenta dias de fermentação. O fungo *P.sanguineus* após os primeiros trinta dias de teste mostrou baixa secreção das enzimas, enquanto FV-12 mostrou percentuais muito mais elevados; no entanto esta diferença cai aos 60 dias de fermentação e *P.sanguineus* mantém o aumento enzimático até o final do experimento. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Bavutti (2002) que mostraram pequena produção de MnP e LiP em meio acrescido com chorume autoclavado sem adição de nutrientes. Entretanto, em inóculos com uma pequena fração de glicose a atividade de manganês e lignina peroxidase aumentou simultaneamente, e alcançou seu pico máximo no 18º dia, a partir daí apresentou queda até o final do teste. Em nossos experimentos *P.sanguineus* mostrou comportamento contrário, secretando maiores índices dessas enzimas nos maiores períodos estudados.

No que condiz a atividade enzimática de lacase, esta não atingiu grandes proporções nos períodos de fermentação estudados; diversos são os fatores que interferem neste quadro. Um deles é o tempo de cultivo que pode influenciar na secreção da enzima lacase. Estudos de Gimenes (2011) referentes à biodegradação de pentaclorofenol pelo basidiomiceto *Trametes villosa* indicaram que os primeiros vinte dias foram os mais favoráveis para os processos de biorremediação, por apresentarem maiores taxas de atividades lignolíticas envolvidas na degradação de xenobióticos. Garcia (2006) relata que muitos basidiomicetos produzem a lacase após 2 ou 3 dias de crescimento e têm um tempo bastante variável durante o qual a enzima continua a ser produzida. Esse fato está de acordo com estudos de Andrade (2011), que testou diversas condições e meios de cultivo suplementado com matéria regional da Amazônia para a produção de lacase, e nos seus resultados foi observado um decréscimo da produção de lacase de *Trametes lactinea*, após dez dias de cultivo.

Outro fator que influencia na secreção da lacase é a composição do meio de cultivo. Em nossos estudos os fungos basidiomicetos foram cultivados em fermentação submersa acrescidos de água estéril e diferentes concentrações de chorume, e resultaram

em pequenos percentuais de secreção desta enzima. González *et al.* (2007) observaram a indução de lacases de linhagem de *Trametes* por efluentes da indústria canavieira, ricos em melanoidina. Segundo Moreira *et al.* (1998), a produção de lacase em elevadas concentrações é um resultado do metabolismo secundário do fungo, que não é dependente do seu crescimento, mas sim de algum estímulo externo. Esta informação corrobora com os estudos de Pointing *et al.* (2000), que demonstraram que o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* CY788 teve sua melhor produção de lacase em meios contendo altos níveis de carbono. A pesquisa de Maciel (2011) também revelou um aumento na secreção de lacase de *Hexagonia glabra* em meios de cultivo com altos níveis de carbono, em todas as condições estudadas.

Vale ressaltar que a atividade máxima de determinada enzima é específica de cada metabolismo fúngico, que pode excretar diferentes enzimas com diferentes índices de atividade e em períodos de cultivo determinados.

7 CONCLUSÕES

- Os fungos *P.sanguineus* e FV-12 são capazes de utilizar o chorume como substrato para crescimento;
- A presença de seringaldazina no meio de cultivo influenciou no crescimento de *P.sanguineus*.
- *P.sanguineus* apresentou o maior percentual de degradação do chorume;
- As enzimas manganês-peroxidase (MnP) e lignina-peroxidase (LiP) pareceram ter papel fundamental na quebra de compostos do chorume;
- A excreção de lacase para o meio foi pequeno para ambos os fungos testados;

Portanto, conclui-se que o fungo *P.sanguineus* apresentou potencial de degradação, sendo possível sua aplicação no tratamento do chorume.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUER, J. P. e RICHARD, C. Reactive species produced on irradiation at 365 nm of aqueous solutions of humic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 93, p.193-198, 1996.

AITKEN, M. D. e IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalised by manganese peroxidase from *Phanerochete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 276, n. 2, p. 405 – 414 , 1990.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X.; OLIVEIRA, C. Mobilidade de metais pesados em solo tratado com resíduo siderúrgico ácido. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 22, p. 345-353, 1998.

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

ATAGANA, H.I.; HAYNES, R.J. & WALLIS, F.M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 172, n.1-4, p. 201-219. 2006.

BALAN, D.S.L. e MONTEIRO, R.T.R. Descolorization of textile índigo dye by lignilytic fubgi. **Journal of Biotechnology, Amsterdan**, v.89, n. 2-3, p.141-145, 2001.

BARBOSA, R.M., OTERO; O.M.F., ARGOLO, J.L., QUEIROZ, A.F., SANTOS, V.L.S., OLIVEIRA, O.M.C. O Chorume dos Depósitos de Lixo Urbanos: Composição, Evolução, Diluição, Extensão, Processos, Poluição e Atenuação, **Revista Baiana de Tecnologia**, v. 14, n 1, p. 111-124, 1999.

BAVUTTI, H.R.F. **Isolamento, seleção e estudo de microorganismos lignolíticos degradadores de chorume**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2002. 180p.

BERTAZZOLI R, PELEGRINI R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, v.25, p.470 - 476, 2002.

BETTUCCI, L. e GUERRERO, R. T. Hongos xilófagos: estudo de cultivos. **Boletim da Faculdade de Agronomia**. v. 118, p. 1-40, 1971.

BIODIVERSIDADE DA AMAZÔNIA. Disponível em <http://www.museu-goeldi.br/biodiversidade/oamazonia.asp>. Acesso em 11/01/2012.

BUSWELL. J.A. e ODIER. E. Lignin biodegradation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**. v.6, p. 1-60, 1987.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro. 2002.

CAI, Y. J.; BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. Effect of lignin-related phenols and tannic acid derivatives on the growth of edible mushrooms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 9, p. 503-507, 1993.

CALACE, N.; MASSIMIANI, A.; PETRONIO, B. M.; PIETROLETTI, M. Municipal landfill leachate-soil interactions: a kinetic approach. **Chemosphere**. v. 44, p. 1025-1031, 2001.

CASTRO E SILVA, A.; SILVA, M. B. C.; CAVALCANTI, M. A. Fungos: O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica, 2002. Disponível em: <http://www.geocities.com.br/biodiversidade2002/fungos>. Acesso em 20 de fevereiro de 2010.

CEMPRE - Compromisso Empresarial para a Reciclagem. Disponível em: www.cempre.org.br. Acessado em 16/10/2010.

CHANDRA, R. e RUSTGI, R. Degradable polymers Prog. Polym. **Science**. v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHRISTENSEN, T.; KJELDTSEN, P.; BJERG, P. L.; JENSEN, D. L.; CHRISTENSEN, J. B.; BAUN, A.; ALBRECHTSEN, H.; HERON, G. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. **Applied Geochemistry**. v. 16, p. 659-718, 2001.

CLEMENTE, A.R. **Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002, 178p.

COSTA, J.M.; CORBELLINI, V.A.; SCROFERNEKER, M.L. Study of different nitrogens sources on glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultered in tricyclazole. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 633-636, 2004.

COSTA, P. O. da. S. **Avaliação em laboratório do transporte de contaminantes no solo do aterro sanitário de Sauípe/ BA**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Pontifícia Universidade Católica (PUC), Rio de Janeiro, 2002. 188p.

CUOTO, S.; J.L. e HERRERA. Fungal laccases: biotecchnol. application. **Biotechnology Advence.**, v. 24, p 500-5013, 2006.

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

DIAS, A.E.X.O. **Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**. In: SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA, R.M. (Org.) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

DOMINGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Design of a rotating drum bioreactor for lignolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on inert support. **Process Biochemistry**. v.37, p.549-554, 2001.

CHAVES, E. V. **Absorção de metais pesados de solos contaminados do aterro sanitário e pólo industrial de Manaus pelas espécies de plantas *Senna multijuga*, *Schizolobium amazonicum* e *Caesalpinia echinata***. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 2008, 100p.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J.F.D.; ERIKSSON, K.E.L.. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**. v. 391, p. 144-148, 1996.

ENZMINGER, J.D., ROBERTSON, D., AHLERT, R.C., KOSSON, D.S. Treatment of Landfill Leachates, **Journal of Hazardous Materials**. v. 14, p. 83-101, 1987.

ERDEN, E.; UCAR, C. M.; GEZER, T.; PAZARLIOGLU, K. N. Screening for lignolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. **Brazilian Journal of Microbiology**., v. 40, p. 346 – 353, 2009.

ERIKSSON, K.E.L., BLANCHETTE, R.A. AND ANDER, P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. **Springer Verlag**. v. 9, p. 407. 1990.

ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Ed. Educ. 2004.

FERREIRA, J.A., GIORDANO, G., RITTER, E., ROSSO, T.C.A., CAMPOS, J.C., LIMA, P.Z.M. Uma Revisão das Técnicas de Tratamento de Chorume e a Realidade do Estado do Rio de Janeiro. **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. João Pessoa – PB, 2001.

FORGACS, E.; CSERHATI, T.; G. OROS. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environmental International**. v. 30, p. 953-71, 2004.

FORGIE, D.J.L. Selection of the Most Appropriate Leachate Treatment Methods. Part 1: A Review of Potential Biological Leachate Treatment Methods. **Water Pollution Research Journal of Canada**. v. 23, p. 308-328, 1988.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Revista Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

GARCIA, T.A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Nacional de Brasília, 2006. 110p.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLANG, J.M.. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation of Journal**. v. 3, p.1-26, 1999.

GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria SP*, **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 26, n.4, p. 463 – 470, 2004.

GIMENES, L. J. **Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares**. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.105p.

GLENN, J. K.; AKILESWAREAN, L.; GOLD, M. H. Mn (II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn – peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 251, p. 688 – 696, 1986.

GOCHEV, V.K. e KRASTANOV, A.I. Fungal Laccases (Review). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. v. 13, p. 75-83, 2007.

GONZÁLEZ, T.; TERRÓN, M.C.; YAGÜE, S.; JUNCA, H.; CARBAJO, J. M.; ZAPICO, E. J.; SILVA, R.; ARANA-CUENCA, A.; TÉLLEZ, A.; GONZÁLEZ, A. E. Melanoidin-containing wastewaters induce selective laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes* sp. I-62. **Research in microbiology**. v. 59, p. 103-109, 2007.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimision of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological research**. v. 95, p. 641-655, 1991.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. Characterization of laccase and peroxidase from wood-rooting fungi. **Applied of Environmental Microbiology**. v. 64, p. 1601-1606, 1998.

INSTITUTO Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE** – Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Rio de Janeiro: 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 30/01/2012.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE**. **Censo Brasileiro de 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE**. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Brasília: 2007. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 25/12/2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE**. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Brasília: 2006. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 16/10/2011

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

KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; LUNDELL, T. ; HATAKKA, A. A rapid method to quantify prooxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. **Journal of Microbiological Methods**. v. 61, p. 261-271, 2005.

KARAM, J. e NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 69, p. 141-153, 1997.

KIRK, T.K. e FARRELL, R.L. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: A patent review. **Recent Patents on Biotechnology**. v. 2, n.1, p.10 – 24, 2008.

LACAZ, C.L.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: SARVIER. 9ª ed. 2002.

LACAZ, C.S., MINAMI, P.S.; PURCHIO, A. **O Grande Mundo dos Fungos**. São Paulo, EDUSP/Polígono. 1970.

LAURENSE, J. **Biologia**. Volume Único. 1 ed. São Paulo: Nova Geração, 2005.

LEONOWICZ, A.; ACHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**. v. 41, p. 185-227, 2001.

LEONOWICZ, A. e GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 3, p. 55 – 58, 1981.

LIMA, L. M. Q. **Biorremediação de lixões**. Aplicações da biotecnologia ao meio ambiente. 2005.

LY, Y.Z. e NAN,Z.B. Nutritional study on *Embellisia astragali*, a fungal pathogen of milk vetch (*Astragalus adsugens*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 95, p. 275-284, 2009.

MACIEL, M.J.M. **Influência e parâmetros físicos na atividade oxidativa do fungo *Hexagonia glabra* (P.beauv) Ryvardeen**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2011, 125p.

MACIEL, M.J.M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and Biotechnological Applications of Lignolytic Enzymes of the Basidiomycetes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1-13, 2010.

MARMOS, J. L; AGUIAR, C. J. B. **Avaliação do Nível de Contaminação dos Aquíferos da Cidade de Parintins (AM): Primeiros Resultados**. Serviço Geológico do Brasil-CPRM/Manaus, AM – 2005.

MATEUS, D.R. e OKINO, L.K. **Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: VLR BONONI (ed.) *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 106-139. 1998.

MAY, R.M. How many especies? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, B v. 330, p.293-304, 1991.

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

MEIRA, R.C. Influência de fungos e bactérias aeróbias totais na biodegradação de resíduos sólidos urbanos na cidade de Campina Grande – PB em escala experimental. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 6, n. 3, p. 333-349, 2009.

MIELGO, I. et al. A packed-bed fungal bioreactor for the contínuos decolourisation of azo-dyes (Orange II). **Journal of Biotechnology.**, v. 89, p. 99-106, 2001.

MIWA, A.C.P.; FALCO, P.B.; CALIJURI, M.C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia. Sanitária Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 236-242, 2008.

MOREIRA, M.T.; PALMA, C.; FEIJOO, G.; LEMA. J.M. Strategies for the continuous production of lignolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**. v. 66, p.27-39, 1998.

MORAES, I.O. **Produção de microorganismos**. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. 1 ed., vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

MOZA, P. N.; HUSTERT, K.; FEITCH, E.; KETTRUP, A. Comparative rates of photolysis of triadimefon in aqueous solution in the presence of humic and fulvic acid. **Chemosphere**. v. 31, n. 4, p. 605-610, 1995.

MUNARI, F.M.; GAIO, T.A.; DILLON, A.J.P. Cinética da secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papelreira. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis, 2003.

NICOTRA, S.; CRAMAROSSA, M. R.; MUCCI, A.; PAGNONI, U. M.; RIVA, S.; FORTI, L. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans – dehydrodimers catalysed by laccases from *Miceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 506 – 600, 2004.

NOVOTNY, C.; SVOBODOVA, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; SASEK, V.. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36, p. 1545-1551, 2004.

NUNES, A.S; SOUZA, E.A; SOUZA, P.L; SOARES, E.P; CORDEIRO, M.S.C; SILVA, A.V; GALÚCIO, V.A; CASTRO E SILVA. Efeito do pH no crescimento in vitro de fungos amazônicos em meio suplementado com chumbo. **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Foz do Iguaçu, 2011.

NÜSKE, J.; SCHNEIBNER, K.; DORNBERGER, U.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 556-561, 2002.

OLIVEIRA, F. J. S.; JUCÁ, J. F. T. Acúmulo de metais pesados e capacidade de impermeabilização do solo imediatamente abaixo de uma célula de um aterro de resíduos sólidos. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v. 9, n.3, p. 211-217, 2004.

PACHECO, J.R. **Estudo de certas potencialidades de processos oxidativos avançado para o tratamento de percolado de aterro sanitário.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2004, 97p.

PAIVA, T.C.B; ZAPPA, J.A; SOUZA, J.V.B; SILVA, F.T. Biorremediação de um efluente de branqueamento ECF com culturas heterogêneas de fungos e bactérias oriundas de lodos ativados. **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável.** Santa Catarina, 2004.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, p. 435-448, 1993.

PIRATOBA MORALES, G.; FENZL, N.; DIAS DA COSTA, T. C.; TEIXEIRA MELO, O.; MORGANE CAMPOS RIBEIRO, H. Poluição dos recursos hídricos superficiais por chorume no lixão do Aura, Belém – PA. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Geoquímica.** Curitiba-PR, 2001.

POINTING, S.B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture, **Mycologia**. v. 92, n.1, p.139-144, 2000.

PUTZKE, J; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos.** Vol. 2 Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

RANK, J; JENSEN, A.G; SKOV, B; PEDERSEN, L.H; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research**. v. 300, n. 1, p. 29-36, 1993.

RAUEM, T. G.; DEBACHER, N. A.; SIERRA, M. M. S; SIERRA, E. J. S. Tensoatividade de ácidos húmicos de procedência distinta. **Química Nova**. v. 25, n. 6, p. 909-913, 2002.

RAVEN, P.H. **Biologia Vegetal.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.

RELEM – **Revista Eletrônica Mutações**. Em Parintins (AM) lixeira causa impactos socioambientais, 2010. Disponível em <http://www.relem.info/edicoes/ed1/rep2.pdf>. Acesso em 21/12/2011.

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

RIBEIRO DA SILVA, R. e COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Curso de Capacitação de Monitores e Educadores, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo, 2006, 20p.

RICHARD, H. **Enzimologia e Biocatálise**. In: SCRIBAN, R. (Org). Biotecnologia. Ed: Manole, p. 180-207, 1985.

ROCA, E.; D'ERRICO, E.; IZZO, A.; STRUMIA, S.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. In vitro saprotrophic Basidiomycetes tolerance to Pendimethalin. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 63, p. 182–186, 2009.

RODRIGUES-COUTO, S.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M.R.; SANROMÁN, A. Stimulation of lignolytic enzyme proction and ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**. v.74, p.159-164, 2000.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2006. 145p.

RODRIGUES, C. L. e TAIOLI, F. Metais pesados no lixão de Ilhabela – SP. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Geoquímica**. Curitiba – PR, 2001.

ROYER, G.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; ROULEAU, D.; MAYER, R. Batch and continuous decolorization of bleached kraft effluents by a white rot fungus. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnhnology**, v. 35, p.14-22, 1985.

SANTANA, G.P. e BARRONCAS, P.S.R. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus – (AM). **Acta Amazônica**, v. 37 n. 1, p.111 – 118, 2007.

SANTOS, J.C. **Atividade Enzimática Oxidativa dos fungos Amazônicos *Pleurotus SP(F-31)*, *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra***. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2009, 99p.

SANTOS S., I.N. dos; HORBE, A.M.C; SILVA, M.S.R da; MIRANDA, S.A.F. **Influência de um aterro sanitário e de efluentes domésticos nas águas superficiais do Rio Tarumã e afluentes – AM**. *Acta Amazônia*. Amazonas, v. 36, n. 2, p.229 – 236, 2006.

SETTE, D. L.; OLIVEIRA, M. V.; A. M. Microbial lignocelulolytic enzymes: Industrial applications and future perspective. **Australia Microbiology**, v. 29, p. 18 – 20, 2008.

SILVA, A. C.; SANT’ANNA JR., G. L.; DEZOTTI, M.; CAMPOS, J. C.; RIBEIRO, G. F. Aplicação de bioensaios para avaliação da toxicidade do chorume do aterro sanitário de Gramacho (RJ). **Anais do VI Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Vitória – ES, 2002.

SILVA, N.K.T; SILVA, S.M. **Educação Ambiental e Cidadania**. Curitiba: IESDE, 2009.

SILVEIRA, A.M.M.. **Estudo do Peso Específico de Resíduos Sólidos Urbanos**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2004, 112p.

SISINO, C.L.S.; MOREIRA, J.C. Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, n.4, p. 515 – 523, 1996.

SOARES, A. A.; CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. **Implantação de tecnologias de remediação de água subterrânea contaminada por gasolina em postos de abastecimento: estudo em campo e microcosmos.** Centro de Tecnologia Mineral-CETEM/MCT, 2008.

SOARES, C. H. L. **Estudos Mecanísticos de degradação de efluentes de madeira.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998, 133p.

SOARES, G. M. B. **Aplicação de Sistemas enzimáticos à degradação de corantes têxteis.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Têxtil, Universidade do Minho, Portugal, 2000, 173p.

SOUZA, E.G; NUNES, A.S; GALUCIO, V.C.A; SOARES, E.P; VALENTE, P.M.R; TRINDADE, D.B; CASTRO E SILVA, A. Crescimento micelial e descoloração do corante alaranjado de metila por fungos da Amazônia. **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia.** Foz do Iguaçu, 2011.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, P. S.; NEVO, E.; HADAR, Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 41, p. 57 – 61, 2007.

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

TIEN, M. e KIRK, T.K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: WOOD, K. and KELLOGG, S.T. (eds). **Methods in Enzymology**, v. 161, part B, p. 238-249, 1988.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. vol. 72, p. 169-183, 2000.

TRABULSI, L.R. e ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** Ed. Atheneu, 5 ed, 2008.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM. F; GOMTERTZ, O. S; CANDEIAS, J.A. N. **Microbiologia**. 3 ed . São Paulo: Editora Ateneu,1999.

VASCONCELOS, A.F.D. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria sp.* In the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Processus Biochemical**. v. 35, p. 1131 – 1138, 2000.

VALT, R.B.G. **Ciclo de vida de embalagens para bebidas no Brasil**. Ed. Thesaurus, Brasília, 2007.

VIKINESWARY, S.; ABDULLAH, N.; RENUVATHANI, M., SEKARAN, M.; PANDEY, A; JONES, E.B.G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro – residues by *Picnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**., v. 97, p. 171 – 177, 2006.

YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Influência do corante Azul Brilhante de Remazol R sobre o sistema enzimático ligninolítico de *Psilocybe castanella* CCB444 em meio de cultivo sintético. (Nota Científica) **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1119-1121, 2007.

PUBLICAÇÕES



SURFACTANTE TWEEN-80 NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR *Pycnoporus sanguineos*

Adriana da Silva Nunes¹
 Izabel Cristina Conceição dos Santos¹
 Adrya da Silva Figueiredo¹
 Jucileuza Conceição dos Santos¹
 Cassia Valente da Silva¹
 Ademir Castro e Silva¹

1. Universidade do Estado do Amazonas - UEA

INTRODUÇÃO:

Atualmente os fungos vêm sendo muito utilizados na biorremediação ambiental. Uma das possibilidades de uso está na biosorção de metais pesados usando sua massa micelial, e neste sentido vários trabalhos estão sendo desenvolvidos em instituições de pesquisa. Considerando a biodiversidade amazônica e o pouco que se conhece sobre os fungos desta região é de interesse utilizá-los como subsídio para biorremediação. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi verificar a produção de biomassa do fungo lignolítico *Pycnoporus sanguineos* em meio de cultivo acrescido com diferentes fontes de carbono.

METODOLOGIA:

Cepas do fungo *Pycnoporus sanguineos* foram coletadas no município de Manaus. Pequenos fragmentos do carpóforo foram crescidos em meio BDA para produção de cultura pura. Os meios utilizados para produção de biomassa foram meio Czapek acrescido de Tween-80 em concentrações de 0,5, 1,0, e 1,5%. A biomassa foi medida a cada 7 dias num período de 17 dias. Foi avaliada a produção de biomassa em relação ao peso seco com a metodologia utilizando filtragem alíquota em papel filtro.

RESULTADOS:

Em termos absolutos o maior percentual de produção de biomassa (8.8%) por *Pycnoporus sanguineos* aconteceu na concentração 1,5% de Tween-80. De maneira geral, a medida que se aumenta a concentração observa-se uma relação positiva também na produção de biomassa. Ressalta-se, entretanto, que o surfactante é conhecido por atuar na parede celular para secreção de enzimas produzidas por fungos. Pela primeira vez descreve-se uma possível influência na produção de biomassa. O teste estatístico de ANOVA ao nível de 5% de significância mostrou que não há diferença estatística na produção de biomassa entre diferentes concentrações.

CONCLUSÃO:

A cepa do fungo *Pycnoporus sanguineos* testada apresentou uma correlação positiva com suplementação de Tween-80 no meio contendo nitrogênio, ou seja, independente da concentração o Tween-80 deve influenciar na produção de biomassa.

Instituição de Fomento: CAPES

Palavras-chave: Surfactante, Fungo amazônico, Fonte de nitrogênio.



**PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS COLETADOS NA REGIÃO DO BAIXO
AMAZONAS (MUNICÍPIO DE PARINTINS/AM) EM MEIO SUPLEMENTADO COM
FARINHA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)**

Dilcélia Conceição da Costa ¹
Adriana da Silva Nunes ¹
 Izabel Cristina Conceição dos Santos ¹
 Andrey Azedo Damasceno ¹
 Ademir Castro e Silva ¹
 Cynara da Cruz Carmo ¹

1. Universidade do Estado do Amazonas

INTRODUÇÃO:

A preocupação ambiental tem motivado o interesse pelo desenvolvimento de pesquisas sobre os potenciais efeitos de metais tóxicos no meio ambiente no intuito de amenizar ou extinguir o impacto causado. Neste sentido, pesquisas sobre a biosorção estão sendo realizadas utilizando-se a biomassa fúngica na biorremediação de solos e efluentes contaminados por metais de difícil degradação. Ressalta-se, que a produção de biomassa micelial está estreitamente relacionada com os requisitos nutricionais de cada fungo, conhecimento este que pode contribuir para o melhoramento da produção dessa biomassa para estudos na biosorção de metais pesados. Considerando a biodiversidade da região Amazônica e o potencial fúngico inexplorado da região do Baixo Amazonas este trabalho tem como objetivo principal verificar a produção de biomassa por fungos basidiomicetos coletados no município de Parintins/AM em meio nutricional acrescido com farinha da casca e polpa de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer).

METODOLOGIA:

Amostras de fungos da classe dos Basidiomicetos foram coletadas na região rural do município de Parintins/AM, codificados em FI-02, FV-12, FV-08 e FBL. Para obtenção de cultura pura, pequenos fragmentos dos carpóforos foram crescidos em meio de cultura BDA. Para produção de biomassa fúngica foi utilizado meio contendo farinha da casca e polpa de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) em concentração 0,4%. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em meio líquido e condição estacionária, em intervalos de 24, 48, e 72 horas num período de 7 dias, utilizando-se o método de filtragem alíquota em papel filtro para quantificação (em porcentagem) da biomassa produzida.

RESULTADOS:

O maior percentual de produção de biomassa (5,4%) ocorreu em meio suplementado com farinha da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) para o fungo FV-12. De modo geral, este meio produziu 4,31% mais biomassa em relação àquele suplementado com a polpa de tucumã. A menor produção de biomassa ocorreu para o fungo FI-02 em meio com farinha da casca de tucumã. Teste de Tukey para análise da diferença mínima significativa entre as médias evidenciou diferença estatística ao nível de 5% ($p < 0,05$) entre a produção média de biomassa dos fungos FV-12 e FI-02 em meio suplementado com farinha da casca do tucumã, sendo que FV-12 produziu 2,8 vezes mais biomassa. A produção de biomassa pelos fungos testados em meio suplementado com a farinha da polpa não mostrou diferença estatística ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$).

CONCLUSÃO:

O meio suplementado com a farinha da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) apresentou relação positiva com a produção de biomassa fúngica pelos quatro fungos na concentração testada. Novos experimentos em diferentes concentrações desse resíduo devem ser avaliados.

Instituição de Fomento: UEA, FAPEAM

Palavras-chave: Massa micelial, Fonte de carbono, Fungos amazônicos.



ATIVIDADE OXIREDUCTASE DO *Pycnoporus sanguineus*: SECREÇÃO DE LACASE EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Naimy Farias de Castro ¹
 Edilson Albuquerque Vieira ¹
 Elaine Pires Soares ¹
Adriana da Silva Nunes ¹
 Ademir Castro e Silva ¹

1. Universidade do Estado do Amazonas

INTRODUÇÃO:

Enzimas ligninolíticas têm potencial para aplicações em vários processos industriais e biotecnológicos. Tais aplicações incluem descontaminação de efluentes industriais, principalmente da indústria têxtil e petroquímica, processo de alvejamento e deslignificação na indústria de celulose e papel e na remoção de compostos fenólicos na indústria de bebidas (BALAN & MONTEIRO, 2001) e várias outras aplicações. Dentre essas enzimas encontra-se a lacase (benzenediol: oxigen oxidoreductase EC 1.10.3.2), que catalisa a oxidação de vários substratos com a redução de moléculas de oxigênio em água. Fungos causadores de podridão branca da madeira (white-rot fungi) são grandes secretores dessa enzima. Dentre estes encontra-se o *Pycnoporus sanguineus* que vem sendo estudado nos seus vários aspectos de atividade enzimática. É necessário, entretanto, pesquisar novas fontes de carbono que possam estimular o aumento da atividade de lacase. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo testar a atividade de lacase produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* em meio suplementado com diferentes fontes de carbono, industriais e naturais na fermentação líquida e no estado estacionário.

METODOLOGIA:

Cepa de *Pycnoporus sanguineus* foi coletada na zona rural do município de Manaus. Pequenos fragmentos do carpóforo foram inoculados em meio extrato de malte para posterior obtenção da cultura pura utilizada para determinação enzimática. O meio de crescimento foi composto de 3g de NaNO₃, 0,5g KPO₄, 0,5 mg MgSO₄·7H₂O, 0,5mg KCl e 0,01% FeSO₄·7H₂O e 24 mEq./l de NaNO₃. O meio foi acrescido individualmente de α -celulose (Sigma-Adrich USA), xilana (Fluka Biochemika, Switzerland), dextrose anidra e serragem de madeira de *Calophyllum brasiliensis* e *Aniba* sp sem extrativos (extração com acetato de etila:etanol:água, 1:1:1). A atividade enzimática de lacase foi determinada conforme metodologia proposta por Szklarz (1989) que consiste na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina até a sua forma quinona com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 525 nm ($\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Todo o teste foi feito em triplicatas.

RESULTADOS:

A maior atividade de lacase ocorreu no meio suplementado com serragem de madeira de *Aniba* sp, sem extrativos, com uma atividade 77 % maior do que no meio sem esse substrato (controle = 3,80 U.L⁻¹). Por outro lado, no meio contendo serragem da madeira de *Calophyllum brasiliensis* sem extrativos, a atividade foi menor (1,53 U.L⁻¹) do que a do controle. Considerando que a espécie *Aniba* sp contém células oleíferas no seu tecido xilemático é possível inferir que o fungo utilize-as na síntese da lacase. Estudos específicos, entretanto, são necessários para comprovar tal suposição. O meio suplementado com α -celulose foi o que apresentou a menor secreção de lacase (1,39 U.L⁻¹). O acréscimo de glicose no meio inibiu parcialmente a atividade enzimática confirmando estudos anteriores de que o excesso desses açúcares no meio pode inibir a secreção de lacase. A suplementação do meio com xilana contribuiu para uma secreção 3,6 vezes menor de lacase.

CONCLUSÃO:

O material lignocelulósico (madeira) com tratamento para retirada dos extrativos, ou ainda sem extração desses químicos, pode contribuir para o aumento da secreção de lacase. É necessário estudos sobre diferentes tipos de madeira que possam contribuir para o aumento da atividade de lacase considerando a quantidade e qualidade dos extrativos que possam estar inibindo ou não a secreção dessa enzima.

Instituição de Fomento: CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; FAPEAM - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas

Palavras-chave: Enzima Ligninolítica, Fungo Amazônico, Serragem de Madeira.



MASSA MICELIAL DE FUNGO BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA, EM MEIO CONTENDO SURFACTANTE

Izabel Cristina Conceição dos Santos ¹

Adriana da Silva Nunes ¹

Jucileuza Conceição dos Santos ²

Maria Dolores Pinheiro Fonseca ²

Jorge Pontes Koide ³

Ademir Castro e Silva ⁴

1. Aluna de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais-UEA

2. Analista de Laboratório- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (CEAB)

3. Aluno de Graduação em Química, Universidade do Estado do Amazonas-UEA

4. Prof.Dr./Orientador de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais-UEA

INTRODUÇÃO:

Os fungos basidiomycetes têm sido estudados devido apresentarem características econômicas e ecológicas, principalmente pela sua capacidade de produzir enzimas extracelulares (PUTZKE, 2002). Os processos biotecnológicos utilizando basidiomycetes baseiam-se nos seus produtos metabólicos, como enzimas e polissacarídeos. A importância do aparato enzimático destes fungos está relacionada com a bioconversão de resíduos lignocelulósicos (MAU et al, 1991; SONG et al, 1991; STURION & RANZANI, 1997) que podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Este aparato enzimático está relacionado com os processos de biodegradação de compostos xenobióticos, como, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (MATHEUS & OKINO, 1998). Portanto, faz-se necessário pesquisas que possam subsidiar sobre o potencial da atividade enzimática desses fungos. A produção da massa micelial é fator importante, utilizada em estudos sobre biosorção de metais pesados. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de massa micelial do fungo amazônico *Pycnoporus sanguineus*, em meio contendo surfactante.

METODOLOGIA:

O fungo *Pycnoporus sanguineus*, foi coletado, na cidade de Manaus. Pequenos fragmentos do carpóforo foram crescidos em meio BDA para produção de cultura pura. A produção de biomassa foi quantificada em meio Czapeck, suplementado com Tween- 80 na concentração de 1,5%. Para análise comparativa foi utilizado meio controle contendo Czapeck. A massa micelial foi medida a cada 7 dias no período de 17 dias para observação do período de maior produção micelial, sendo obtida após filtragem de 100mL do meio de cultura (crescimento dos fungos) em kitasato com papel filtro Whatman n° 1, com sucessivas lavagens com 100mL de água destilada. Após esse processo o papel filtro foi seco em estufa a 45°C até peso constante. A massa micelial foi calculada através do peso final menos o peso inicial, dividido novamente pelo peso inicial e multiplicado por cem.

RESULTADOS:

De um modo geral, em valores absolutos a maior produção de massa micelial (3,5%) ocorreu em meio Czapeck suplementado pelo surfactante tween-80 na concentração de 1,5%, com uma produção maior do que no meio controle sem acréscimo desse suplemento. Teste estatístico "t-student" mostrou que ao nível de 5% de significância a produção de biomassa em meio suplementado com surfactante não-iônico é significativamente maior do que no meio sem acréscimo dele. Sendo que o padrão de crescimento em meio com surfactante mostrou-se irregular com dois picos máximos de crescimento, o primeiro pico ocorreu 24h após a inoculação (5,8%) e o segundo com uma semana de crescimento, quando a partir daí ocorreu um decréscimo até o final do crescimento. Vale ressaltar também que surfactantes tem sido utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos.

CONCLUSÃO:

A produção de biomassa por *Pycnoporus sanguineus* é influenciada pelo uso de surfactante não-iônico.

Instituição de Fomento: FAPEAM, CAPES, UEA

Palavras-chave: *Pycnoporus sanguineus*, Tween 80, Biomassa.



SECREÇÃO DE LIGNINA-PEROXIDASE (LiP) E MANGANÊS-PEROXIDASE (MnP) DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus* EM FERMENTAÇÃO ESTACIONÁRIA

Elaine Pires Soares ¹
 Solange Pires de Araujo ²
 Marcia Jaqueline Mendonca Maciel ¹
Adriana da Silva Nunes ¹
 Helena Camarao ¹
 Ademir Castro e Silva ¹

1. Universidade do Estado do Amazonas
 2. Universidade Federal do Amazonas

INTRODUÇÃO:

Os fungos de podridão branca degradam a lignina mais rápida e extensivamente do que outros grupos de microrganismos e são os únicos grupos de organismos capazes de degradar completamente a lignina para dióxido de carbono e água (Eriksson *et al.*, 1990). As enzimas responsáveis pela degradação da lignina são principalmente lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP) e lacase. O potencial dessas enzimas ligninolíticas na indústria e biotecnologia tem estimulado pesquisas sobre sua atividade em fungos (Vikineswary *et al.*, 2006; Songulashvili *et al.*, 2007). A LiP e a MnP apresentam potencial uso na indústria alimentícia, indústria de celulose e papel, na indústria têxtil, na bioremediação e para síntese orgânica. (Lamascolo *et al.*, 1999; Barbosa *et al.* 2008; Sigoillot *et al.*, 2005; Maijala *et al.*, 2007; Robles-Hernandez *et al.*, 2008; Champagne & Ramsay, 2005; Wen *et al.*, 2009; Iwahara *et al.* 2000). No setor médico e farmacêutico a LiP vem sendo pesquisada para uso em cremes para redução de pigmentação da pele (Belinky *et al.*, 2005). Considerando o potencial dessas peroxidases para aplicação industrial, o presente trabalho objetiva avaliar a atividade enzimática da LiP e MnP secretadas por *Pycnoporus sanguineus* em meio suplementados com diferentes fontes de carbono.

METODOLOGIA:

Cepa de *Pycnoporus sanguineus* foi coletada na zona rural do município de Manaus. Pequenos fragmentos do carpóforo foram inoculados em meio extrato de malte para posterior obtenção da cultura pura utilizada para determinação enzimática. O meio de crescimento foi composto de 3g de NaNO₃, 0,5 g KPO₄, 0,5 mg MgSO₄·7H₂O; 0,5g KCl e 0,01 FeSO₄·7H₂O, 24 mEq./l de NaNO₃. O meio foi acrescido individualmente de α -celulose Sigma-Adrich (USA), xilana (Fluka Biochemika, Switzerland), dextrose anidra e serragem de madeira de *Calophyllum brasiliensis* e *Aniba sp* com e sem extrativos (extração com acetato de etila:etanol:água, 1:1:1). A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia proposta por Tien & Kirk (1984) com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 460 nm ($\epsilon = 29.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Todo o teste foi feito em triplicatas.

RESULTADOS:

No meio acrescido de glicose a atividade de LiP (46,08 U.L⁻¹) foi 2,7 vezes menor do que o controle (125,6 U.L⁻¹) (sem acréscimo dessa fonte de carbono). O meio com α -celulose aumentou em 65% a atividade de LiP. Nos meios com lignocelulósico (serragem de madeira) sem tratamento químico para a retirada dos "extrativos", LiP foi ligeiramente maior em comparação com aquele onde ocorreu a extração desse material. Podemos inferir que alguns desses compostos podem estar contribuindo para a síntese dessa enzima. De modo geral, todos os suplementadores contribuíram para o aumento da secreção de MnP. A menor atividade de MnP (0,83 U.L⁻¹) ocorreu no meio acrescido de glicose embora tenha sido maior (0,38 U.L⁻¹) do que no controle (sem essa fonte de carbono). A maior atividade ocorreu no meio acrescido com serragem de madeira de *Aniba sp* sem extração dos extrativos (14,67 U.L⁻¹), sendo 38 vezes maior em comparação com controle (sem adição dessa fonte de carbono). Atividade de MnP em meio de cultura contendo serragem de madeira de *Calophyllum brasiliensis* com a extração dos extrativos (13,16 U.L⁻¹) foi 4,6 maior do que sem extrativos (2,86 U.L⁻¹). Aparentemente, o efeito sinérgico de alguns extrativos pode contribuir para o aumento da atividade de MnP.

CONCLUSÃO:

O acréscimo de α -celulose no meio czapek-Dox contribui com aumento de 65,5% na secreção de lignina-peroxidase (LiP). A serragem da madeira de *Calophyllum brasiliensis*, sem extrativos, acrescida ao meio czapek-Dox aumentou em 360% a secreção de manganês-peroxidase (MnP), ao contrario da serragem de *Aniba sp.*, com a presença de extrativos, que aumentou a secreção dessa enzima em 3.760%. O meio de crescimento acrescidos de xilana, serragem de *Calophyllum brasiliensis*- com extrativo, serragem de *Calophyllum brasiliensis*- sem extrativos, serragem de *Aniba sp.* - com extrativos e *Aniba sp.* sem extrativo aumentaram a secreção de lignina-peroxidase (LiP) em 7,5%, 50,5%, 23,7%, 20,4% e 18,4% respectivamente.

Instituição de Fomento: CAPES, FAPEAM, UEA.

Palavras-chave: peroxidases, fungo amazônico, madeira.



OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA ENCONTRADOS NO MUNICÍPIO DE PARINTINS-AM

Jorge Pontes Koide¹
 Cynara da Cruz Carmo¹
 Andrey Azedo Damasceno¹
 Cássia Valente da Silva¹
Adriana da Silva Nunes¹
 Ademir Castro e Silva¹

1. Universidade do Estado do Amazonas-UEA

INTRODUÇÃO:

Atualmente, à medida que se observa o ambiente como um todo, percebe-se a necessidade de compreender detalhe do funcionamento do "bio" componente, o que por sua vez, tem possibilitado o desenvolvimento de novas atividades industriais, referidas como biotecnologias ambientais (VANDEVIVERE & VERSTRAETE, 2001). Portanto, dada a importância industrial de fungos como o basidiomicetos do pouco que se conhece sobre eles, pretende-se identificar quais as melhores condições de crescimento em diferentes meios de cultura e pH para melhor otimizar o seu potencial biotecnológico, e os resultados oriundos deste trabalho se revestem de grande importância para a biotecnologia no Estado do Amazonas, uma vez que volta-se a aplicação industrial de fungos que notadamente são reconhecidos como apenas deterioradores de madeira. Este trabalho tem por Objetivo Geral determinar as condições de crescimento dos fungos basidiomicetos encontrados no município de Parintins - Am, em diferentes meios de cultura e pH. E por específicos: testar o crescimento dos fungos basidiomicetos encontrados no Município de Parintins - Am, em meios de cultura diversos como: Agar sabourand e Malte.

METODOLOGIA:

Neste estudos foram utilizadas linhagens sendo que as mesmas foram coletadas nas serrarias e em áreas ao redor de Parintins. As amostras foram desidratadas: os corpos frutíferos foram espalhados em local limpo (mesa ou bancada), que receberam luz do sol e mantidos em temperatura ambiente, para que os mesmos fossem utilizados durante o período de execução do trabalho. Para otimização do meio de cultura, foram utilizados o meio Sabourand 4% e meio Agar-malte + Dextrose. Para quantificar o crescimento fúngico foi utilizado o método da placa de Petri e mensurada a progressão da fronteira micelial contra o tempo, uma vez ao dia. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Baseado em Castro e Silva, 1996, foi estudada a faixa de pH 4,0 - 7,0. O reajuste para cada caso foi realizado com NaOH 1,0 M e H₂SO₄ 1,0 M. Para evitar a degradação do Agar abaixo de pH 5,0 o ajuste foi feito após a autoclavagem. Posteriormente foram inoculados micélios dos fungos nas placas e o crescimento ocorreu em temperatura ambiente. Quanto ao parâmetro temperatura, foi considerada a escala com variação de 25°C, 30°C e 35°C, testando-se com isso ao mesmo tempo as duas variáveis.

RESULTADOS:

Os fungos estudados mostraram preferência por meio ácido (pH ótimo 6,0) e temperatura ótima na faixa de 30-35 °C. As cepas fungicas foram mensuradas e fotografadas obtendo-se os dados do crescimento fungico. Foram analisados cinco fungos basidiomicetos sendo mensurado a fronteira micelial em função do tempo em um período de quatro a sete dias. No meio Sabourand o aparecimento do micélio foi observado 12 horas após a inoculação, para todos os fungos inoculados. Foi possível visualizar o avanço da fronteira micelial em função do tempo, num período de dois a cinco dias. Pode-se observar que o maior avanço no crescimento foi obtido a partir do segundo dia, sendo a melhor média obtida já no terceiro dia, para *Lentinus crinitus* e *Agaricales*. No meio Agar-malte o aparecimento do micélio foi observado 18 horas após a inoculação, para todos os fungos inoculados. Foi possível visualizar o avanço da fronteira micelial em função do tempo, num período de dois a seis dias. Pode-se observar que o maior avanço no crescimento foi obtido a partir do terceiro dia, sendo a melhor média obtida já no terceiro dia, para *Lentinus crinitus* e *Agaricales*. Estes dados foram obtidos graças à obtenção da média de crescimento diário da fronteira micelial.

CONCLUSÃO:

O presente trabalho permitiu o estudo da otimização das condições de crescimento, em relação a meio de cultura, que melhor favoreça o crescimento de uma cepa do fungo amazônico Basidiomiceto. A maior velocidade de crescimento foi obtida em meio Sabourand, uma vez que a placa já estava totalmente preenchida já no segundo dia. As diferenças observadas quanto às características culturais da colônia, nos meios Sabourand e Agar malte, podem estar relacionadas com as fontes de nutrientes que compõem cada meio. Foi possível a observação de crescimento micelial já nas primeiras 12 horas, para o meio Sabourand e 18 horas para o meio Agar-malte. O resultado obtido discorda de COELHO (1991), que observou o aparecimento do micélio somente duas semanas após a inoculação e neste trabalho foi possível a observação de crescimento micelial já nas primeiras 12 horas, para o meio Sabourand e 18 horas para o meio Agar-malte.

Instituição de Fomento: FAPEAM

Palavras-chave: Basidiomycota, Cepa, Micélio.



CRESCIMENTO DE DIFERENTES CEPAS DE *Pycnoporus sanguineos* EM “CHORUME” OBTIDO NO LIXÃO MUNICIPAL DE PARINTINS

Autores: NUNES, A.S., TAVARES, B.P., SOUZA, P.L., SOARES, E.P., CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM

Introdução: O chorume é um resíduo líquido de elevada carga orgânica e forte coloração, produzida pela decomposição química e microbiológica dos resíduos sólidos depositados em um aterro. De maneira geral, o chorume pode ser considerado como uma matriz de extrema complexidade, composta por quatro frações principais: matéria orgânica dissolvida, compostos orgânicos xenobióticos, macrocomponentes inorgânicos e metais potencialmente tóxicos. Por sua vez, pesquisas vêm sendo realizadas para tratamento enzimático desse tipo de resíduo utilizando-se fungos que produzem enzimas oxidativas capazes de quebrar compostos recalcitrantes em moléculas menores diminuindo a toxicidade da substância em teste. Considerando a grande diversidade fungica da região amazônica, e o pouco que se conhece objetivou-se avaliar a produção de biomassa fúngica por três diferentes cepas de *Pycnoporus sanguineos* em chorume do lixão de Parintins. **Material e métodos:** Carpóforos do fungo *Pycnoporus sanguineos* foram coletados em três diferentes áreas no município de Parintins/AM, codificados em cepa 1, cepa 2 e cepa 3. Foram cultivados em meio BDA. Para produção de biomassa foi utilizado meio contendo água estéril e chorume em concentração 0,5%. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em meio líquido em condição estacionária, em intervalos de 13, 14, e 15 dias, utilizando-se o método de filtragem alíquota em papel filtro para quantificação da biomassa produzida. **Resultados e discussão:** As linhagens testadas apresentaram crescimento utilizando o chorume como fonte de carbono. Em valores absolutos a maior produção de biomassa ocorreu para CEPA 1 (11,45%) no 13º dia de crescimento seguida das cepas 2 e 3. Ressalta-se que essa cepa 1 apresentou uma rápida pigmentação. O crescimento em chorume dessas linhagens mostra que as mesmas possuem atividade enzimática capaz de quebrar compostos presentes no chorume. Teste ANOVA ao nível de 95% de probabilidade mostrou que estatisticamente não existe diferença no crescimento entre as linhagens de *P. sanguineus* testadas. **Conclusão:** *P. sanguineus* apresenta potencial para degradação dos compostos presentes no chorume. Faz-se necessário o estudo enzimático para identificar quais possíveis enzimas poderiam estar atuando nessa atividade.

Palavras-chave: Biomassa, Chorume, Enzimas oxidativas, Região Amazônica, *Pycnoporus sanguineos*



CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM RESÍDUO DE “CHORUME”

Autores: TAVARES, B. P., SOUZA, P.L., NUNES, A.S., SOARES, E.P., CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de arintins/AM

Introdução: O predomínio dos lixões a céu aberto é dos grandes problemas ambientais contemporâneos. Originados a partir da liberação de resíduos sólidos do lixo urbano. Quando biodeteriorados forma o chorume, um líquido percolado de cor escura, classificado como um resíduo sólido da classe I, potencialmente tóxico, e possuir uma alta carga de compostos recalcitrantes. Fungos de podridão branca têm se mostrado eficazes na degradação desses compostos, pois possuem um potencial enzimático diversificado. A região amazônica possui um potencial fúngico pouco explorado de suas enzimas para aplicação industrial e ambiental. Neste sentido, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o crescimento de fungos basidiomicetos como potenciais degradadores do chorume obtido do lixão a céu aberto do município de Parintins. **Material e métodos :** O crescimento foi avaliado em teste de placa de Petri. Foram utilizados quatro linhagens de fungos basidiomicetos FI-03, FV-12, FBL e *Pycnoporus sanguineus*. Os fungos foram incubados em meio BDA (M1) acrescido das seguintes concentrações de chorume coletado no lixão a céu aberto no município de Parintins: 20µ/L, 100 µ/L, 1000 µ/L e 10000 µ/L. O mesmo tratamento foi realizado em meio somente de ágar (M2) acrescido das diferentes concentrações de chorume. Foram incubados em estufa BDO em temperatura de 30°C e seu crescimento mensurado a cada 24 horas durante 7 dias. **Resultados e discussão:** O crescimento dos fungos em meio BDA(M1) acrescido de diferentes concentrações de chorume foi maior do que no meio Agar (M2) tendo chorume como única fonte de carbono. Neste último meio (M2), entretanto, a linhagem FV-6 mostrou maior crescimento (0,6cm) na concentração de 10⁴ µg.L⁻¹ de chorume como única fonte de carbono seguida da linhagem FBL para todas as concentrações, exceção para concentração de 20 µg.L⁻¹. O crescimento da linhagem FV-6 em meio BDA suplementado com chorume (M1) foi menor e lento iniciando após três dias de incubação, enquanto que para FBL após 24 horas. No meio (M1), o *P. sanguineus* apresentou o melhor crescimento em todas as concentrações testadas. **Conclusão:** Todas as linhagens testadas apresentaram-se promissoras para degradar compostos de chorume. As linhagens FV-6 e FBL são as mais promissoras para degradar compostos de chorume *in natura*.

Palavras-chave: crescimento, fungos basidiomicetos, chorume, degradação.



DESCOLORAÇÃO DO CORANTE “METILORANGE” POR FUNGOS AMAZÔNICOS

Autores: SOUZA, P. L., GONÇALVES, M. S., SOUZA, E.G., SOARES, E. P., NUNES, A. S., CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Introdução: Uma grande quantidade de corantes químicos é largamente utilizada em atividades industriais como indústria têxtil, fotográfica, de bebidas e outras, que geram grandes quantidades de resíduos tóxicos que afetam significativamente o equilíbrio ambiental. Esses efluentes contêm compostos de alto peso molecular, como metais pesados que apresentam enorme poder de resistência os tratamentos convencionais. Estudos têm mostrado que fungos de podridão branca tem se destacado como eficientes degradadores desses compostos, por possuírem um complexo enzimático capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos. A Amazônia possui um enorme potencial fúngico, porém em sua maioria ainda permanece desconhecido. Dessa forma objetivou-se selecionar fungos coletados na Região do Baixo Amazonas como potenciais descolorizadores do corante metilorange. **Material e métodos :** Foram utilizados nove linhagens de fungos provenientes do laboratório de microbiologia do CESP-UEA: *Pycnoporus sanguineos*, FV-6, FV-12, FI-2, FI-3, FI-9, FBL, CV-29 e CV-35. Três fragmentos de cerca de 5mm de diâmetro de cada fungo foram acrescidos em solução do corante metilorange, na concentração de 0,01% em 100 ml de água estéril, em balão de fundo chato de 250 mL, incubadas a 30°C, durante 27 dias. Foram feitas análises qualitativas (visuais) diárias para verificar a ação dos fungos no processo de descoloração do corante e avaliado a produção de biomassa através método de filtragem de alíquota em papel filtro. **Resultados e discussão:** Todos os fungos mostraram crescimento no meio testado. As linhagens FI-3 e FV-6 mostraram coloração escurecida do meio 5 horas após incubação, enquanto que as linhagens FI-9 e CV-29 após 6 dias de crescimento. Ressalta-se, entretanto, que FI-9 após o sétimo dia apresentou clareamento do meio. As linhagens FI-2, FBL, CV-35, *Pycnoporus sanguineos* e FV-12 apresentaram clareamento em um período de 9 dias. A linhagem FV-12 continuou clareando em relação ao controle. A maior produção de biomassa ocorreu para a linhagem FV-29 (4,7%) seguida de FV-6 (1,31%), e FI-2 (1,29%). As menores produção de biomassa (< 1%) foram obtidas pelas outras linhagens testadas sendo que FBL e FV-12 apresentaram uma baixa produção de biomassa de 0,27% e 0,26% respectivamente. **Conclusão:** Os fungos testados apresentaram uma relação positiva em relação à descoloração do corante “metilorange” indicando estarem utilizando o corante como fonte de alimento com destaque para a linhagem CV-29. Urge, entretanto, continuar estudos no sentido de verificar se a biomassa produzida está ou não adsorvendo o corante.

Palavras-chave: Metilorange, Fungos da Amazônia, Degradação, Corantes.



PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA EM MEIO SUPLEMENTADO COM TRÊS CASCAS DE MADEIRAS AMAZÔNICAS

Autores: DIAS, R.A., SILVA, C.V., NUNES, A.S., SANTOS, I.C.C., CORDEIRO, M.S.C., CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de arintins/AM.

Introdução: A utilização de madeiras para os mais diversos fins como: construção civil, produção de móveis, produção de celulose e outras, em especial a região do cerne e alburno, vem gerando grandes quantidades de cascas desperdiçadas. Um subproduto que pode ser aproveitado para a produção de biomassa por fungos basidiomicetos, fungos degradadores de madeira, que apresentam grande potencial enzimático e aplicabilidade na biosorção de metais pesados. A região amazônica é detentora de uma imensa diversidade fúngica, na grande maioria das vezes ausente de informações sobre o seu potencial biotecnológico e capaz de fornecer microorganismos com potenciais variados aplicáveis na indústria. Dessa maneira o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a influência de resíduos obtidos de três cascas de árvores amazônicas na produção de biomassa por quatro fungos basidiomicetos. **Material e Métodos:** Foram utilizadas quatro linhagens de fungos da classe dos basidiomicetos coletados na zona rural do município de Parintins/AM: CV-29, CV-39, CV-45 e CV-50. Fragmentos dos carpóforos foram purificados em meio BDA. Para produção de biomassa o meio BDA foi suplementado com cascas de três madeiras amazônicas: Ipê (*Tabebuia roseo-alba*), massaranduba (*Manilkara sp.*) e ucuúba (*Virola surinamensis*) nas concentrações 1% e 2%, incubados em BOD a 30° C. A determinação da biomassa produzida foi realizada através da diferença do peso da placa a cada 24 horas durante quatro dias. **Resultados e Discussão:** Para as duas concentrações testadas, as linhagens fúngicas apresentaram um comportamento positivo. A maior média em valores absolutos ocorreu para a linhagem CV-50 na concentração 2% (13.87g) em meio suplementado com casca de ucuúba, seguido da linhagem CV-29 (9.93g), CV-39 (9.29g), CV-50 (9.17g) e CV-45 em meio suplementado com casca de massaranduba na concentração 2% respectivamente. As linhagens CV-45 (9.28g), CV-50 (8.39g) e CV-29 (8.38g) também apresentaram altas médias de produção em meio suplementado com casca de ipê na concentração 2%. As menores produções ocorreram em meio suplementado com cascas de ucuúba e ipê na concentração de 1% para a linhagem CV-29. Teste ANOVA ao nível de 99% de probabilidade mostrou haver diferença na produção entre a linhagem CV-29 na concentração 1 % em meio suplementado com casca de ucuúba e as linhagens CV-29, CV-39, CV-45 e CV-50 todas na concentração 2% suplementado com casca de massaranduba. **Conclusão:** De modo geral as maiores produções ocorreram na concentração 2% nos meios suplementados com resíduos de cascas de massaranduba e ipê para as linhagens CV-29, CV-39, CV-45 e CV-50. Porém a linhagem CV-50 apresentou a maior média de produção em meio suplementado com casca de ucuúba (13.8g), por outro lado a linhagem CV-29 obteve a menor produção em meio contendo resíduo de casca de ucuúba (0.33g) na concentração 2%.

Palavras-chave: Madeira da Amazônia, Biomassa fúngica, Basidiomicetos.



INFLUÊNCIA DA AUTOCLAVAGEM DA GLICOSE NO CRESCIMENTO DE FUNGOS AMAZÔNICOS

Autores: SILVA, A.V., DIAS, R.A., SILVA, M.A., SOARES, E.P., NUNES, A.S., CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de arintins/AM.

Introdução : Os requisitos nutricionais para o crescimento de fungos são caracterizados por fontes de carbono e minerais. Dentre as fontes de carbono a glicose é uma das mais utilizadas. A autoclavagem do meio suplementado com glicose faz com que a alta temperatura quebre as cadeias longas desses açúcares formando monossacarídeos de cadeias pequenas e subprodutos, que podem ser responsáveis pelo escurecimento do meio (Reação de Minard). Alguns fungos podem utilizar ou não esses produtos como requisito nutricional para seu crescimento. Não existem informações sobre o uso do produto da glicose da reação em alta temperatura em fungos amazônicos. Portanto, este trabalho objetiva verificar se o meio com glicose autoclavada ou não influencia no crescimento de cinco fungos amazônicos. **Material e métodos:** Para os testes utilizaram-se cinco fungos provenientes do Laboratório de Microbiologia do CESP – UEA, *Pycnopus sanguineos*, FV-6, FV-12, FIO-3 e FBL. Para o cultivo dos fungos, utilizou-se 500 mL de meio BDA, com 7,5 g de glicose para cada tratamento. No primeiro a glicose foi autoclavada juntamente com o meio, no segundo a glicose foi adicionada após a autoclavagem do meio. O crescimento da fronteira micelial foi mensurado a cada 24hrs durante 10 dias, em temperatura de 30° C. Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas. **Resultados e discussão:** A glicose em alta temperatura propicia a formação de monossacarídeos e possivelmente outros produtos oriundos da síntese de transformação que ocorre em condições de alta temperatura. Estes produtos dão a cor escura ao meio. Alguns fungos utilizam esses açúcares de cadeias menores para acelerar o seu crescimento. A cepa FI-3, por exemplo, possivelmente utilizou os monossacarídeos para este fim. Para o crescimento nos dois tratamentos (meio com glicose não autoclavada e autoclavada), não houve diferença dentre as cepas com exceção da cepa FI-3, onde apresentou maior crescimento no meio onde a glicose foi autoclavada (2,29 cm). Em termos absolutos a cepa FV-12 foi a que apresentou maior crescimento médio no meio suplementado com glicose não autoclavada. O menor crescimento, onde a glicose não foi autoclavada aconteceu para o fungo *Pycnopus sanguineos*. Nos tratamentos com meio com glicose autoclavada, não houve diferença de crescimento entre as cepas ao nível de 99% de probabilidade. Por outro lado, no meio com glicose não autoclavada a cepa FV-12 foi que apresentou maior crescimento entre os tratamentos (2,74 cm). **Conclusão :** De modo geral, no meio com glicose autoclavada o crescimento em termos absolutos é maior, embora essa diferença não seja significativa ao nível de 95% de probabilidade. Exceção para a cepa FV-12 onde o crescimento com glicose não autoclavada foi maior.

Palavras-chave: Glicose, Crescimento, Fungos, Fonte de carbono.



CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM DIFERENTES FAIXAS DE pH EM MEIO SUPLEMENTADO COM FARINHA DA CASCA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum* MEYER)

Mariane dos Santos Gonçalves¹
Adriana da Silva Nunes¹
 Naím Farias de Castro¹
 Ademir Castro e Silva¹
 Elaine Pires Soares¹

1. Dep.Ciências Biológicas - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
2. Mestranda em Biotecnologia e Recursos Naturais - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
3. Prof. Msc./Orientadora - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
4. Prof. Dr./ Co-orientador - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
5. Mestranda em Biotecnologia e Recursos Naturais - Universidade do Estado do Amazonas - UEA

INTRODUÇÃO:

Os fungos tem, comparativamente, uma ampla faixa de pH sobre a qual podem crescer e o pH ótimo para a maioria dos fungos está no lado ácido da escala, abaixo do pH 7. Qualquer curva de pH – crescimento é o sumário de todos os efeitos do pH sobre inúmeros fatores que controlam o crescimento e não representa um efeito unitário. Fungos invariavelmente alteram o pH do meio onde crescem. Por outro lado, os fungos necessitam de alguns elementos nutricionais que são essenciais para seu crescimento onde encontram-se os macro-elementos (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, etc.) os quais são requisitados em grande quantidade pelos fungos e podem ser fatores determinantes no rendimento e na produção de biomassa, onde esta, por sua vez, pode ser empregada na biosorção de metais pesados. Poucos trabalhos nesse sentido são realizados com fungos da região do Baixo Amazonas, portanto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o crescimento micelial de fungos amazônicos da classe dos basidiomicetos em meio de cultura alternativo a base de farinha da casca de tucumã na concentração 0,5% em diferentes faixas de pH.

METODOLOGIA:

Carpóforos de fungos Basidiomicetos foram coletados no perímetro rural do município de Parintins/AM, codificados em FV-12, FV-06, FI-09, FI-03 e *Pycnoporus sanguineus*. Para obtenção de cultura pura, pequenos fragmentos dos carpóforos foram crescidos em meio de cultura BDA. Para os testes de crescimento linear utilizou-se a farinha da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) previamente seca e esterilizada na concentração 0,5% e nas faixas de pH 4, 6, 8, 10 e 12. A medição do crescimento foi realizada a cada 24 horas por um período de cinco dias ou até o preenchimento total da placa, à temperatura de 30° C. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.

RESULTADOS:

Em dados absolutos o maior crescimento micelial na concentração 0,5% na faixa de pH 4 ocorreu para o fungo *Pycnoporus sanguineus* com 2,5 cm. Na faixa de pH 6 novamente *Pycnoporus sanguineus* obteve o maior crescimento (2,5 cm) seguido dos fungos FV-12 e FI-03 (2,28 cm). Já na faixa de pH 8 o melhores crescimentos ocorreram para as linhagens FV-12 e FI-03 com 2,2 cm. Nas faixas 10 e 12 em meio acrescido com farinha da casca de tucumã *Pycnoporus sanguineus* apresentou o melhor crescimento com 2,15 cm e 2,25 cm respectivamente. O crescimento micelial dos fungos testados em meio suplementado com a farinha da casca de tucumã na concentração 0,5% não mostrou diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO:

O crescimento micelial dos fungos testados em meio suplementado com farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) na concentração 0,5% nas faixas de pH 4, 6, 8, 10 e 12 apresentou relação positiva e resultados promissores, uma vez que os fungos basidiomicetos amazônicos testados apresentaram crescimento nas faixas de pH 4, 10 e 12 contrariando dados da literatura que indica as faixas entre 5 e 7 como pontos ótimos para crescimento.

Palavras-chave: pH, Meio de cultura alternativo, Fungos amazônicos.



EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FUNGOS AMAZONICOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM CHORUME

Autores: NUNES, A. S, SOUZA, E.A, SOUZA, P.L , SOARES, E.P, CORDEIRO, M.S.C , SILVA, A.V , GALÚCIO, V.A , CASTRO E SILVA, A.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: O pH exerce grande influência sobre o metabolismo de fungos, que pode num meio afetar o crescimento direta ou indiretamente. Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH. Uma das características que podem sofrer variação é a pigmentação que pode diversas vezes estar relacionada com o pH do substrato, pois o microorganismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos de natureza química ou física. Outro efeito é sobre a permeabilidade da célula, a qual é alterada com diferentes graus de acidez ou alcalinidade. Pouco se conhece sobre o efeito do pH no crescimento de fungos da região amazônica e sua fisiologia, menos ainda quando submetidos a alto grau de estresse nutricional, como por exemplo com a presença de chorume, líquido resultante da decomposição de resíduos sólidos. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos do pH no crescimento *in vitro* de fungos amazônicos em meio de cultivo acrescido com chorume em fermentação semi-sólida. **Material e métodos:** Foram utilizadas duas linhagens de fungos basidiomicetos coletadas na região de Parintins/AM, codificados em FI-03 e FV-12. Para o meio de cultivo foi utilizado chorume coletado do lixão municipal de Parintins/AM, previamente autoclavado e oxigenado por 2 horas e posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O crescimento fúngico foi avaliado em teste de placa Petri, contendo apenas Agar e chorume nas concentrações: 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5% nas faixas de pH 3, 5, 7, 9 e 11. Os tratamentos foram incubados em estufa BOD a 30°C e o crescimento mensurado a cada 24 horas durante cinco dias. **Resultados e discussão:** Em valores absolutos os maiores crescimentos radiais em ordem decrescente ocorreram para o fungo FV-12 na concentração 2,5% em pH 5 (1,58cm), seguido do fungo FI-03 na concentração 0,5% em pH 9 (1,45cm), por conseguinte FV-12 concentração 0,5% em pH 11 (1,40cm) e 1,35 cm para o fungo FI-03 na concentração 1% em pH 7. Portanto, os fungos testados suportaram condições de estresse nutricional em variadas faixas de pH, apontando que cada fungo tem suas exigências específicas. Não houve diferença estatística entre os crescimentos nas faixas de pH e concentrações testadas. **Conclusão:** Portanto, o pH e a acidez do meio podem ser fatores determinantes no crescimento radial e em nos demais comportamentos fisiológicos dos fungos amazônicos testados.



PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS AMAZONICOS UTILIZANDO CHORUME COMO FONTE DE CARBONO

Autores: SOUZA, P. L, NUNES, A.S, SOARES, E.P, VALENTE, P.M.R, SILVA, A.V, GALÚCIO, V.A, CASTRO E SILVA, A, KATAK, R.M.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: O lixo urbano é um dos problemas ambientais mais preocupantes da atualidade, por sua produção acelerada e seu descarte na maioria das vezes indiscriminado em locais inapropriados causando impactos negativos ao meio ambiente e a população, pela presença do chorume, líquido percolado de alta toxicidade e odor desagradável gerado a partir da biodeterioração da matéria orgânica. Pesquisas recentes utilizando fungos de podridão branca evidenciam a versatilidade destes microorganismos em biodeteriorar a matéria orgânica e até inorgânica, apresentando-se como potenciais degradadores deste líquido rico em metais potencialmente tóxicos. A exploração da atividade dos microrganismos é a principal estratégia utilizada em tratamento biológico para recuperação de ambientes poluídos e a Amazônia mostra-se como um enorme laboratório capaz de fornecer fungos capazes de degradar chorume. Portanto, o presente projeto visou avaliar fungos amazônicos com potencial para produção de biomassa em meio acrescido de diferentes concentrações de chorume. **Material e métodos:** Carpóforos de fungos basidiomicetos foram coletados na região de Parintins/Am, codificados em FV-12, FI-02 e *Pycnoporus sanguineus*. Para produção de biomassa fúngica foi utilizado meio contendo água estéril e chorume (total 150 mL) nas concentrações 1%, 2% e 4% em erlenmeyer de 250 mL coletado no lixão de Parintins, previamente esterilizado a 121°C, centrifugado e oxigenado. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em meio líquido em condição estacionária, em período de 60 dias à 30°C, utilizando-se o método de filtragem alíquota em papel filtro para quantificação em porcentagem da biomassa produzida. **Resultados e discussão:** Em valores absolutos a maior produção de biomassa fúngica em meio acrescido de chorume ocorreu para a linhagem de *Pycnoporus sanguineus* na concentração 2% (2,27%), seguida da linhagem FI-02 na concentração 1% (2,04%) e de *Pycnoporus sanguineus* na concentração 4% (1,86%). A menor produção foi da linhagem FV-12 na concentração 1% (0,70%). No teste de ANOVA ao nível de 5% não houve diferença estatística entre os tratamentos. **Conclusão:** Todas as linhagens fúngicas amazônicas testadas apresentaram crescimento positivo em meio contendo apenas chorume in natura como fonte de carbono. Com destaque para o fungo *Pycnoporus sanguineus*, possível degradador de compostos recalcitrantes do chorume.



PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS AMAZÔNICOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DO POLITEREFTALATO DE ETILENO EM MEIO SUPLEMENTADO COM FARINHA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum Meyer*).

Autores: SILVA, A.V, SOARES, E.P, NUNES, A.S, TAVARES, B.P, DIAS, R.A, SOUZA, E.A, SOUZA, E.G, SILVA, M.A, CASTRO E SILVA, A.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Introdução: Pesquisas científicas estão sendo realizadas utilizando a biomassa fúngica na biodegradação de plásticos, biorremediação de solos e efluentes contaminados por metais de difícil degradação. Ressalta-se, que a produção de biomassa micelial pode estar estreitamente relacionada com os requisitos nutricionais de cada fungo, conhecimento este que pode contribuir para o melhoramento da produção. Considerando o potencial fúngico inexplorado da região amazônica, este trabalho tem como objetivo verificar a produção de biomassa por fungos basidiomicetos em meio acrescido com farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) no processo de degradação do polietileno tereftalato (PET). **Metodologia:** Foram utilizadas três amostras de fungos da classe dos Basidiomicetos coletados em Parintins/AM, *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos. Para a realização dos testes de degradação do polímero foi utilizado meio contendo 20g farinha da casca de tucumã e 500ml de água destilada. Amostras do polímero PET foram preparadas previamente (corte 1x1cm, peso e assepsia) e submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico, temperatura de + 28°C. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio previamente autoclavado, 5 amostras dos polímeros e os microrganismos em estudo. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em fermentação submersa, condição estacionária durante 30 dias e incubados à 30° C, utilizando o método de filtragem alíquota em papel filtro. **Resultados e discussão:** O fungo FBL apresentou a maior produção de biomassa (28,4%) no teste com PET temperatura de + 28°C. Por outro lado no teste PET 35°C a maior produção de biomassa ocorreu para o consórcio Pyc.+FBL+FV12 (25,1%). De modo geral os tratamentos com consórcios apresentaram maior produção de biomassa no teste PET 35°, sendo 15,5% e 10,8% para Pyc+FBL e Pyc+FV12 respectivamente. Pode-se enfatizar que houve correlação positiva para o consórcio Pyc+FBL+FV12 no tratamento PET + 28°C entre a degradação do PET (14,4%) e a produção de biomassa (12,8%). Nos tratamentos individuais PET 35°C o Pyc. sanguineus e FV12 apresentaram maior produção de biomassa, exceção para o fungo FBL que neste tratamento apresentou produção de biomassa 1,7 vezes maior em relação ao teste PET + 28°C. Neste tratamento também houve correlação positiva para o fungo *Pyc. sanguineus* entre a degradação do PET (15,2%) e a produção de biomassa (14,8%). Para a produção de biomassa em meio acrescido com a farinha de tucumã o teste de ANOVA a 5% de significância não apresentou diferenças estatística. **Conclusão:** O meio acrescido com a farinha da casca do tucumã como fonte de carbono apresentou relação positiva com a produção de biomassa fúngica e degradação de PET pelos três fungos amazônicos testados.



SECREÇÃO DE LACASE POR FUNGOS AMAZÔNICOS UTILIZANDO MEIO ACRESCIDO COM CHORUME IN NATURA

Autores: NUNES, A.S, SOUZA, P.L , CASTRO E SILVA, A , SOARES, E.P , VALENTE, P.M.R, SANTOS, I.C.C, MELO, J.L.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Microorganismos como fungos e bactérias têm tomado destaque nos últimos anos, no que diz respeito à recuperação ou minimização de áreas contaminadas por metais potencialmente tóxicos. Pesquisas recentes mostram que enzimas oxidativas produzidas por fungos basidiomicetos de decomposição branca estão envolvidas na degradação e mineralização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, herbicidas, corantes azo, polifenóis entre outros. Podendo representar uma alternativa viável na degradação de compostos recalcitrantes presentes no chorume, devido ao seu complexo e diversificado potencial enzimático. Os fungos da região amazônica são em sua magnitude desconhecidos em relação à sua vasta região territorial e riquezas naturais apresentando-se como potenciais deterioradores de substâncias potencialmente tóxicas, como o chorume. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade da enzima Lacase produzida por fungos da Amazônia em meio acrescido de chorume proveniente do lixão municipal de Parintins/Am. Linhagens de fungos basidiomicetos codificados em: FV-12, FI-02 e *Pycnoporus sanguineus* foram utilizadas nos tratamentos enzimáticos em meio acrescido das concentrações 1%, 2% e 4% de chorume. As culturas foram incubadas em BOD à 30° C durante 60 dias e sua determinação enzimática realizada em espectrofotômetro. O controle foi realizado com a ausência de chorume. A mistura reacional foi composta de 50 µL da amostra filtrada; 0,95 mL tampão tartarato de sódio pH 4,5; 0,1mL seringaldazina e 0,1mL de água destilada, sendo monitorado o aumento da absorbância em 525 nm durante 60 segundos, utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ cm}^1 \cdot \text{M}^{-1}$. De modo geral a enzima lacase foi produzida tanto no controle quanto nos tratamentos com chorume. A linhagem FV-12 apresentou no controle 1.14 U/L⁻¹, paralelamente na concentração 2% apresentou 1.70 U/L⁻¹, seguida da concentração 1% com 1,20 U/L⁻¹ e 1,14 U/L⁻¹ na concentração 4%. Para as demais linhagens a atividade não foi significativa. Ao nível de 95% de probabilidade não houve diferença na atividade enzimática entre as três linhagens testadas. Todos os fungos testados apresentaram potencial para produção de lacase em estado de fermentação líquida nas concentrações 1%, 2% e 4% de chorume, com destaque para a linhagem FV-12.



SECREÇÃO DE LACASE POR CONSÓRCIO DE FUNGOS AMAZONICOS.

Autores: SOARES, E.P, MUNIZ, V.A, NUNES, A.S, SILVA, A.V, SOUZA, P.L, GALÚCIO, V.A, KATAKI, R.M, CASTRO E SILVA.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: A utilização de organismos fúngicos em bioprocessos envolvendo descontaminação ambiental vem crescendo nos últimos tempos, no que se refere à utilização de sistema enzimáticos, devido às vantagens de sua utilização. Devido à sua baixa especificidade por substratos e seu potencial para utilização em aplicações biotecnológicas, as lacases fúngicas tem sido objeto de investigação. Lacases são enzimas envolvidas na degradação de lignina e tem a capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos. Neste contexto, surge a biodiversidade fúngica amazônica inexplorada com potencial para a degradação de plásticos sintéticos. Este trabalho visa avaliar a atividade enzimática de lacase por consórcio de fungos amazônicos em meio de cultivo contendo farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) no processo de biodegradação do polietileno tereftalato (PET). **Material e métodos:** Foram utilizadas consórcio de três estirpes fúngicas da classe dos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL. O meio de cultivo foi composto de 20g farinha da casca de tucumã e 500ml de água destilada. Amostras do PET foram submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros, os fungos em estudo e incubados à 30° C. A determinação de lacase - Lac foi avaliada através de filtrados de enzima bruta obtido em fermentação submersa e condição estacionária durante 30 dias, sendo centrifugado a 1.400 rpm, durante 5 minutos e utilizado o sobrenadante para a leitura em espectrofotômetro. O método baseia-se na oxidação do substrato enzimático de seringaldazine para sua forma de quinona com absorção à 525 nm ($\epsilon=65000M^{-1} cm^{-1}$). **Resultado e discussão:** O consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 nos testes PET +28°C foi o que apresentou maior produção de Lac (10,2 U.L⁻¹). No entanto, esse consórcio de fungos em teste PET 35°C apresentou uma atividade de Lac 10 vezes menor. Pode-se ressaltar que ocorreu uma correlação positiva para os tratamentos com o consórcio Pyc+FBL+FV12 entre a maior atividade de Lac (10,2 U.L⁻¹) e para a perda de massa do PET (14,4%) no ensaio PET+28°C. No entanto, a maior perda de massa ocorreu com o consórcio Pyc+FBL (28,7%) e (19,7%) nos teste PET +28°C e 35°C respectivamente, porém no que diz respeito a atividade de Lac com os referidos consórcio nestes tratamentos, os mesmos não apresentaram resultados significativos, sendo 0,1 U.L⁻¹ e 3,3 U.L⁻¹ respectivamente. **Conclusão:** De modo geral ocorre a atividade de lacase -Lac no meio testado, no entanto, destaca-se o consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 que apresentou maior produção de Lac e perda de massa significativa do polímero no teste PET +28°C.



AVALIAÇÃO DE ENZIMAS OXIDATIVAS PRODUZIDAS POR FUNGOS AMAZÔNICOS EM BIORREATOR DE COLUNA UTILIZANDO RESÍDUO AGRO-INDUSTRIAL

Autores: TAVARES, B. P; NUNES, A.S; SOARES, E.P; CASTRO E SILVA, A; SOUZA, E.A; TRINDADE, D.B; DIAS, R.A; MELO, J.L; VALENTE, P.M.R.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Da decomposição da matéria orgânica e inorgânica resulta o chorume, líquido viscoso, de odor forte e desagradável, que apresenta em sua composição metais potencialmente tóxicos e compostos recalcitrantes danosos ao homem e ao ecossistema como um todo. Podendo atingir lençóis freáticos, rios e córregos, levando a contaminação destes recursos hídricos. Nesse contexto, tratamentos biológicos utilizando enzimas fúngicas têm apresentado êxito na degradação ou mineralização de compostos de elevada massa molecular. No que diz respeito a região amazônica pouco ou quase nenhum estudo nessa área tem sido realizado com os fungos dessa região, que possivelmente apresentam potencial para aplicações em biorremediação ambiental. Portanto o objetivo dessa pesquisa foi avaliar um fungo amazônico e seu potencial para degradação do chorume obtido do lixão a céu aberto do município de Parintins/AM em sistema de biorreator de coluna acrescido de resíduo agro-industrial. **Material e métodos:** O experimento ocorreu em colunas de 20x4cm, utilizando uma linhagem de fungo Basidiomiceto, codificado em FI-03. Fragmentos foram incubados em colunas contendo 20g do resíduo agroindustrial (cana-de-açúcar ou casca de tucumã). O sistema foi suplementado com 20ml de chorume previamente autoclavado, centrifugado e oxigenado. As colunas foram mantidas a 30°C e oxigenadas a cada 12 horas por um período de 100 dias. A leitura enzimática foi realizada em espectrofotômetro sendo monitorado o aumento da absorbância em 525 nm durante 60 segundos para Lacase, 270 nm para Mn-Peroxidase e 310 nm para Li-Peroxidase. **Resultados e discussão:** O resíduo da casca de tucumã apresentou uma perda de massa de 37,75% e o bagaço cana-de-açúcar 22,75%. Na análise da atividade enzimática, Li-P nos resíduos da casca de tucumã e bagaço de cana-de-açúcar apresentou atividade de 52,80 U/L⁻¹ e 30,22 U/L⁻¹ respectivamente, seguida da atividade de Mn-Peroxidase em casca de tucumã com 11,11 U/L⁻¹ e bagaço de cana-de-açúcar 9,80 U/L⁻¹. Já a atividade de Lacase foi registrada em 0,185 U/L⁻¹ no resíduo da casca do tucumã e em 0,492 U/L⁻¹ no bagaço de cana-de-açúcar. **Conclusão:** O fungo amazônico apresentou potencial para produção de enzimas oxidativas (L.Peroxidase, M. Peroxidase e Lacase) nos dois resíduos agroindustriais testados, podendo atuar em processos de biorremediação ambiental como a degradação de compostos recalcitrantes do chorume.



SECREÇÃO DE LIGNINA PEROXIDASE (LiP) E MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) POR FUNGOS AMAZONICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAR POLIETILENO TEREFALATO.

Autores: SOARES, E.P; ANDRADE, F.S; NUNES, A.S; SILVA, A.V, SANTOS, I.C.C; VALENTE, P.M.R; GALÚCIO, V.A; CASTRO E SILVA.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Os fungos envolvidos na degradação das ligninas secretam diferentes enzimas extracelulares que catalisam reações que levam a degradação do polímero. As mais importantes são as ligninas peroxidases (Lip), manganês peroxidase (Mnp) e a lacase. Desta forma, surge o potencial fúngico ainda inexplorado da região do Baixo Amazonas, como alternativa para a degradação do polietileno tereftalato (PET). Essa região, sem ação antrópica mais contundente guarda ainda espécies fúngicas com potencial enzimático capaz de participar em vários processos industriais. Urge, portanto, a necessidade de prospecção dessa biodiversidade na busca de microorganismos capazes de produzir enzimas específicas com potencial para uso em aplicações biotecnológicas, em particular na degradação do PET. **Material e métodos:** Foram utilizadas três linhagens fúngicas da classe dos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos. Para a realização dos testes de degradação do polímero foi utilizado meio contendo 20g farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) e 500ml de água destilada. Amostras de PET foram preparadas previamente (corte 1x1cm, peso e assepsia) e submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizadas partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio previamente autoclavado, 5 amostras dos polímeros e os microrganismos em estudo, e incubados à 30° C. A determinação enzimática foi avaliada através de filtrados de enzima bruta obtido em fermentação submersa estacionária durante 30 dias. Para a atividade de LiP utilizou-se o método proposto por Tien-Kirk (1984) e a atividade de MnP foi baseada na metodologia de GLEN *et al.*, (1986); AITKEN & IRVINE, (1990). **Resultado e discussão:** Após 30 dias de fermentação submersa a atividade de LiP e MnP não apresentaram diferença estatística a nível de 5% de significância no teste de ANOVA entre os ensaios PET +28°C e PET 35°C. Em média a atividade de LiP foi 56,2 U.L⁻¹ para o controle e 55,2 U.L⁻¹ para o tratamento, enquanto que a MnP foi 61,8 U.L⁻¹ para o ensaio PET +28°C e 61,3 U.L⁻¹ para os ensaios PET 35°, tanto em testes individuais com em consórcios de fungos. Quanto aos testes para verificação de perda de massa do polímero o consórcio Pyc+FBL foi o que apresentou maior perda (28,7%), enquanto que a atividade de LiP com este consórcio, verificou-se que a maior atividade ocorreu com o tratamento (57,1 U.L⁻¹) e para a atividade de MnP o melhor resultado foi para o tratamento com a linhagem FBL (64,1 U.L⁻¹). **Conclusão:** Nos bioensaios realizados com as linhagens fungicas amazônicas verificou-se que todas apresentaram potencial para a produção de enzimas lignases, LiP e MnP no meio composto de farinha de tucumã, independente da perda de massa do polímero.



CRESCIMENTO DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM DIFERENTES FAIXAS DE pH EM MEIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO COM *Dioecorea trifida* L.F

Autores: GALUCIO, V.C.A.; SOUZA, E.A.; NUNES, A.S; SILVA, N.P.; SOARES, E.P.; SILVA, M.A.; DIAS, R.A.; CASTRO E SILVA, A.

1. Centro de Estudos em Energia, Ambiente e Biodiversidade-CEAB. 2. Universidade do Estado do Amazonas-UEA. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM-CESP.

Resumo

Introdução: Os fungos tem, comparativamente, uma ampla faixa de pH sobre a qual podem crescer e o pH ótimo para a maioria dos fungos está no lado ácido da escala, abaixo do pH 7. Qualquer curva de pH – crescimento é o sumário de todos os efeitos do pH sobre inúmeros fatores que controlam o crescimento e não representa um efeito unitário. Fungos invariavelmente alteram o pH do meio onde crescem. Por outro lado, os fungos necessitam de alguns elementos nutricionais que são essenciais para seu crescimento onde encontram-se os macro-elementos (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, etc.) os quais são requisitados em grande quantidade pelos fungos e podem ser fatores determinantes no rendimento e na produção de biomassa, onde esta pode ser empregada na biosorção de metais pesados. Poucos trabalhos nesse sentido são realizados com fungos da região do Médio Amazonas, portanto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o crescimento micelial de sete fungos amazônicos em meio regional de cará (*Dioecorea trifida* L.F) em diferentes faixas de pH. **Materiais e métodos:** Sete linhagens de fungos basidiomicetos FBL, FI-3, CV-50, FV-12, FV-6 FI-2 e *Pycnopus sanguíneos* foram cultivados em meio regional de cará (*Dioecorea trifida* L.F) em placa de Petri. Foi realizado o ajuste do pH com NaOH para as faixas 6, 8, 10 e 12. As linhagens foram incubadas a 30°C e mensuradas através da progressão linear da fronteira micelial a cada 24 horas durante 8 dias. **Resultados e discussão:** As sete linhagens de fungos toleraram variações de pH. As linhagens testadas FV-6, FI-3, CV-50 e FV-12 apresentaram crescimento nas faixas 6, 8, 10 e 12, porém os fungos *Pycnopus sanguíneos*, FBL e FI-2 não apresentaram crescimento na faixa de pH 12. As maiores médias de produção foram de *P.sanguíneos* nas faixas de pH 6 (2,31 cm) e pH 8 (2,30cm), seguido de FV-12 em pH 10 (2,10cm). Ao nível de 95% de probabilidade não houve diferença no crescimento entre os fungos testados nas diferentes faixas de pH. **Conclusão:** Fungos basidiomicetos ocorrentes na região amazônica, toleram variações de pH, podendo também se desenvolver em faixa de pH 8, 10 e 12, em oposição ao relatado em bibliografias, onde esta classe de fungos cresce entre pH 5.5 a 7. Faz-se necessário estudos com quantidades maiores de fungos para conhecer os diferentes comportamentos dos fungos amazônicos.



CRESCIMENTO MICELIAL E DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ALARANJADO DE METILA POR FUNGOS DA AMAZÔNIA.

Autores: SOUZA, E.G; NUNES, A.S; GALUCIO, V.C.A; SOARES, E.P; VALENTE, P.M.R; TRINDADE, D.B; CASTRO E SILVA.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Os processos industriais de tingimento de tecidos e a obtenção da celulose são atividades que produzem uma grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, extremamente daninhos ao meio ambiente por conterem metais potencialmente tóxicos como cloroligninas e clorofenóis. Por apresentarem enorme habilidade para oxidar especificamente compostos fenólicos, por meio de seus diversificados sistemas enzimáticos os fungos de podridão branca vêm sendo cada vez mais utilizados para biorremediação dos ecossistemas em geral através da degradação de compostos recalcitrantes. O grande potencial fúngico existente na região amazônica vem estimulando cada vez mais o aprofundamento e as novas descobertas da biotecnologia que se faz necessário devido o vasto campo de atuação desses organismos. Dessa maneira o objetivo desta pesquisa foi avaliar o crescimento micelial de fungos amazônicos e seu potencial de descoloração do corante metilorange em estado de fermentação semi-sólida. **Metodologia:** Foram utilizadas seis linhagens de fungos: *Pycnoporus sanguineus*, FV-12, FI-2, FI-3, FV-6, FI-9, FI-11, CV-29 e FBL. O meio de cultivo foi composto de 500 mL de água destilada estéril, 7,5 g de ágar e corante metilorange na concentração de 0,0002%. Fragmentos fúngicos de 5 mm de diâmetro foram inoculados no centro da placa de Petri e incubados a 30°C no escuro. A avaliação do crescimento foi realizada através da progressão da fronteira micelial a cada 24 horas por um período de 15 dias. **Resultados e discussão:** Em valores absolutos o maior crescimento ocorreu para a linhagem FI-3 (3,76cm) seguido de *P. sanguineus* (3,52cm), FI-2 (3,50cm) e FI-11 (2,77cm) respectivamente. Os menores crescimentos foram das linhagens FV-6 (2,24cm) e CV-29 (2,28cm). As linhagens FI-02, FI-03, FBL e *Pycnoporus sanguineus* apresentaram descoloração total em um período de 5 dias em estado de fermentação semi-sólida, seguidas das linhagem FI-11 em um período de 12 dias e o FV-12 em 13 dias. De acordo com teste ANOVA ao nível de 95% de probabilidade não houve diferença estatística entre os tratamentos. **Conclusão:** Das nove linhagens de fungos testadas seis apresentaram potencial para aplicação em bioprocessos de remoção de cor de efluentes têxteis em baixas concentrações ou no tratamento de outros resíduos sólidos coloridos, Porém, ainda existe a necessidade de um amplo conhecimento tecnológico para o aproveitamento desses organismos e suas estruturas.



CONSORCIO DE FUNGOS AMAZONICOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.

Autores: SILVA, A.V; SOARES, E.P; NUNES. A.S; ARAUJO S.P; VALENTE, P.M.R; GALUCIO, V.A; SOUZA, E.A; MELO, J.L; CASTRO E SILVA, A.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Atualmente, a grande maioria dos surfactantes disponíveis é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, as novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como, a preocupação ambiental entre os consumidores tem elevado a procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. As vantagens dos biossurfactantes quando comparados aos quimicamente sintéticos reside na biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade e produção econômica aceitável, tornando os biossurfactantes adequados para várias aplicações industriais. Neste sentido, a região do Baixo Amazonas apresenta-se como um grande laboratório, com uma biodiversidade fúngica em sua magnitude ainda inexplorada que apresenta possibilidades de aplicações nos mais diversos setores industriais. Portanto, o presente resumo visa avaliar a produção de biossurfactante por fungos amazônicos com a utilização de polímeros sintéticos em meio suplementado com resíduo agroindustrial. **Material e métodos:** Para os ensaios foram utilizados consórcio de três fungos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL, os quais foram incubados em meio de cultivo contendo 20g farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) e 500ml de água destilada. Amostras do polietileno tereftalato PET foram submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros e os fungos em estudo, e incubados à 30° C. As atividades de emulsificação foram determinadas através de agitação vigorosa em agitador magnético de tubos de 3,5 ml de caldo de cultura previamente filtrado em lã de vidro e 2,0 ml de hidrocarboneto de tolueno. Após 1 hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi medida em espectrofotômetro a 610 nm. Após 24 horas, as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros relativos à altura do halo e compactação máxima das bolhas formadas. **Resultado e discussão:** De modo geral, todos os fungos mostraram-se capazes de produzir biossurfactantes após 30 dias de fermentação submersa estacionária. A maior atividade de emulsificação ocorreu com o consórcio Pyc+FBL (Abs:0,802) para o ensaio PET +28°C. Em média a atividade de emulsificação com os consórcios foi 0,33 e 0,12 de absorvância para o teste PET +28°C e PET 35°C respectivamente. A maior formação do halo ocorreu com o consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 (PET +28°C) e para Pyc+FBL (PET 35°C) com 3 cm respectivamente. **Conclusão:** A presença de biossurfactantes no meio de cultura composto por farinha de tucumã pode estar favorecendo a utilização dos substratos plásticos como fonte de energia para os microorganismos, tornando os polímeros mais acessíveis ao processo de degradação.



AVALIAÇÃO DE FUNGOS AMAZONICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAÇÃO DO POLIETILENO TEREFTALATO – PET

Autores: SOARES, E.P; SILVA, A.V; NUNES, A.S; SOUZA, P.L; ARAUJO, S.P; VALENTE, P.M.R; MELO, J.L; CASTRO E SILVA.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Pesquisas comprovam a eficácia da utilização de microorganismos para degradar embalagens plásticas, ou pelo menos parte delas, em especial o polietileno tereftalato que apresenta-se como um dos principais causadores de impactos ambientais. Sendo de grande importância o estudo das condições ótimas de crescimento dos microorganismos aliado à combinação de outros fatores físico-químicos que podem auxiliar ou maximizar o processo de degradação (temperatura, pH, luz UV, entre outros). Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar fungos amazônicos com potencial para degradar polietileno tereftalato(PET). **Metodologia:** Três amostras de fungos Basidiomicetos coletados em Parintins/AM: *Pyc. sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos foram utilizados para os testes de degradação do polímero em meio contendo 20g farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) e 500ml de água destilada. As amostras do polímero PET foram preparadas previamente (corte 1x1cm, peso e assepsia) e submetidos à temperatura de 35°C, durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros e os microrganismos em estudo, e após autoclavados foram incubados à 30° C. A degradação do PET foi avaliada em fermentação submersa estacionária durante 30 dias. Após o período de incubação, a determinação da perda de massa dos polímeros foi baseada na metodologia ASTM D5247-92 (1992) que consiste na análise da diferença do peso final menos o peso inicial. **Resultados:** Em termos absolutos o maior percentual de perda de peso no tratamento com PET (+28°C) ocorreu para o consórcio Pyc+FBL (28,7%). No tratamento individual o maior percentual ocorreu para *Pyc. sanguineus* (11,4%) e o menor para FV12 (0,40%). Nos testes com PET 35°C o consórcio Pyc+FBL também apresentou o maior percentual de perda de massa (19,7%), porém, 45,6% menor do que no teste PET +28°C. Neste tratamento ocorreu um aumento na perda de massa para todos os ensaios individuais sendo 33%, 41% e 420% para *Pyc. sanguineus*, FBL e FV12 respectivamente. Por outro lado, o consórcio no tratamento PET 35°C apresentou um menor percentual de perda de massa para Pyc+FBL+FV12 e PYC+FBL, 58,1% e 45,7% respectivamente. Exceção para o consórcio de fungos Pyc+FV12 onde a perda de massa foi 3,9 vezes maior no tratamento PET 35°C. **Conclusão:** Todos os fungos amazônicos testados apresentaram potencial para degradar o polietileno tereftalato, sendo que os testes “consórcios” com PET sem tratamento físico apresentou maior perda de massa do polímero.De uma forma geral, o meio composto da farinha de tucumã possivelmente influenciou o processo de degradação do PET, visto que apresenta requisitos nutricionais para o crescimento fúngico.



DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS AMAZONICOS MEIO ACRESCIDO COM FARINHA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum Meyer*)

Autores: SOARES, E.P; SILVA, A.V; NUNES, A.S; ARAUJO, S.P; DIAS, R.A; TAVARES, B.P; SOUZA, E.A; MELO, J.L; CASTRO E SILVA,

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

INTRODUÇÃO: Com o avanço dos estudos na área biotecnológica os organismos fúngicos, principalmente a produção de enzimas tornaram-se de grande interesse e vêm contribuindo com produtos e processos de importância industrial. Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos amazônicos ainda permanece num nível incipiente, sendo que poucos dados na área sobre enzimas com o potencial industrial são disponíveis. O presente trabalho visa avaliar a atividade de enzimas oxidativas em meios de cultivo utilizando resíduo agroindustrial de baixo custo, como fonte de carbono no processo de degradação do politereftalato de etileno. **MATERIAL E METODOS:** Foram utilizadas três amostras de fungos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos. O meio de cultivo foi composto de 20g farinha da casca de tucumã e 500 ml de água destilada. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros, os fungos em estudo e incubados à 30° C. Amostras do PET foram submetidas à temperatura de 35°C, em estufa, durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. A determinação enzimática foi avaliada através de filtrados de enzima bruta obtido em fermentação submersa e condição estacionária durante 30 dias. Para atividade de lacase e peroxidase, utilizou-se a metodologia de SZKLARZ *et.al.* 1989, para a atividade de LiP utilizou-se o método proposto por Tien-Kirk (1984) e a atividade de MnP foi baseada na metodologia de GLEN *et.al.*, (1986); AITKEN & IRVINE, (1990). **RESULTADO E DISCUSSÃO:** A atividade de Lac mostrou-se de modo geral, maior para o ensaio PET +28°C. O consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 foi o que apresentou maior produção de Lac (10,2 U.L⁻¹). Por outro lado esse consórcio de fungos em teste PET 35°C apresentou uma atividade de Lac 10 vezes menor. Nos ensaios individuais o fungo FBL apresentou maior produção de Lac (6,5 U.L⁻¹) no teste PET +28°C. No entanto, o Pyc. sanguineus no teste PET 35°C apresentou menor atividade de Lac (0,05 U.L⁻¹). Em média a atividade de LiP foi 56,2 e 55,2 U.L⁻¹ para o teste PET +28°C e PET 35°C respectivamente, enquanto que a MnP foi 61,8 e 61,3 U.L⁻¹ nos mesmos testes respectivamente. A atividade de peroxidase foi maior no teste PET +28°C para o consórcio Pyc+FBL+FV12 (8,4 U.L⁻¹), enquanto que o Pyc+FBL foi onde ocorreu a menor atividade dessa enzima (0,05 U.L⁻¹). **CONCLUSÃO:** De modo geral ocorre a atividade das enzimas oxidativas no meio testado. Pesquisas continuam a fim de verificar testes com "consórcios" de fungos que apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática, com destaque para o consórcio Pyc+FBL+FV12.



CRESCIMENTO LINEAR DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA EM MEIO ACRESCIDO DE CHORUME

Autores: NUNES, A.S.; SOARES, E.P.; SOUZA, P.L.; SANTOS, I.C.; TAVARES, B.P.; MELO, J.L.; GALÚCIO, V.A.; CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: O lixão é uma forma inadequada de disposição final de resíduos sólidos, acarretando vários problemas ambientais, gerados pela simples descarga do lixo sobre o solo, sem medidas de proteção ao meio ambiente ou à saúde pública. Da decomposição química e microbiológica dos resíduos sólidos depositados em um lixão forma-se o chorume - líquido de elevada carga orgânica e forte coloração que se torna extremamente poluente, sendo potencial contaminante de lençóis freáticos e corpos d'água, comprometendo a saúde da população. Portanto, pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de amenizar os impactos ambientais causados por esse descarte indiscriminado. Neste contexto os fungos produtores de enzimas oxidativas tomam destaque, uma vez que estes microorganismos possuem um “pool” enzimático diversificado capaz de degradar compostos recalcitrantes presentes no chorume. Neste sentido o objetivo desta pesquisa foi avaliar o crescimento linear de fungos amazônicos em meio contendo chorume como principal fonte de carbono. **Material e métodos:** Foram utilizados cinco fungos da classe dos basidiomicetos codificados em FI-02, FV-12, FI-03, FBL e *Pycnoporus sanguineus* coletados na zona rural do município de Parintins/Am. Para obtenção da cultura pura fragmentos dos carpóforos foram inoculados em meio BDA. O chorume utilizado foi coletado no lixão municipal de Parintins/AM, em seguida autoclavado, oxigenado por 2 horas e posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O crescimento fúngico foi avaliado em teste de placa Petri, contendo apenas Agar e chorume nas concentrações: 1%, 1,5% e 2%. Os tratamentos foram incubados em estufa BOD à 30°C e seu crescimento mensurado a cada 24 horas durante cinco dias. **Resultados e discussão:** As linhagens testadas apresentaram correlação positiva quanto ao crescimento em meio contendo chorume nas concentrações 1%, 1,5% e 2%, sua principal fonte de carbono. Em valores absolutos os maiores crescimentos foram para as linhagens FI-02 na concentração 2% (2,22 cm), seguida de FI-02 na concentração 1% (2,16 cm) e FV-12 na concentração 2% (2,14 cm) respectivamente. Paralelamente os menores desempenhos ocorreram para *Pycnoporus sanguineus* na concentração 1,5% (1,15 cm) e *Pycnoporus sanguineus* em concentração 1% (1,10 cm). Não houve diferença estatística entre os tratamentos. **Conclusão:** As cinco linhagens fúngicas amazônicas testados apresentaram relação positiva com o crescimento radial em meio de cultivo acrescido de chorume como principal fonte de carbono.



ESPÉCIE AMAZÔNICA COM POTENCIAL FUNGICIDA FRENTE A FUNGO FITOPATÓGENO QUE ATACA HORTALIÇAS NO MUNICÍPIO DE PARINTINS-AM

Autores: VALENTE, P.M.R; SOARES, E.P; NUNES, A.S; ARAUJO, S.P; GALUCIO, V.A; ROCHA, E.M; SCUDELLER, V.V; CASTRO E SILVA, A; MELO, J.L.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Nas últimas décadas vem se utilizando alternativas menos agressivas de controle de pragas agrícolas garantindo o controle de doenças e a sustentabilidade da atividade agrícola. O fungo *Fusarium* sp causa grande prejuízo as culturas de hortaliças e respectivamente a outras espécies agrícolas causando prejuízo econômico. No município de Parintins-Am, produtores de hortaliças sofrem o ataque desses fitopatógenos, comprometendo sua produção e deixando em risco a saúde da população. A diversidade de espécies vegetais na Amazônia torna importante a investigação de novas moléculas químicas capazes de serem utilizadas como controle biológico amenizando a agressão ao meio ambiente. O *Caryocar villosum* é uma espécie bastante encontrada na Amazônia Central, sendo conhecida regionalmente como piquiá. As folhas, casca da árvore e polpa do fruto são ricas fontes de taninos. Estas substâncias contribuem para a defesa das plantas contra o ataque de insetos e tem sido relacionada com inibição do crescimento de microrganismos. O estudo teve como objetivo desenvolver pesquisa em torno da planta Amazônica com potencial fungicida, capaz de realizar controle biológico, e tornando menos agressivo ao meio ambiente. **Material e método:** O trabalho utilizou folhas coletadas de uma população de piquiá (*Caryocar villosum*(Aubl)/Pers), coletada no município de Parintins no Estado do Amazonas. As amostras das folhas foram pesadas e secas em estufa a 30°C, em seguida moídas. Na realização dos testes com o extrato do *C. villosum*, o extrato bruto das folhas foi obtido através do método de extração à quente. As amostras dos patógenos foram obtidas de folhas apresentando sintomas de fusariose em plantas comerciais. Os patógenos foram cultivados em placa de petri em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar). A atividade antifúngica das concentrações do extrato foliar foi avaliada através da inibição do crescimento miceliano do patógeno. Utilizou-se o extrato foliar da espécie vegetal nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL-1. A avaliação do efeito das diferentes concentrações do extrato foliar sobre o crescimento miceliano foi realizada quando o crescimento da testemunha cobriu totalmente a superfície do meio de cultura. **Resultados e Discussão:** Constatou-se que o extrato de *C. villosum* nas concentrações 10, 100 e 1000 µg/mL-1 testadas inibiram em 100% a germinação dos esporos de *Fusarium* sp. Sete dias após a avaliação verificou-se que os esporos permaneceram sem germinar, não ocorrendo, conseqüentemente, o crescimento micelial do fungo e, comprovando-se, portanto, o efeito fungicida do extrato foliar. Na concentração 1 µg/mL-1 não houve crescimento micelial, constatando que a concentração é baixa para inibição do patógeno. **Conclusão:** O extrato bruto foliar obtido do *Caryocar villosum* apresenta potencial fungicida.



ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DA DEGRADAÇÃO DE POLÍMERO EM LIXÃO A CÉU ABERTO DO MUNICÍPIO DE PARINTINS-AM

Autores: MUNIZ, V.A; GALÚCIO, V.A; ANDRADE, F. S; SOUZA, L.C.C.S; BITENCOURT, V.S; NUNES, A.S; MOURA, S.S; CASTRO E SILVA, A; PROCOPIO, A. R.L.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: PET (Poli tereftalato de etileno) é um poliéster termoplástico, considerado o melhor e mais resistente plástico, utilizado na produção de embalagens, principalmente no ramo de bebidas, por possuir alta resistência mecânica e química. Tem se buscado materiais biodegradáveis considerados de grande importância por ser um produto industrial ou substância que, quando descartado, é decomposto por bactérias ou outros agentes biológicos num curto espaço de tempo. Porém a maioria dos polímeros desenvolvidos não se decompõe naturalmente, levando muitas décadas e até séculos para serem degradados nos aterros sanitários, lixões e até mesmo no ambiente. A região do Baixo Amazonas apresenta uma diversidade microbiana com potencial tecnológico a ser explorado como a degradação do PET, ainda pouco estudada. **Metodologia:** Foram coletadas quatro amostras de solo em diferentes pontos na lixeira pública do município, transportados para o Centro de Estudos Superiores de Parintins-UEA e depositados em bandejas mantidas sobre monitoramento constante para a manutenção das condições ambientais como umidade e exposição ao sol e chuva. Nestas bandejas, após assepsia e registro do valor do peso inicial foram enterrados 30 fragmentos de PET (4x2 cm). A cada 30, 60, 90 e 120 dias foram retirados 5 fragmentos do polímero de cada bandeja para assepsia e pesagem. Um fragmento de cada bandeja foi retirado e colocado em tubos de ensaio com solução salina autoclavada, de onde após agitação, retirou-se 100 µl para plaquear em meios de cultivo TSA e NA e incubar em estufa por 24 horas a 28° C. Após o crescimento procedeu-se o isolamento das colônias pela técnica de estrias por esgotamento nos respectivos meios. Todos os procedimentos foram feitos em duplicata. **Resultados e discussões:** Fazendo-se análise do peso inicial com peso após 30, 60, 90 e 120 dias pode-se observar redução de peso dos fragmentos de PET, sendo que com 30 dias o percentual de redução de peso foi de 0,2%, com 60 dias a redução de peso foi de 0,25% e com 90 e 120 dias foi de 0,26 e 0,69%, mostrando uma redução significativa em relação ao peso inicial do polímero, sendo um indicativo de degradação por microrganismos do solo. A partir dos fragmentos de PET retirados do solo a cada 30 dias foram isoladas cerca de 54 colônias diferentes de bactérias. **Conclusão:** O PET leva de 200 a 400 anos para ser degradado em lixões, enquanto que utilizando este tipo de técnica onde os microrganismos do ambiente são estimulados a aumentar sua eficiência na degradação. Este tempo pode ser reduzido para cerca de 50 anos.



ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DO CHORUME DA LIXEIRA PÚBLICA DE PARINTINS-AM E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COLIFORMES

Autores: ANDRADE, F.S; GALUCIO, V.C.A; SANTOS, I.C.C; BITTENCOURT, V.S; MUNIZ, V.A; NUNES, A.S; SOARES, E.P; SILVA, A. MOREIRA; PROCOPIO, A.R.L.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

Resumo

Introdução: Parintins é a segunda maior cidade do estado do Amazonas, localizada na maior Bacia hidrográfica do mundo, é circundada pelo Rio Amazonas formando uma ilha com diversos lagos. Nestas mediações está localizada a lixeira pública, onde é depositado todo o resíduo doméstico e industrial gerado pela cidade. Com uma grande produção de chorume, um líquido resultante da degradação de resíduos sólidos urbanos, sendo que a percolação deste líquido em lixões sem impermeabilização do solo pode provocar poluição das águas subterrâneas e superficiais, e consequente alteração da fauna, flora e microbiota. **Material e métodos:** As amostras de chorume foram coletadas no período de vazante e de enchente dos rios, em quatro diferentes pontos do entorno da lixeira. Foram retirados 50 ml de cada poça e transportados para o laboratório de Biologia da UEA/Parintins-AM. Para avaliar a presença de coliformes, distribuiu-se 10 mL de cada amostra em tubos de ensaio com 10 mL de meio contendo caldo lactosado com púrpura bromocresol, e encubou-se por 24 horas em BOD a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Como controle positivo foi utilizado o meio TSB acrescido de 10 μl de cultura de *E. coli* ATCC 25922. Para o isolamento de bactérias foi semeado com alça drigalski 100 μL de cada amostra com diferentes diluições em placas de Petri contendo meio de cultivo TSB e NA e incubadas em BOD a 30°C por 24h. Após o crescimento, fez-se a purificação das colônias por esgotamento com estrias cruzadas. As bactérias purificadas foram preservadas em meio de cultivo TSB líquido suplementado com glicerol a 15%, e estocadas a -20°C . **Resultados e discussão:** Após o período de incubação avaliou-se a produção de gás pela presença de bolhas no meio de cultivo e a mudança de coloração do mesmo pela produção de ácido. Características de crescimento de bactérias do grupo coliformes, observado em todas as amostras coletadas nos diferentes períodos. A presença de *E. coli* foi confirmada pela observação crescimento de colônias com brilho verde metálico após o plaqueamento em meio EMB, sendo positiva em 14 das 24 amostras avaliadas. Destas amostras também foram isoladas 96 diferentes colônias de bactérias, indicando a diversidade bacteriana do chorume. Estas bactérias foram depositadas na coleção de culturas do programa de Mestrado em Biotecnologia da UEA. **Conclusão:** chorume é um líquido tóxico, podendo ser um veículo de transmissão de doenças, pela presença de uma diversidade de microrganismos patogênicos ou não, os resultados mostram a potencialidade de ocorrência de doenças disentéricas pela indicação da presença de *Escherichia coli*. Além de ser uma fonte de microrganismos com potencial biotecnológico a ser explorado.



APROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA AMAZÔNIA COMO FONTE DE CARBONO PARA FUNGOS DETERIORADORES DE MADEIRA

AUTORES: NUNES, A.S (UEA) ; GONÇALVES, M.S (UEA) ; SOUZA, E.G (UEA) ; SOARES, E.P (UEA) ; CASTRO, N.F (UEA) ; CASTRO E SILVA (UEA)

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi testar a farinha da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) no crescimento de fungos deterioradores de madeira em diferentes concentrações e faixas de pH. Para os testes de crescimento utilizou-se a farinha da casca de tucumã como suplemento nas concentrações 1% e 2% e ajustado o pH inicial para 4, 6, 8, 10, 12. Os fungos estudados foram coletados na zona rural de Parintins/AM e codificados em: FV-12, FV-6, FI-9, FI-3 e *Pycnoporus sanguineus*. O crescimento foi mensurado através da progressão linear da fronteira micelial. A concentração ótima para o crescimento dos fungos testados apresentou-se em 1% de farinha da casca de tucumã. Referente ao pH a faixa ótima para o crescimento dos fungos testados ocorreu entre 4 e 6.

PALAVRAS CHAVES: casca de tucumã, fungos amazônicos, crescimento

introdução: O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), também conhecido como tucumã-do-amazonas ou tucumã-açu, é uma palmeira de crescimento monopodial, arborescente e monóica (CAVALCANTE, 1991). Seus frutos são ricos em vitamina A, ácidos graxos saturados e glicérides trissaturados, podendo substituir o dendê e o babaçu na indústria de óleos (VILLACHICA et al. 1996). No Amazonas, especialmente em Manaus, esse produto agrícola tem significativo valor financeiro, representando uma atividade econômica crescente. Porém, apenas a polpa do tucumã é utilizada, gerando grandes quantidades de resíduos da casca, que é desperdiçada sem nenhum aproveitamento. Nos últimos anos tem ocorrido um interesse maior na utilização eficiente de resíduos agroindústrias (PANDEY et al., 1999; ROSALES et al., 2002). Muitos bioprocessos têm sido desenvolvidos baseados nesses materiais como substratos em bioprocessos para produção de enzimas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (PANDEY et al., 1999; MASSADEH et al., 2001; LAUFENBERG et al., 2003). Neste sentido, as enzimas de fungos tem se mostrado úteis na degradação numa variedade de persistentes poluentes ambientais. Muitas dessas enzimas são extracelulares e, na natureza, provavelmente estão envolvidas na degradação da madeira (MAYER & STAPLES, 202). O desenvolvimento da capacidade lignolítica requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, níveis elevados de oxigênio, um limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK & FARREL., 1987; BUSWELL, 1991). Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi testar a farinha da casca do tucumã no crescimento de fungos deterioradores de madeira em diferentes concentrações e faixas de pH. **Material e métodos:** Para os testes de crescimento linear utilizou-se a farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) previamente seca em estufa a 50°C e esterilizada em autoclave a 1,5 atm. Os meios de cultivo foram preparados com farinha da casca de tucumã nas concentrações 1% e 2%, com o acréscimo de 1g de glicose e 15g de ágar a cada 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado com NaOH ou H₂SO₄ nas faixas de pH: 4, 6, 8, 10, 12. Os fungos deterioradores de madeira estudados foram coletados na zona rural do município de Parintins/AM, codificados em FV-12, FV-06, FI-09, FI-03 e *Pycnoporus sanguineus*. Para obtenção de cultura pura, pequenos fragmentos dos carpóforos foram crescidos em meio de cultura BDA. Nos bioensaios com a farinha da casca do tucumã a medição do crescimento foi realizada a cada 24 horas por um período de cinco dias. O crescimento foi mensurado através da progressão linear da fronteira micelial, feita com régua milimetrada na base de cada placa de Petri, com medidas tomadas em duas direções perpendiculares. As culturas foram incubadas em estufa BOD à temperatura de 30° C. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. **Resultados e discussão:** Em termos de valores absolutos os melhores desempenhos ocorreram na concentração 1% de farinha da casca de tucumã para todos os fungos testados nas faixas de pH 4, 6, 8, 10, 12. Na concentração 1% de farinha da casca de tucumã o maior crescimento ocorreu para o fungo *Pycnoporus sanguineus* nas faixas de pH 4 (2,5cm), seguida do pH 6 (2,3cm) e pH 12 (2,0cm) respectivamente, seguido dos fungos FI-3 e FV-12 nas faixas de pH 6 (2,28cm), pH 8 (2,22cm) e pH 10 (2,06cm). Os menores crescimentos foram de FV-6 e FI-09 no pH 10 (1,9 cm) e (1,8 cm) respectivamente. Na concentração 2% de farinha da casca de tucumã o maior crescimento foi de FV-6 pH 6 (2,0 cm), seguido de FV-12 pH 12 (1,35 cm). Possivelmente a casca do tucumã contém substâncias macromoleculares que foram utilizadas como fonte de nutrientes, para isto as enzimas hidrolíticas, secretadas pelos fungos, hidrolisaram estas macromoléculas e liberaram, assim, pequenas moléculas solúveis que puderam ser utilizadas para o crescimento destes microorganismos. O teste ANOVA não mostrou diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5% de significância.

Conclusões: A concentração ótima para o crescimento dos fungos testados apresentou-se em 1% de farinha da casca de tucumã. Referente ao pH a faixa ótima para o crescimento dos fungos testados ocorreu entre 4 e 6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA: BUSWELL, J.A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D.K. et

- al. Handbook of applied mycology: Soil an plants. New York: Marcel Dekker, vol. 1, p. 425-480, 1991.
- CAVALCANTE, P.B. 1991. Frutas comestíveis da Amazônia. 5.ed. Belém: Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi. 279pp. (Coleção Adolfo Ducke).
- KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic “combustion”. The microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.41, p. 564-505, 1987.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYZTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; practical implementation. Bioresource Technology. Essex, v 87, p. 167-198, 2003.
- MASSADEH, M. et al. Synergism of cellulose enzymes in mixed culture solid substrat fermentation. Biotechnological Letters, Hull, v. 23, p. 1771-1774, 2001.
- MAYER, A.M., STAPLES, R.C. Lacase: new functions for and old enzymes. Phytochemistry, New York, v. 60, p. 551-565, 2002.
- PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Currente Sciences, Bangalore, v. 77, p. 149-162, 1999.
- ROSALES, E.; COUTO, R.; SAROMAN, A. New uses of food waste: application to lacase production by *Trametes hirsute*. Biotechnological Letters, Hull, v. 24, p. 701-704, 2002.
- VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; DÍAZ, S. C. & ALMANZA, M. 1996. Frutales y hortalizas promisorias de la Amazonía. Pp. 264-267. Tratado de Cooperación Amazonica, (TCA-SPT,44), FAO, Lima, Peru. Versão eletrônica.



CRESCIMENTO RADIAL DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM MEIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO COM CORANTE AZUL DE METILENO

AUTORES: SOUZA, E.G (UEA) ; NUNES, A.S (UEA) ; TRINDADE, D.B (UEA) ; PONTES, M.P. (UEA) ; CASTRO E SILVA, A (UEA) ; SOARES, E.P (UEA)

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi selecionar fungos amazônicos com potencial de crescimento e descoloração em meio acrescido com o corante azul de metileno. Foram utilizadas nove linhagens de fungos basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV-12, FI-2, FI-3, FV-6, FI-9, FI-11, CV-29 e FBL. Os bioensaios ocorreram em placa de Petri na concentração 0,002% do corante. A avaliação foi feita durante 17 dias. As melhores médias de crescimento ocorreram respectivamente para: *P. sanguineus* (3,54cm), FI-2 (2,70 cm), CV-29 (2,47cm) e FV-12 (2,43cm). Quanto à descoloração, *P. sanguineus* e FV-12 apresentaram 100% de descoloração, seguidas de FI-2, FI-11, FBL com 98%, FV-06 e FI-3 com 95%. Portanto, os fungos estudados apresentam potencial para aplicação em processo de biorremediação de áreas contaminadas.

PALAVRAS CHAVES: azul de metileno, fungos basidiomicetos, amazônia

Introdução: Uma das maiores preocupações enfrentadas hoje no mundo industrial diz respeito aos custos, tratamentos e destino dos efluentes gerados pela aplicação de corantes químicos durante o tingimento e beneficiamento dos derivados industriais, acarretadas pelo fato de tratar-se de compostos recalcitrantes. Devido a preocupação ambiental, vem aumentando o interesse por métodos alternativos, com o uso de microrganismos para biorremediação de áreas contaminadas por metais potencialmente tóxicos (KOTRBA; RUMML, 2000). Nos últimos anos, os fungos da podridão branca (FPB) têm sido aplicados inclusive em estratégias de biorremediação devido a sua capacidade em mineralizar uma grande variedade de compostos altamente tóxicos encontrados no meio ambiente, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas, entre outros (CLEMENTE, 2002; NEVES, 2002). Por se tratar de uma região rica em microrganismos, a Amazônia tornou-se um referencial em pesquisas para reduzir os gastos, o tempo e as consequências desses contaminantes. Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi selecionar fungos amazônicos com potencial de crescimento e descoloração em meio de cultivo acrescido com o corante sintético azul de metileno. **Material e métodos:** Foram utilizadas nove linhagens de fungos basidiomicetos coletados na zona rural do município de Parintins/AM: *Pycnoporus sanguineus*, FV-12, FI-02, FI-03, FV-6, FI-9, FI-11, CV-29 e FBL. Para aquisição da cultura pura fragmentos foram isolados em meio BDA. Para o bioensaio com o corante o meio de cultivo foi composto de 500 mL de água destilada estéril, 7,5 g de ágar, 50mL de ampicilina, 2,5mL de gentamicina e corante azul de metileno na concentração de 0,002%. Fragmentos fúngicos de 5 mm de diâmetro foram inoculados no centro da placa de Petri e incubados a 30°C em estufa BDO no escuro. A avaliação do crescimento foi realizada através da progressão da fronteira micelial a cada 24 horas por um período de 17 dias. Também foram observadas as mudanças na coloração das culturas.

Resultados e discussão: Em termos de valores absolutos as melhores médias de crescimento ocorreram respectivamente para as linhagens: *Pycnoporus sanguineus* (3,54cm), FI-02 (2,70 cm), CV-29 (2,47cm), FV-12 (2,43cm) e FI-03 (2,26cm). Por outro lado as menores médias foram registradas para as linhagens FI-11 (2,12cm) e FV-06 (1,95cm). No que diz respeito à descoloração do corante, as linhagens *Pycnoporus sanguineus* e FV-12 apresentaram 100% de descoloração em 17 dias, seguidas de FI-02, FI-11, FBL com 98%, e FV-06 e FI-03 com 95% de descoloração. Possivelmente enzimas produzidas por estas linhagens fúngicas atuam no processo de quebra molecular do corante, formando novos produtos de peso molecular menor ou ainda, absorvendo em sua massa micelial os compostos do corante, agindo assim no processo de descoloração. Os compostos presentes no efluente atuam como substratos para as bactérias, leveduras e fungos filamentosos que metabolizam os nutrientes para crescimento e manutenção celular durante o tratamento biológico (UZURA et al., 2000 apud GUARATINI, ZANONI, 2000). **Conclusões:** Os fungos amazônicos testados apresentaram correlação positiva quanto ao crescimento micelial em meio de cultivo suplementado com o corante sintético azul de metileno, bem como a descoloração por sete dos nove fungos estudados. Apresentando potencial para aplicação em processo de biorremediação de áreas contaminadas.

Referências bibliográficas: CLEMENTE, A.R. 2002. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos policíclicos por Fungos. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas - SP.

GUARATINI, C. C.I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química Nova*. V. 23, n. 1, 2000, p 71-78.
KOTRBA, P.; RUMML, T. 200. Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of living organisms. A review. *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 65:1205-1247.

NEVES, E.B. 2002. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos policíclicos por Bactérias. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas - SP.