

ANOUSCA EVELIN DO CARMO

**CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DAS HIFAS DE *Lepista sordida* E ESTUDO DE
SEU POTENCIAL MICORREMEIADOR SOBRE CORANTES**

**Monografia apresentada à disciplina Estágio
Em Biologia Celular como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas, pelo Departamento de Biologia
Celular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Ruth Janice Guse Schadeck
Co-orientadora: Lucélia Donatti**

CURITIBA

2005

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE FILMES	vi
LISTA DE TABELAS, ESQUEMA E GRÁFICO	vii
RESUMO	viii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2.1 OBJETIVO GERAL	03
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
3 REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS BASIDIOMICETOS	04
3.2 VACUOLIZAÇÃO EM FUNGOS E CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO	06
3.3 BIORREMEDIAÇÃO	07
3.4 CORANTES ARTIFICIAIS	08
3.5 MICORREMEDIAÇÃO	10
4 METODOLOGIA	12
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS	12
4.2 INÓCULOS	12
4.3 CORANTES	12
4.4 TRATAMENTOS	12
4.5 ANÁLISES	14
5 RESULTADOS	15
5.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS	15
5.2 DESCOLORAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA AMBDA E AJBDA	16
5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA <i>IN VIVO</i> DAS HIFAS NÃO CORADAS	17

5.4 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA <i>IN VIVO</i> DAS HIFAS CORADAS COM VERMELHO NEUTRO	18
5.5 DINÂMICA DO CONTEÚDO INTRACELULAR DAS HIFAS	18
FIGURAS	20
LEGENDA DE FILMES	35
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO (CD FIGURAS E FILMES)	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AJ: azul jeans (corante)

AJBDA: meio BDA acrescido do corante azul jeans

AM: azul de metileno (corante)

AMBDA: meio BDA acrescido do corante azul de metileno

BDA: batata-dextrose-ágar (meio de cultura)

DIC: Contraste de Interferência Diferencial

SCBDA: meio BDA sem adição de corantes

VN: vermelho neutro (corante)

LISTA DE FIGURAS

As figuras estão, também, no CD em anexo

FIGURA 1	-	CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO	04
FIGURA 2	-	FORMAÇÃO DA CONEXÃO EM GANCHO	05
FIGURA 3	-	COLÔNIAS DE 8 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AMBDA E SCBDA	22
FIGURA 4	-	COLÔNIAS DE 12 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AMBDA E SCBDA	24
FIGURA 5	-	COLÔNIAS DE 8 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AJBDA E SCBDA	26
FIGURA 6	-	COLÔNIAS DE 12 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AJBDA E SCBDA	28
FIGURA 7	-	TRATAMENTO AMBDA MOSTRANDO A DESCOLORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA VISTA DE PERFIL	30
FIGURA 8	-	TRATAMENTO AJBDA MOSTRANDO A DESCOLORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA VISTA DE PERFIL	30
FIGURA 9	-	MORFOLOGIA DE HIFAS ATRAVÉS DE DIC	32
FIGURA 10	-	HIFAS CORADAS COM VERMELHO NEUTRO	34

LISTA DE FILMES

Todos os filmes estão no CD em anexo

- FILME 1 - MOVIMENTOS DE GRANULAÇÕES CITOPLASMÁTICAS EM HIFAS CRESCIDAS EM MEIO SCBDA SEM COLORAÇÃO
- FILME 2 - MOVIMENTAÇÃO DE GRANULAÇÕES CITOPLASMÁTICAS EM HIFAS CRESCIDAS EM MEIO AMBDA SEM COLORAÇÃO
- FILME 3 - MOVIMENTAÇÃO CITOPLASMÁTICA EM RAMIFICAÇÃO DE HIFA CRESCIDA EM MEIO SCBDA SEM COLORAÇÃO
- FILME 4 - MOVIMENTAÇÃO DIRECIONADA DE VESÍCULAS INTRACELULARES DE HIFAS CRESCIDAS EM MEIO SCBDA CORADAS COM VERMELHO NEUTRO
- FILME 5 - MOVIMENTAÇÃO DIRECIONADA DE VACÚOLOS E PEQUENAS VESÍCULAS ÁCIDAS EM HIFAS CRESCIDAS EM MEIO SCBDA CORADAS COM VERMELHO NEUTRO
- FILME 6 - FLUXO DE VESÍCULAS ÁCIDAS ENTRE AS RAMIFICAÇÕES DE HIFAS CRESCIDAS EM MEIO AMBDA CORADAS COM VERMELHO NEUTRO
- FILME 7 - MOVIMENTO ALEATÓRIO DE VESÍCULAS PRÓXIMAS A SEPTOS DE HIFAS CRESCIDAS EM MEIO SCBDA CORADAS COM VERMELHO NEUTRO
- FILME 8 - RUPTURA DE VACÚOLOS EM HIFAS CRESCIDAS EM MEIO AMBDA CORADAS COM VERMELHO NEUTRO
- FILME 9 - RUPTURA DE VACÚOLOS EM HIFAS CRESCIDAS EM MEIO AJBDA CORADAS COM VERMELHO NEUTRO

LISTA DE TABELAS, ESQUEMA E GRÁFICO

TABELA 1	- CARACTERÍSTICAS DO AZUL DE METILENO E DOS CORANTES AZUL BRILHANTE, ERITROSINA E TARTRAZINA, QUE ENTRAM NA COMPOSIÇÃO DO CORANTE AZUL JEANS.....	10
ESQUEMA 1	- INOCULAÇÃO DAS PLACAS DE CULTURA.....	13
TABELA 2	- DIÂMETRO DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS.....	16
GRÁFICO 1	- CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS EM DIFERENTES MEIOS	16

RESUMO

Neste trabalho foram analisados aspectos da biologia do fungo *Lepista sordida*, como as características macroscópicas das colônias, microscópicas das hifas *in vivo* e o potencial micorremediador da espécie atuando sobre corantes. As inoculações foram realizadas em meios de cultura BDA sem corantes (controle) e também em BDA com a adição dos corantes azul de metileno e azul jeans (tratamento). Discos-inóculo de 10mm de diâmetro foram colocados no centro das placas e estas foram incubadas à temperatura controlada de 26°C, no escuro. Foram analisadas: (1) a morfologia e o crescimento das colônias a cada dois dias, (2) a morfologia das hifas sem a adição de corante e também coradas com vermelho neutro 0,5% por 5 minutos, ambas visualizadas em DIC e microfilmagem e (3) as alterações na coloração do meio de cultura. O conjunto de resultados mostrou que as colônias possuem aspecto algodinoso e coloração violácea cujo crescimento não é afetado de forma significativa pela adição de corantes ao meio. As hifas dos experimentos e do controle estavam semelhantes: hifas jovens, delgadas, com maior conteúdo citoplasmático e pequenas vesículas ácidas intracelulares, em contraste com hifas mais maduras, de maior diâmetro, com pouco conteúdo citoplasmático e grandes vacúolos. Intensa movimentação intracelular foi observada, tanto direcionada, como aleatória, inclusive com fluxo entre as hifas. Os meios de cultura foram descoloridos total ou parcialmente após 12 dias. Os resultados mostraram que o fungo tem potencial para ser usado em biorremediação. Estudos mais completos necessitam ser realizados para complementar as informações aqui obtidas.

Palavras-chave: *Lepista sordida*, hifas, corantes, biorremediação.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos basidiomicetos são organismos de grande importância biológica e econômica. Biológica, pois em ambientes naturais, esses fungos têm a capacidade de degradar compostos como celulose, hemicelulose e lignina, ciclando os nutrientes (MOORE-LANDECKER, 1996). Econômica, pois seus corpos de frutificação, mais conhecidos como cogumelos, são comestíveis e entram na dieta alimentar em muitos países, tornando seu cultivo uma atividade importante.

Lepista sordida é um basidiomiceto comestível que cresce em solos e gramados e utiliza nutrientes ali existentes para se desenvolver (MOORE-LANDECKER, 1996). Apesar de extensiva revisão da literatura, poucos estudos que enfocam esta espécie foram encontrados. Dentro desse contexto, e devido à grande importância dos basidiomicetos, torna-se urgente contribuir para um maior entendimento sobre a biologia das espécies desse grupo.

A preocupação com a recuperação e a preservação do ambiente vem se tornando algo essencial para a vida do planeta. Assim, cada vez mais, procura-se encontrar alternativas e novas tecnologias que sejam, ao mesmo tempo, eficientes, econômicas e menos impactantes ao ambiente. Essas novas tecnologias vêm tomando o espaço de métodos convencionais de despoluição (CIB, 2004). Nesse sentido, várias pesquisas vêm sendo feitas nas mais diversas áreas. Uma área que merece destaque é a biorremediação. Ao invés de se usar os tradicionais métodos físico-químicos para despoluir certa área, microrganismos e plantas são utilizados para esse fim (CIB, 2004). Inúmeras espécies de bactérias e fungos estão sendo estudadas na busca de organismos com alto potencial biorremediador. Obviamente, para ser usado como biorremediador o organismo em questão deve ser inócuo ao ambiente, facilmente cultivado, de rápido crescimento e tolerante ao poluente (TONG *et. al.*, 2004).

Os corantes são importantes contaminantes ambientais, principalmente quando são liberados em rios e solos. Estudos sobre a biorremediação de diferentes corantes têm sido realizados nos últimos anos com basidiomicetos, especialmente em meio líquido (CHAGAS & DURRANT, 1998; PINKOSKI & THOMAS, 2004). No entanto, estudos com basidiomicetos que crescem naturalmente no solo são insuficientes. Um

fungo que se desenvolva bem no solo, seja tolerante e que tenha a capacidade de degradar, absorver e/ou acumular poluentes ambientais constitui-se um excelente micorremediador. A espécie escolhida para a realização deste trabalho, *L. sordida*, já cumpre o primeiro requisito: cresce naturalmente no solo, em campos ou gramados, e já foi estabelecida, em recente monografia de conclusão de curso, a metodologia para a introdução no solo e cultivo no modo selvagem (GRAF, 2004). Nesse contexto, torna-se imprescindível entender a biologia do fungo *L. sordida* e investigar o seu potencial micorremediador.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento da biologia e potencial micorremediador do fungo *Lepista sordida*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in vivo* as hifas de *L. sordida* através de DIC (Microscopia por Contraste de Interferência Diferencial) e microfilmagem na presença e ausência dos corantes azul de metileno e azul jeans;
- Caracterizar os vacúolos das hifas *in vivo* na presença e ausência dos corantes azul de metileno e azul jeans;
- Avaliar o crescimento em meio sólido na presença e ausência dos corantes azul de metileno e azul jeans;
- Avaliar o potencial micorremediador do *L. sordida* sobre azul de metileno e azul jeans em meio sólido.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS DOS BASIDIOMICETOS

A classificação da espécie *Lepista sordida*, segundo MOORE-LANDECKER (1996), é a seguinte: Reino Fungi, Divisão Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Agaricales e, de acordo com a classificação de LILLOA (1949), válida ainda hoje, Família Tricholomataceae.

Os basidiomicetos são normalmente chamados de cogumelos. O corpo de frutificação (Figura 1) recebe o nome de basidioma e é constituído de estipe, píleo e lamelas (mostradas na Figura 1B), nas quais são formados os basídios e os basidiósporos. Estes basidiósporos são esporos que, ao serem liberados no ambiente, dão origem a um novo micélio (HAVEN, 1996).

FIGURA 1 – CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DO FUNGO BASIDIOMICETO *Lepista sordida* EM SEU AMBIENTE NATURAL, OS GRAMADOS



A. VISTA SUPERIOR, MOSTRANDO O PÍLEO

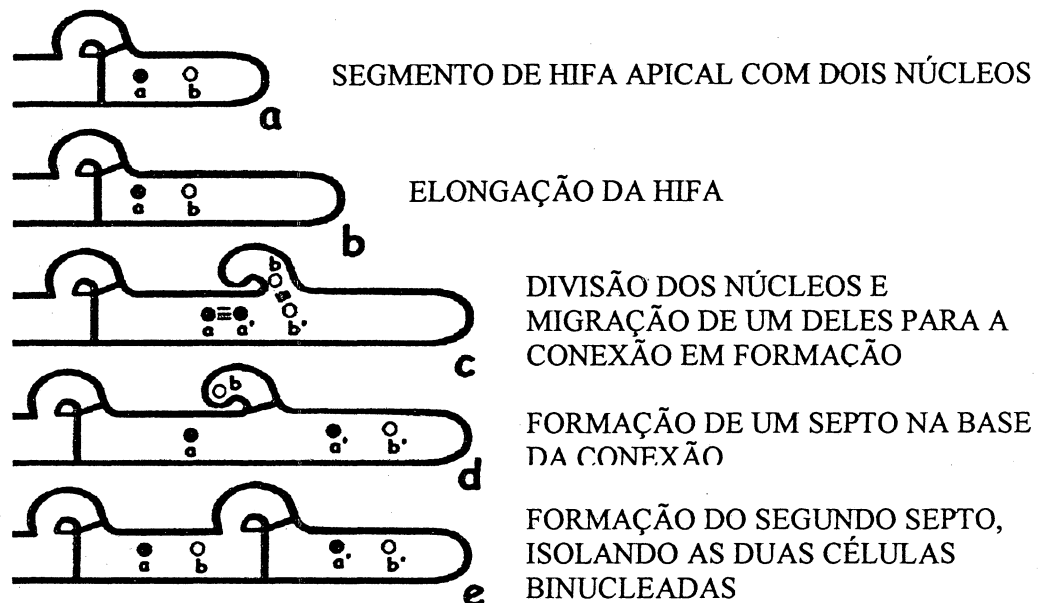
B. DETALHE DA PARTE INFERIOR DO PÍLEO, EVIDENCIANDO AS LAMELAS

FONTE: www.mycology.com/AAU/Mycology/Staff/MC/Lsordida.htm, acessado em: 07/11/2004

Uma estrutura característica dos basidiomicetos é a conexão em gancho. Acredita-se que a função desta estrutura é assegurar que cada célula tenha um par de

núcleos (SITE 1, 2004). A formação desta conexão (Figura 2) se dá numa hifa apical binucleada (Figura 2a). Ocorre o alongamento da hifa (Figura 2b) e divisão dos dois núcleos, sendo que um deles migra para a conexão que está se formando (Figura 2c); após a migração, um septo forma-se na base da conexão (Figura 2d), isolando temporariamente o núcleo. Quando a conexão se une à célula adjacente, o núcleo que ali estava passa para esta célula e um segundo septo é formado, isolando a célula terminal da subterminal (Figura 2e), ambas, agora, binucleadas.

FIGURA 2 – FORMAÇÃO DA CONEXÃO EM GANCHO



FONTE: www.bioimagens.org.uk/MMWST/Nikon950/2001/01-10/01-10-09/01J09A+5.jpg, acessado em: 07/11/2004

Os basidiomicetos são capazes de decompor celulose, hemicelulose e lignina, fazendo a completa degradação dos mesmos e, conseqüentemente, ciclando nutrientes (MOORE-LANDECKER, 1996). O *L. sordida* utiliza nutrientes provenientes de folhas mortas, húmus, exudatos liberados pelas raízes e células descamadas das coifas (MOORE-LANDECKER, 1996). Considerando que a quantidade de nutrientes presentes no solo é bem menor em comparação aos nutrientes fornecidos por troncos de árvores (MARKHAM, 1983), crescer no solo e com baixas exigências nutricionais se torna vantajoso quando se pretende descontaminar este ambiente. Já foi

estabelecida, em recente monografia de conclusão de curso, a metodologia para a introdução no solo e cultivo no modo selvagem da espécie (GRAF, 2004). Em laboratório, o *L. sordida* apresenta crescimento já nos primeiros dias após inoculação e com 12 dias a placa de cultura já está completamente colonizada (GRAF, 2004).

3.2 VACUOLIZAÇÃO EM FUNGOS E CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Vacúolos são compartimentos ácidos caracterizados por várias enzimas digestivas, além de possuírem solutos de baixo peso molecular, como íons Ca^{+2} e polifosfatos (KLIONSKY, *et. al.*, 1990) e também aminoácidos (MESSENGUY *et. al.*, 1980). Além disso, são o destino final de moléculas internalizadas através da endocitose, como demonstrado em *Saccharomyces cerevisiae* (MUNN, 2000). Dessa forma, os vacúolos desempenham funções fundamentais, como digestão intracelular, armazenamento de substâncias, controle da homeostase e do pH, além de fazerem a manutenção de íons do citoplasma (KLIONSKY *et al.*, 1990). Vacúolos de fungos, especialmente de basidiomicetos, podem também acumular diferentes tipos de compostos retirados do meio ambiente, como metais pesados, e assim promover a descontaminação (KALAC & SVOBODA, 2000; VETTER & BERTA, 1997).

Os vacúolos estão presentes em diferentes estruturas fúngicas como hifas, esporos e apressórios (KLIONSKY *et al.*, 1990). Durante o envelhecimento de conídios de *Colletotrichum graminicola*, ocorre a vacuolização, juntamente com a diminuição dos lipídeos, fato esse já determinado por LEITE (1992), sendo que um aumento dos vacúolos pode ser observado durante o envelhecimento conidial (MIMS *et. al.*, 1995) e a germinação (SCHADECK *et. al.*, 1998).

Já foi determinado que os vacúolos possuem funções digestivas. Em *Botrytis cinerea* e *Ceratocystis ulmi*, os vacúolos autofagocitam gotículas de lipídeos e detoxificam o vermelho neutro, enquanto em *Elsinoe wisconsinensis*, a digestão intracelular do glicogênio é realizada pelos vacúolos (WILSON *et al.*, 1980).

O vermelho neutro é um corante exógeno vital (ALLISON & YOUNG, 1969), que pode ser internalizado por células vivas através da difusão por membrana e

posterior transferência para o lisossomo. Em *Botrytis cinerea*, foi sugerido que o vermelho neutro é endocitado, já em *Ceratocystis ulmi*, vesículas de vermelho neutro foram internalizadas por vacúolos (WILSON *et al.*, 1980). Mais recentemente, o transporte do vermelho neutro para dentro do vacúolo através de um sistema endossomal foi também sugerido em *Magnaporthe grisea* (WEBER *et al.*, 2001). Em *Colletotrichum graminicola*, as vesículas citoplasmáticas de vermelho neutro foram internalizadas pelos vacúolos, sendo que em processos avançados, essas vesículas foram freqüentemente observadas e exibindo intenso movimento Browniano dentro dos vacúolos (SCHADECK *et al.*, 2003). Em geral, os vacúolos foram fracamente corados, em contraste com as vesículas intravacuolares, coradas fortemente de vermelho.

3.3 BIORREMEDIAÇÃO:

Atualmente, existe uma grande preocupação acerca dos problemas ambientais, já que estes estão cada vez mais graves e freqüentes devido ao crescimento populacional e atividades industriais. Um dos principais problemas detectados é a contaminação do solo, da água e do ar (KUNS *et al.*, 2002). A busca por novas alternativas para minimizar a degradação ambiental conta com uma nova tecnologia, a biorremediação (KUNS *et al.*, 2002; CIB, 2004). Através dessa técnica, organismos são utilizados para metabolizar resíduos tóxicos presentes no ambiente, transformando-os em substâncias pouco tóxicas, ou não tóxicas, como dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O) (CIB, 2004), ou, ainda, produzem substâncias que facilitam a remoção dos contaminantes do meio (DURRANT, 2004).

Para a equipe de pesquisa da professora Lúcia Regina Durrant (da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Unicamp), a biorremediação pode ser uma alternativa para otimizar os sistemas de tratamento de efluentes existentes combinado com uma menor agressão ao ambiente. Segundo Lúcia, a biorremediação já é usada em larga escala em países desenvolvidos (DURRANT, 2003) e agora ela coordena uma equipe, aqui no Brasil, que está estudando fungos e bactérias com potencial de

degradar corantes têxteis e que possam ser usados na biorremediação (DURRANT, 2004).

A descontaminação físico-química convencional tem alto custo e baixa eficiência, especialmente quando se pretende descontaminar grandes volumes contendo complexos orgânicos ou níveis baixos do agente tóxico, embora nocivos (MALIK, 2004). Em oposição, a biorremediação é um processo que combina eficiência e baixo custo, tornando-se muito interessante para o uso na “limpeza” de solos e águas. Esta técnica chega a ser entre 65% a 85% mais econômica que as técnicas tradicionais de descontaminação e tratamento de resíduos industriais (CIB, 2004). Estudos estão sendo realizados para determinar alguns dos organismos capazes de fazer a biorremediação (CIB, 2004; KUNS *et. al.*, 2002; BOER *et. al.*, 2004). Entre estas pesquisas, algumas procuram relacionar os organismos com um dos principais poluentes ambientais, os corantes.

3.4 CORANTES ARTIFICIAIS

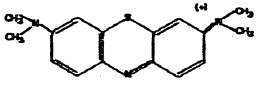
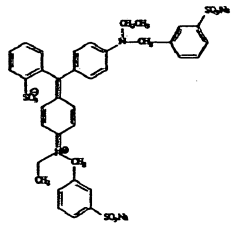
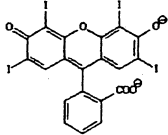
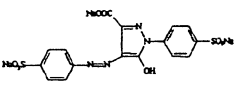
Os corantes são de grande importância nos mais diversos segmentos industriais, como têxtil, alimentício, gráfico, entre outros (KUNS *et. al.*, 2002; CHAGAS & DURRANT, 1998). Por outro lado, também trazem implicações ambientais e, cada vez mais, vem se buscando alternativas para esse problema (KUNS *et. al.*, 2002). Geralmente, os corantes são compostos orgânicos que apresentam duplas conjugadas capazes de absorver luz visível e que apresentem em sua estrutura um ou mais anéis benzênicos (SITE 2, 2005). Eles podem poluir cursos d'água, lençóis freáticos e o solo, prejudicando o ambiente e também a saúde humana, já que podem atingir a cadeia alimentar (DURRANT, 2004). Quando os corantes atingem os rios e suas margens, impedem que a luz solar chegue até às plantas, que deixam de realizar a fotossíntese, prejudicando conseqüentemente os animais que ali residem. Além disso, as bactérias do solo, na tentativa de eliminar o corante, podem produzir produtos carcinogênicos, que afetam culturas agrícolas e plantas do entorno, fonte de alimentação para os animais, inclusive o homem (DURRANT, 2003).

O azul de metileno é um corante de uso comum em laboratórios, como corante bacteriológico e indicador, solúvel em água e estável em condições normais de uso e armazenamento. É considerado um material relativamente não perigoso em situações de rotina, mas para evitar contato com a pele, com os olhos ou uma possível inalação, o uso de luvas, avental, óculos e máscara de proteção é recomendado (SITE 3, 2004). Entretanto, intoxicações agudas pela ingestão ou aplicação endovenosa desse corante podem ser extremamente perigosas e levar até a morte, pois atuam na hemoglobina (SITE 4, 2004). Mas, devido a esse mesmo efeito é também usado como medicamento em intoxicações agudas nas quais há formação de metahemoglobina, como acontece com nitrito de sódio e acetonitrila (SITE 4, 2004). A metahemoglobina é formada quando a hemoglobina é reduzida mediante oxidação, do seu estado ferroso de transportador de oxigênio para um estado férrico (ferrihemoglobina). Nesse estado, a hemoglobina é incapaz de se ligar reversivelmente ao oxigênio e, desse modo, torna-se inadequada à função de transporte e liberação de oxigênio. O azul de metileno, na presença de glicose, converte a metahemoglobina não funcionante (férrica) no estado funcionante (ferroso), muito rapidamente (WATKINS, 2005), permitindo o uso desse corante como medicamento (SITE 4, 2004).

O azul jeans (produzido por MIX- Indústria de Produtos Alimentícios Ltda) é um corante para fins alimentícios que mistura água filtrada, álcool etílico e três corantes artificiais: azul brilhante, eritrosina e tartrazina. O azul jeans tem boa solubilidade em água e sua estabilidade quanto à luz, à oxidação e ao aquecimento é classificada como boa (MIX, 2004).

Algumas características dos três corantes artificiais que compõem o azul jeans estão especificadas na Tabela 1, bem como algumas características do azul de metileno.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DO AZUL DE METILENO E DOS CORANTES AZUL BRILHANTE, ERITROSINA E TARTRAZINA, QUE ENTRAM NA COMPOSIÇÃO DO CORANTE AZUL JEANS

CORANTE	AZUL DE METILENO	AZUL BRILHANTE	ERITROSINA	TARTRAZINA
Coloração	azul	azul avermelhada	vermelha	laranja claro
Classe	fenotiazina	triarilmetano	xanteno	monoazóico
Peso molecular	373,91	792,84	897,88	534,37
Fórmula química	$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	$C_{29}H_{64}I_4Na_2O_5 \cdot H_2O$	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
Fórmula estrutural				
Absorbância máxima – nm (em solução aquosa)	609 a 668	630	526	426
Alguns dos outros componentes	-	Compostos insolúveis, compostos orgânicos e metais pesados (arsênio, chumbo, mercúrio e cádmio)	Compostos insolúveis, compostos orgânicos, iodetos inorgânicos, fluoresceína e metais pesados (arsênio, chumbo, mercúrio e cádmio)	Compostos insolúveis, compostos orgânicos, aminas aromáticas primárias não sulfonadas e metais pesados (arsênio, chumbo, mercúrio e cádmio)

FONTE: Ficha técnica do corante artificial azul jeans 800116 fornecido pela MIX – Indústria de Produtos Alimentícios Ltda., São Bernardo do Campo, 2004; www.jtbaker.com/msds/englishhtml/m4381.htm, acessado em 28/10/2004; omlc.ogi.edu/spectra/mb/, acessado em 28/10/2004; apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/docs/0/additive-0059.htm, acessado em 27/01/2005; apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/docs/2/additive-0529.htm, acessado em 27/01/2005; apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/docs/0/additive-0442.htm, acessado em 27/01/2005

3.5 MICORREMEDIAÇÃO

Os fungos basidiomicetos têm sido estudados como uma das possibilidades de organismos que degradam contaminantes. Isso se deve ao fato deles produzirem enzimas polifenol-oxidase, como lacases e peroxidases, as quais são capazes de oxidar resíduos do solo, fazendo, assim, sua “limpeza” (GIANFREDA & BOLLAG, 1994).

Está demonstrado que *Phanerochaete chrysosporium* é capaz de mineralizar diferentes corantes, incluindo azocorantes (SPADARO, *et. al.*, 1992; COUTO *et. al.*, 2000).

CHAGAS & DURRANT (1998) realizaram um estudo com os fungos *P. chrysosporium* e *Pleurotus sajorcaju*. Nesse estudo, os fungos degradaram os corantes amaranço, new coccine, orange G e tartrazina, total ou parcialmente, após oito dias da inoculação. A biodegradação feita pelo *P. chrysosporium* foi relacionada com a atividade de enzimas como a manganês-peroxidase e β -glicosidase. Já as enzimas lacase e glicose-1-oxidase estavam envolvidas no processo de degradação realizado pelo *P. sajorcaju* (TUOR *et. al.*, 1995).

A lacase é uma enzima com a capacidade de catalisar reações de desmetilação, importante no processo biodegradativo (DURAN & ESPÓSITO, 2000) e tem sido demonstrada em diferentes fungos (RODRÍGUEZ *et. al.*, 1999; CIB, 2004; ABADULLA *et. al.*, 2000). Essa enzima participa na descoloração de vários corantes, incluindo o azul de metileno, como observado em *P. pulmonarius* (TYCHANOWICZ *et. al.*, 2004).

Outra enzima relacionada à degradação de corante é a manganês-peroxidase, demonstrada em *Lentinula (Lentinus) edodes* (BOER, *et. al.*, 2004). Nesse caso, o fungo descoloriu total ou parcialmente os corantes testados, sendo que o azul de metileno se encaixa neste último grupo.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS:

O isolado de *Lepista sordida* foi obtido a partir de frutificações coletadas no campus da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) em 2001 e identificado por André de Meijer. O fungo foi cultivado em meio BDA, à temperatura controlada de 26°C, no escuro, para o desenvolvimento do micélio. Após completa ocupação da placa de Petri, repiques periódicos foram realizados. Para garantir os micélios em estoque, isolados foram mantidos em meio BDA à temperatura de 4°C.

4.2 INÓCULOS:

Para a realização dos experimentos, culturas de 11 dias foram utilizadas, idade na qual o micélio está bem desenvolvido e ocupando totalmente a placa. As inoculações foram feitas com discos de 10 mm de diâmetro (discos-inóculo), retirados da borda da placa de cultura.

4.3 CORANTES:

Foram utilizados dois corantes diferentes nos experimentos realizados: azul de metileno (AM) de uso comum em laboratórios e azul jeans (AJ), mistura de três corantes artificiais (azul brilhante, eritrozina e tartrazina) utilizado como corante alimentício, fabricado por MIX-Indústria de Produtos Alimentícios Ltda.

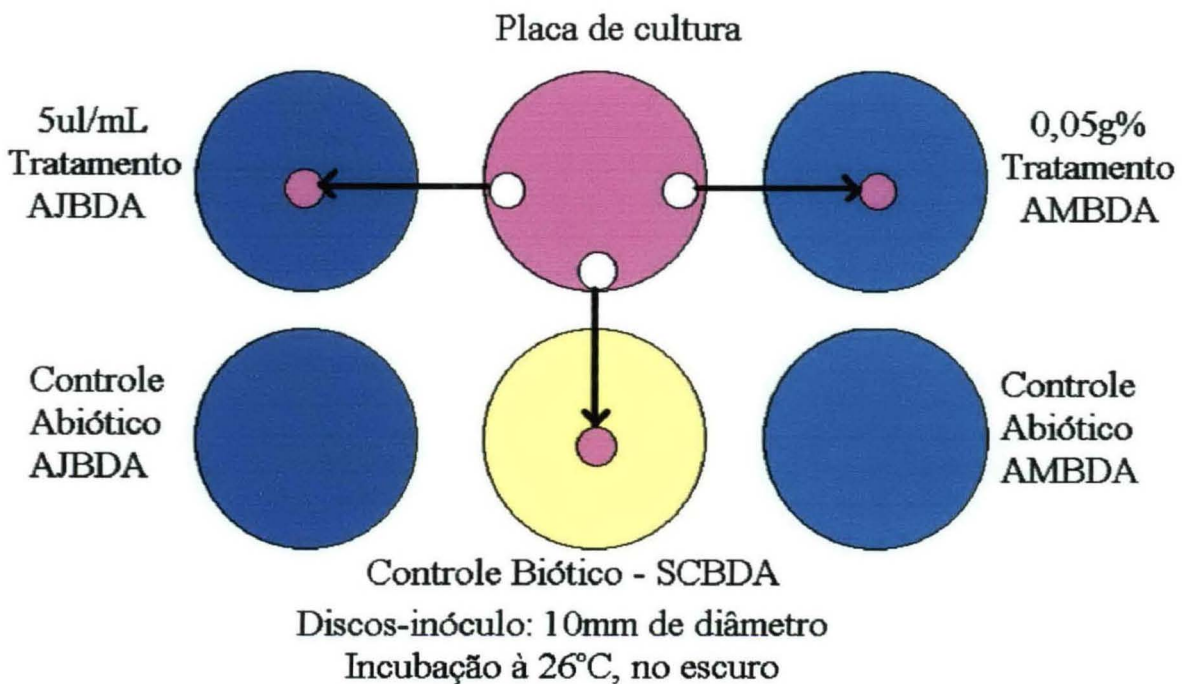
4.4 TRATAMENTOS

O meio sólido BDA foi modificado com a adição dos corantes AM e AJ. O AM foi adicionado na concentração final de 0,05g% e este meio foi referido como AMBDA (meio com adição de azul de metileno). O AJ foi adicionado no volume de

500 μ L em 100mL de BDA, quantidade máxima recomendada para 1 Kg de alimento (neste caso a fábrica não forneceu as concentrações no rótulo). Este meio foi denominado de AJBDA (meio com adição de azul jeans). O controle foi denominado SCBDA (sem adição de corantes no meio). Foram distribuídos 25mL de cada um desses meios (AMBDA, AJBDA e SCBDA) em placas de Petri.

Os discos-inóculo foram depositados no centro das placas. Em algumas destas, foram colocadas lamínulas autoclavadas sobre o meio, as quais foram posteriormente retiradas e analisadas. Dois tipos de controle foram realizados: (1) controle biótico, no qual discos-inóculo foram colocados no centro de placas SCBDA e (2) controle abiótico, em que foram utilizadas as placas AMBDA e AJBDA, sem a adição dos discos-inóculo (Esquema 1). Foram realizados dois experimentos, com 10-14 repetições em cada um deles. Todas as placas foram incubadas no escuro, à temperatura controlada de 26°C.

ESQUEMA 1 – INOCULAÇÃO DAS PLACAS DE CULTURA



4.5 ANÁLISES

Foram analisados os seguintes aspectos:

- (1) morfologia macroscópica das colônias através da observação visual do aspecto e cor do micélio;
- (2) diâmetros das colônias através da medida dos mesmos em centímetros até completar o 12º dia de cultura (análise estatística utilizada: ANOVA);
- (3) morfologia microscópica das colônias: após serem cobertas totalmente pelo micélio, as lamínulas foram retiradas das placas-experimento e transferidas para lâminas de vidro, anteriormente adaptadas com um suporte, e cobertas com outra lamínula de maior tamanho. O suporte foi colocado para que o micélio não fosse pressionado pela lamínula. Assim, as hifas foram observadas *in vivo*, sem a adição de qualquer corante, através do DIC no microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado ao Eclipse E-800 (Nikon®). As imagens e microfilmagens foram visualizadas pelo software Laser Sharp 2000 4.1. Fragmentos do micélio, retirados diretamente das placas de cultura, foram também observados utilizando essa mesma metodologia;
- (4) coloração vital com vermelho neutro: as lamínulas foram coradas com vermelho neutro 0,5% por 5 minutos antes de serem montadas e analisadas através do DIC conforme descrito no item anterior;
- (5) alterações na coloração do meio de cultura: as placas experimento AMBDA e AJBDA foram comparadas visualmente com suas respectivas placas do controle abiótico AMBDA e AJBDA, até completar o 12º dia de cultura.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS

Nas placas SCBDA, pôde-se estabelecer qual o padrão normal de crescimento do *L. sordida* em meio sólido. Inicialmente (2 dias), observou-se uma região central com o micélio aéreo mais desenvolvido, aspecto algodinoso e coloração violácea. A coloração violácea e a aparência algodonosa são bem características deste fungo. A partir daí, o micélio começou a crescer rasteiramente sobre o meio (4-6 dias), espalhando-se até a periferia da placa de Petri. Após a ocupação de toda a área disponível, o micélio aéreo se adensou, ocupando também todo o volume interno da placa como observado aos 8 (Figuras 3A e 5A) e 12 dias (Figuras 4A e 6A).

As Figuras 3 e 4 são representativas do comportamento da colônia do tratamento AMBDA no 8º e no 12º dias de cultivo, respectivamente. As culturas apresentaram-se, em vários aspectos, semelhantes ao controle: micélio violáceo, algodinoso e com crescimento de colônia similar ao controle analisado, sendo que a diferença no crescimento não foi estatisticamente significativa (Tabela 2; Gráfico 1). Além disso, o micélio apresentou-se mais denso na região central e mais rasteiro na periferia (Figuras 3C1 e 3D1) enquanto o controle exibiu micélio denso ao longo de toda a superfície da placa (Figura 3A1).

As Figuras 5 e 6 são representativas do comportamento da colônia do tratamento AJBDA no 8º e no 12º dias de cultivo, respectivamente. A diferença no crescimento não foi estatisticamente significativa (Tabela 2, Gráfico 1). O micélio apresentou-se por vezes esbranquiçado/amarelado, perdendo sua coloração violácea característica (Figuras 5D1 e 6D1), embora em alguns casos também tenha permanecido com sua cor violácea (Figuras 5C1 e 6C1), mais denso na região central e mais rasteiro na periferia (Figura 5C1), como aconteceu nas placas-experimento AMBDA (Figuras 3C1 e 3D1). Além disso, o fundo da placa estava com uma coloração amarela intensa, em alguns casos (Figuras 5D2 e 6D2), bem diferente do

observado no controle (Figura 5A2) e até mesmo nas placas AMBDA (Figura 3C2-D2).

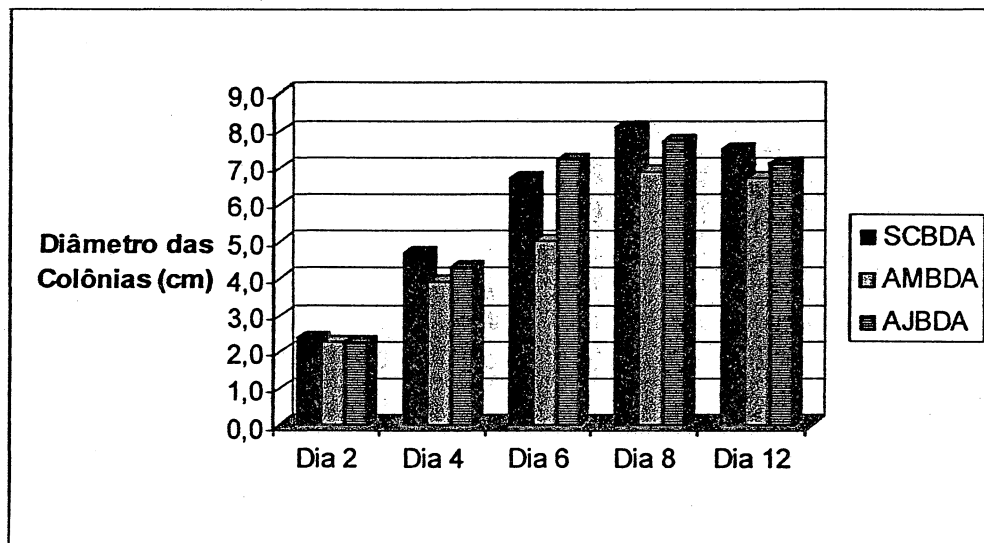
TABELA 2 – DIÂMETRO DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS, EM CM

	SCBDA	AMBDA	AJBDA
Dia 2	2,4 (0,44)	2,3 (0,34)	2,3 (0,29)
Dia 4	4,7 (0,44)	3,9 (0,40)	4,3 (0,81)
Dia 6	6,7 (0,81)	5,0 (0,54)	7,2 (0,91)
Dia 8	8,1 (0,83)	6,9 (0,46)	7,7 (0,86)
Dia 12	7,5 (0,96)	6,7 (0,54)	7,1 (0,66)

FONTE: A autora

NOTA: a média (desvio padrão) do diâmetro das colônias foi medida de dois em dois dias (ANOVA, $p > 0,05$).

GRÁFICO 1 - CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS EM DIFERENTES MEIOS



FONTE: A autora

5.2 DESCOLORAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA AMBDA E AJBDA

Observou-se nítida diferença na coloração do meio de cultura AMBDA ao final dos experimentos. Inicialmente, a descoloração do meio foi sutil, iniciando pela região central da placa. A partir do 8º dia foi observada uma região nitidamente mais clara, com as bordas mais azuladas (Figuras 3C e 3D), em relação ao controle abiótico (Figura 3B). A descoloração tornou-se ainda mais nítida no 12º dia de cultivo (Figuras 4C2 e 4D2), quando não se percebia mais, na maior parte das placas, a tonalidade

azulada original do meio, mostrada no controle biótico (Figura 4B). As placas também foram visualizadas lateralmente, com a finalidade de verificar o halo azul remanescente na periferia (Figura 7), que permaneceu na maioria das placas.

Nos primeiros dias, a descoloração do meio AJBDA não foi visualizada, mas com 8 dias de cultivo, já era possível observar a descoloração do meio em algumas placas (Figura 5D), que apresentaram uma tonalidade azul mais clara centralmente e bordas mais azuis, em relação ao controle abiótico (Figura 5B). Após 12 dias, na maioria das placas de cultura analisadas (Figuras 6C2 e 6D2), a tonalidade azul não pôde mais ser percebida em relação ao azul original presente no controle abiótico (Figura 6B). Quando as placas foram visualizadas lateralmente (Figura 8), pode-se notar o halo azulado remanescente: coloração azul do controle abiótico, em contraste com a tonalidade esverdeada do tratamento.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA *IN VIVO* DAS HIFAS NÃO CORADAS

Não foram notadas diferenças entre as hifas observadas nas lamínulas daquelas provenientes do fragmento micelial, sendo, por esse motivo, analisadas como um todo. As características microscópicas observadas também não diferiram entre as placas controle SCBDA e as placas experimento AMBDA e AJBDA. Em todas as culturas formou-se um emaranhado de hifas (Figura 9A, 9C e 9E), onde foi possível observar uma região de crescimento (Figuras 9B-D), na qual apareceram hifas jovens (que são mais delgadas e com maior conteúdo citoplasmático) em contraste com hifas mais maduras (hifas de maior calibre e pouco conteúdo citoplasmático) (Figuras 9C-E) e ramificações (Figuras 9B e 9F). Nota-se, também, a presença das conexões em gancho, características dos basidiomicetos (Figura 9F).

5.4 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA *IN VIVO* DAS HIFAS CORADAS COM VERMELHO NEUTRO

Em hifas coradas com vermelho neutro ficam em evidência as estruturas ácidas contidas no interior celular. As hifas crescidas em meio AMBDA e AJBDA se apresentaram muito semelhantes ao controle SCBDA. Os resultados mostraram que hifas de maior calibre, mais maduras, possuíam grandes vacúolos, em contraste com hifas mais delgadas, mais jovens, que apresentaram pequenas vesículas ácidas coradas (Figura 10A-G). O detalhe da Figura 10F mostra a presença de pequenas vesículas ácidas no interior do vacúolo.

5.5 DINÂMICA DO CONTEÚDO INTRACELULAR DAS HIFAS

Os resultados obtidos através de microfilmagem de hifas sem nenhuma coloração revelaram uma movimentação intracelular semelhante nas hifas crescidas em meio SCBDA, AMBDA e AJBDA. Um aspecto interessante constatado foi a intensa movimentação de vesículas intracelulares mostrado no Filme 1. Hifas de maior calibre, apresentam-se mais vazias, e obviamente, com menos organelas se movimentando, quando comparadas as hifas mais delgadas, que exibem maior conteúdo com movimentação intracelular (Filme 2). Essa movimentação acontece livremente nas ramificações (Filme 3).

Da mesma forma, as hifas crescidas em meio SCBDA, AMBDA e AJBDA, coradas com vermelho neutro, apresentaram resultados semelhantes entre si. O corante vermelho neutro evidencia compartimentos ácidos citoplasmáticos e também é utilizado para analisar a viabilidade celular. As microfilmagens evidenciaram vesículas ácidas e grandes vacúolos se movimentando direcionalmente através das hifas (Filmes 4 e 5), inclusive nas conexões em gancho (Filme 4). Além disso, o fluxo de vesículas entre as hifas e a movimentação direcionada puderam ser observados no Filme 6. Geralmente, nas regiões em que apareceram os septos, como próximo às conexões em

gancho, o movimento foi mais aleatório, sendo mais direcionado nas outras regiões (Filme 7).

Um aspecto interessante que pôde ser observado, além do movimento direcionado, foi a ruptura dos grandes vacúolos nas hifas de maior calibre, culminando com o extravasamento do conteúdo intravacuolar (Filmes 8 e 9). As imagens sugerem que os vacúolos continham vesículas ácidas de menor tamanho em seu interior, as quais ficam livres no citoplasma após a ruptura do vacúolo.

FIGURAS

FIGURA 3 – Colônias de 8 dias crescidas em meios AMBDA e SCBDA. Dimensão das placas de Petri: 8,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade. A primeira coluna representa a face superior das placas de cultura e a segunda coluna representa a respectiva face inferior das mesmas. A1-A2. Controle biótico, evidenciando o micélio violáceo e algodinoso. B1-B2. Controle abiótico, mostrando a coloração azul do meio AMBDA. C1-C2, D1-D2. Leve descoloração do meio de cultura, mas morfologia semelhante ao controle biótico, em culturas crescidas em meio AMBDA

FIGURA 4 - COLÔNIAS DE 12 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AMBDA E SCBDA

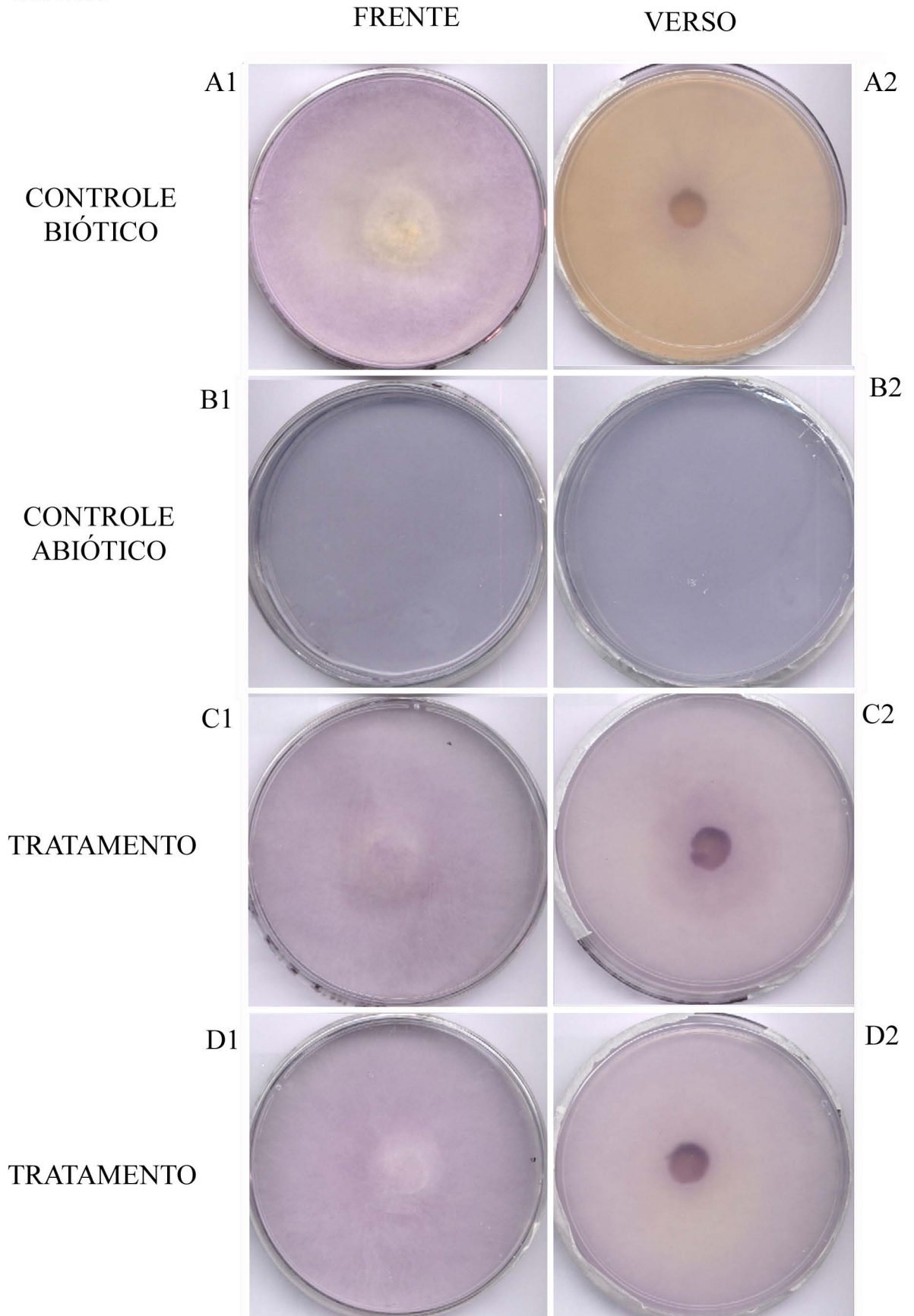


FIGURA 4 - Colônias de 12 dias crescidas em meios AMBDA e SCBDA. Dimensão das placas de Petri: 8,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade. A primeira coluna representa a face superior das placas de cultura e a segunda coluna representa a respectiva face inferior das mesmas. A1-A2. Controle biótico, evidenciando o micélio violáceo e algodinoso. B1-B2. Controle abiótico, mostrando a coloração azul original do meio de cultura. C1-C2, D1-D2- Micélio bem desenvolvido e acentuada descoloração do meio de cultura, notada principalmente na face inferior

FIGURA 4 - COLÔNIAS DE 12 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AMBDA E SCBDA

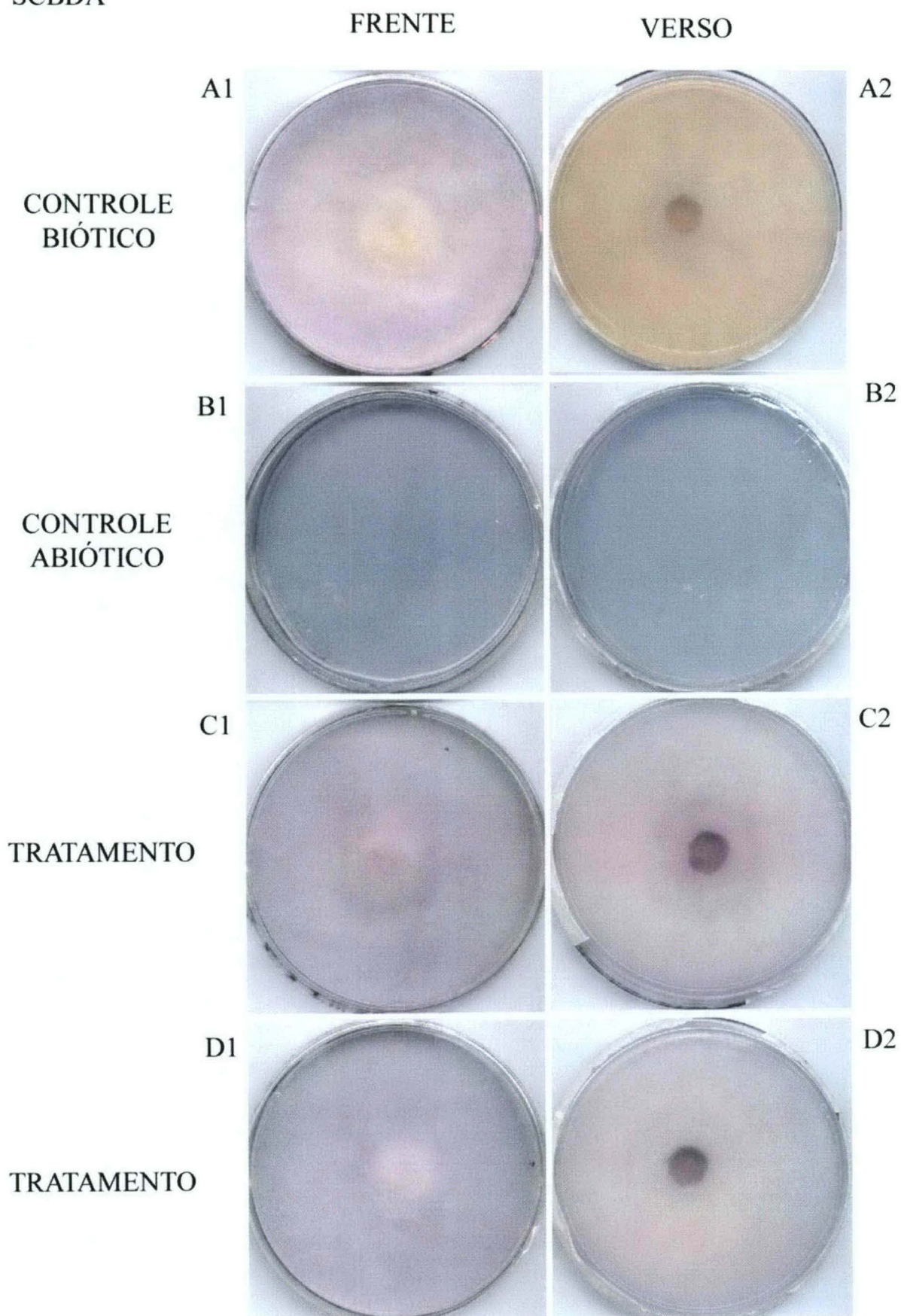


FIGURA 5 – Colônias de 8 dias crescidas em meios AJBDA e SCBDA. Dimensão das placas de Petri: 8,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade. A primeira coluna representa a face superior das placas de cultura e a segunda coluna representa a respectiva face inferior das mesmas. A1-A2. Controle biótico, evidenciando o micélio violáceo e algodinoso. B1-B2. Controle abiótico, mostrando a coloração azul original do meio AJBDA. C1-C2. Placas tratadas, mas sem evidências de descoloração. D1-D2. Alteração na coloração do micélio e visível descoloração do meio de cultura

FIGURA 5 - COLÔNIAS DE 8 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AJBDA E SCBDA

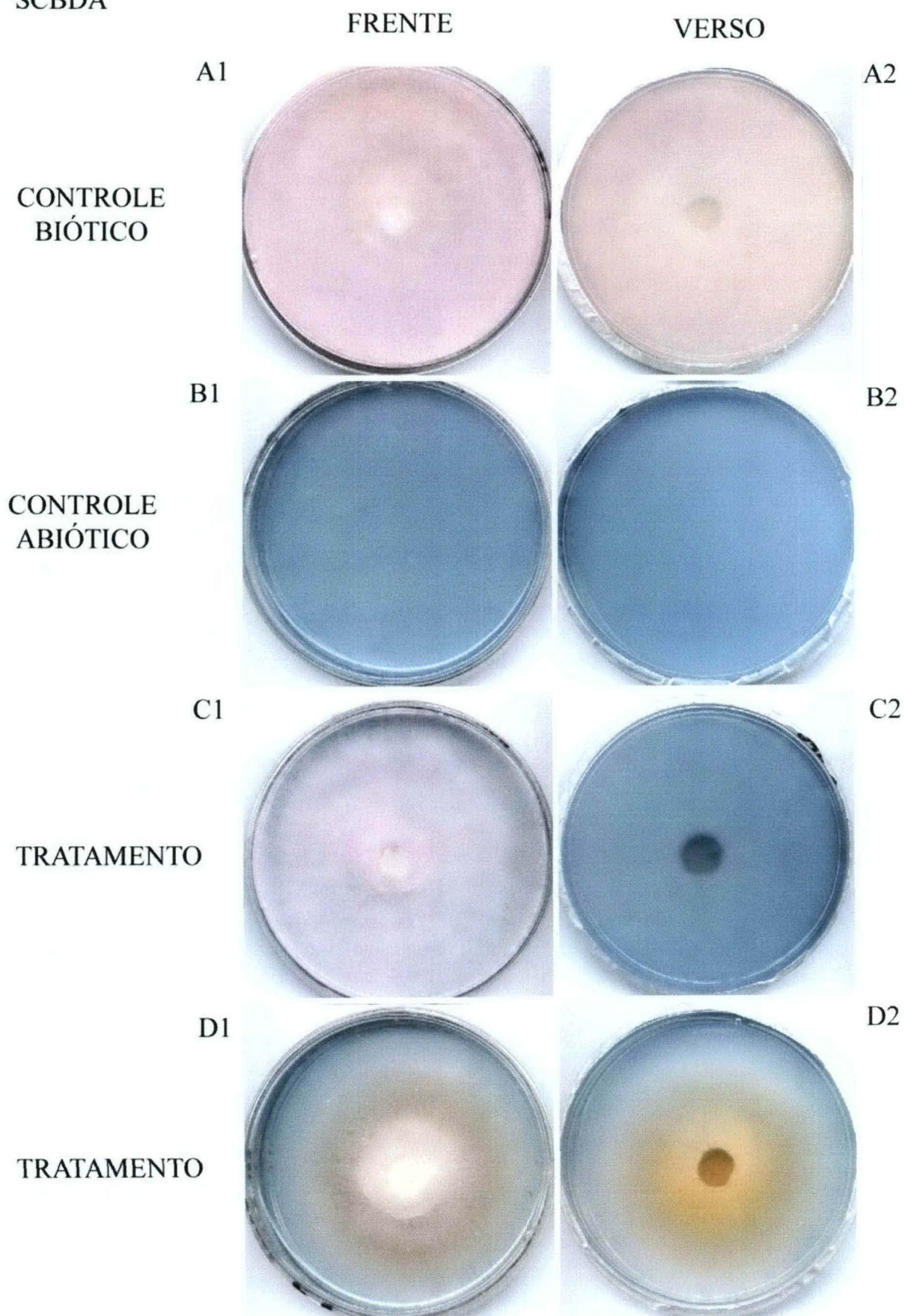


FIGURA 6 – Colônias de 12 dias crescidas em meios AJBDA e SCBDA. Dimensão das placas de Petri: 8,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade. A primeira coluna representa a face superior das placas de cultura e a segunda coluna representa a respectiva face inferior das mesmas. A1-A2. Controle biótico, evidenciando o micélio violáceo e algodinoso. B1-B2. Controle abiótico, mostrando a coloração azul original do meio de cultura. C1-C2. Micélio bem desenvolvido e acentuada descoloração do meio de cultura, notada principalmente na face inferior. D1-D2. Alteração da coloração do micélio e descoloração do meio de cultura, notada principalmente na face inferior

FIGURA 6 - COLÔNIAS DE 12 DIAS CRESCIDAS EM MEIOS AJBDA E SCBDA

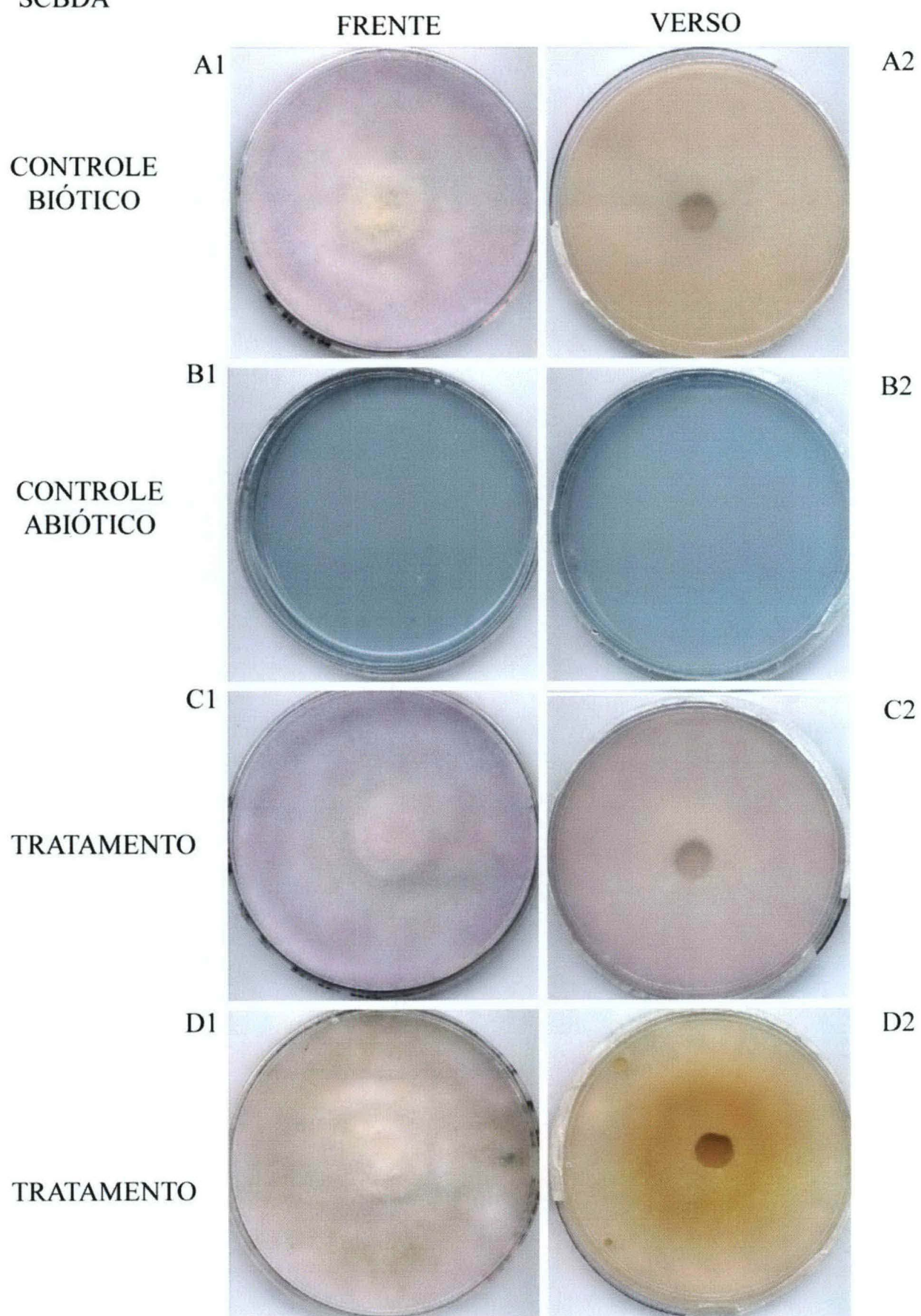


FIGURA 7 – Perfil das placas do tratamento AMBDA mostrando a descoloração do meio de cultura. Nota-se a coloração azul mais clara do tratamento em relação à tonalidade azul mais escura do controle abiótico. Também se observa o perfil das colônias crescidas em meio SCBDA (controle biótico)

FIGURA 8 - Perfil das placas do tratamento AJBDA mostrando a descoloração do meio de cultura. Nota-se a alteração da coloração do meio de cultura de azul para esverdeado no tratamento, em contraste com a tonalidade azul do controle abiótico. Também se observa o perfil das colônias crescidas em meio SCBDA (controle biótico)

FIGURA 7 - PERFIL DAS PLACAS DO TRATAMENTO AMBDA MOSTRANDO A DESCOLORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

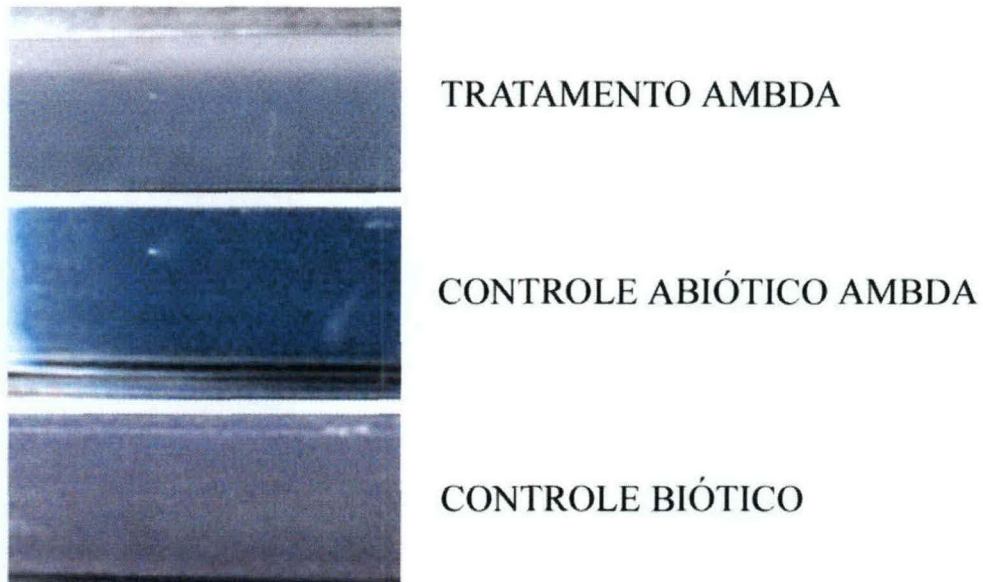


FIGURA 8 - PERFIL DAS PLACAS DO TRATAMENTO AJBDA MOSTRANDO A DESCOLORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

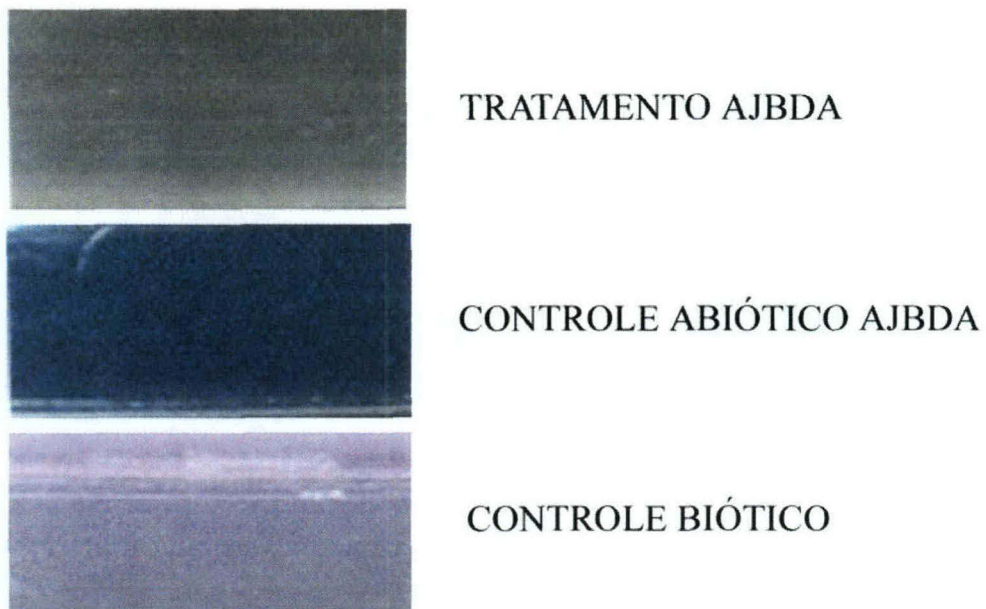


FIGURA 9 – Aspecto microscópico das hifas não coradas e analisadas através de DIC.

A. Hifas crescidas em meio SCBDA retiradas de fragmentos do micélio, mostrando o aspecto geral: um emaranhado de hifas de diferentes calibres. B. Hifas crescidas em meio SCBDA, observadas nas lamínulas, mostrando uma região de crescimento com hifas jovens apicais (setas finas), hifas mais maduras (seta grossa) e conexões em gancho (asterisco). C. Hifas crescidas em meio AMBDA, mostrando o aspecto geral das hifas em diferentes fases de desenvolvimento (hifas jovens -seta fina- e maduras -seta grossa); nota-se, centralmente, uma região de crescimento. D. Hifas crescidas em meio AMBDA, mostrando hifas maduras “vazias” (seta grossa) e hifas mais jovens (seta fina). E. Hifas crescidas em meio AJBDA, mostrando o aspecto geral da região de crescimento com hifas mais jovens (seta fina) e mais maduras (seta grossa). F. Hifas crescidas em meio AJBDA, mostrando o início de uma ramificação de hifa (seta fina) e a conexão em gancho (asterisco) (Barras = 10 μ m)

FIGURA 9 - ASPECTO MICROSCÓPICO DE HIFAS NÃO CORADAS

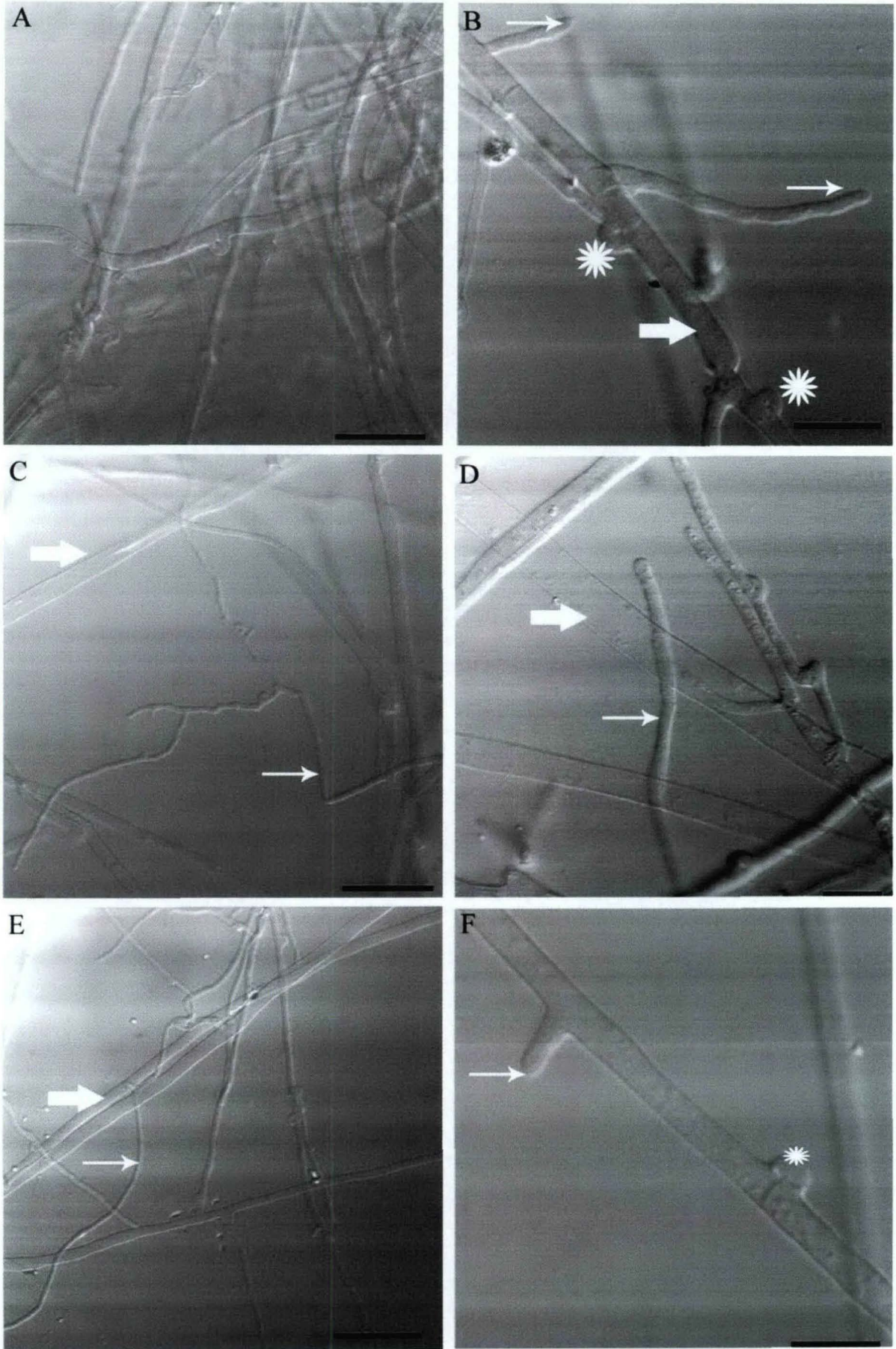
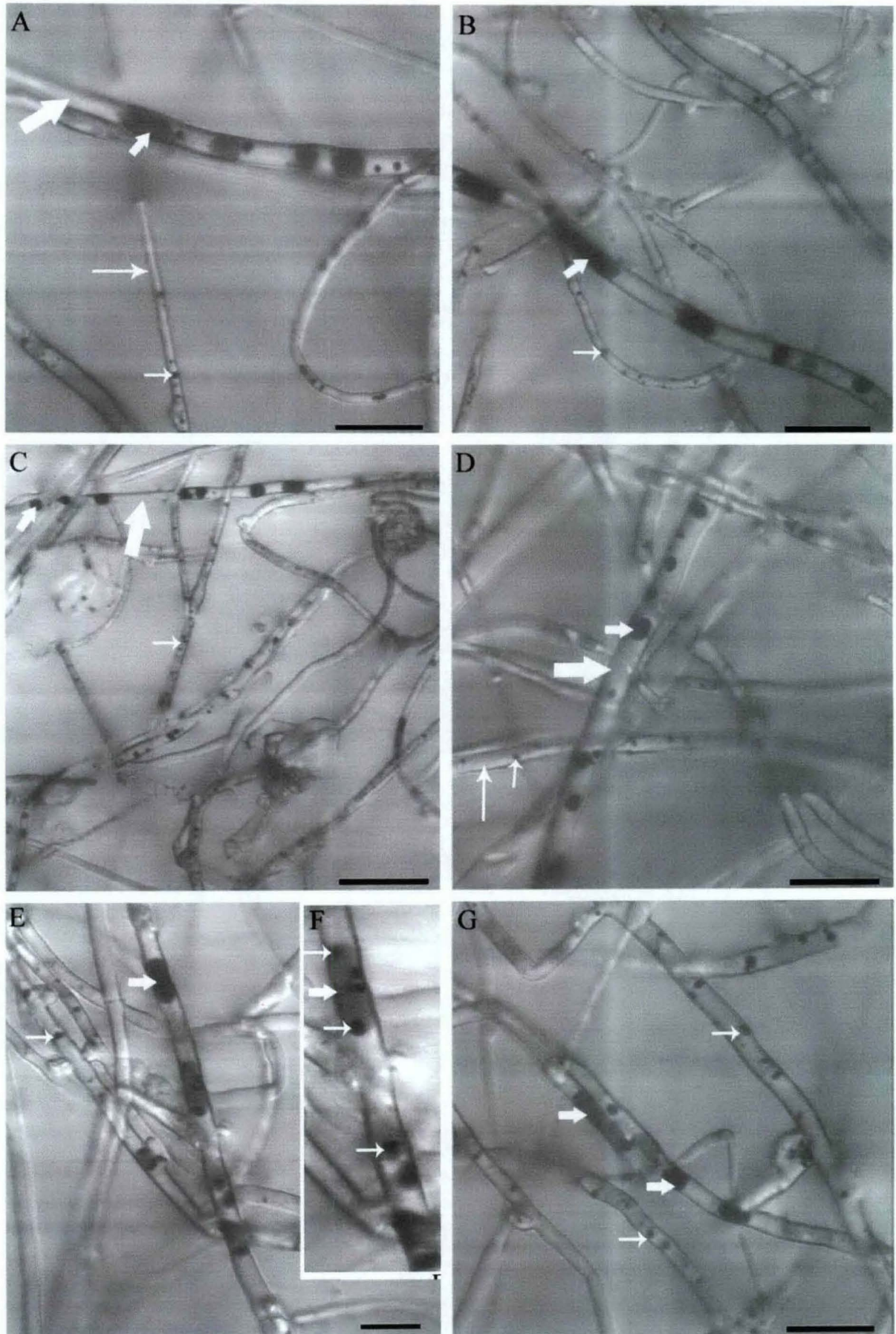


FIGURA 10 - Aspecto microscópico de hifas coradas com VN e analisadas através de DIC. A. Hifas crescidas em meio SCBDA, mostrando hifas grossas (seta grossa maior) com grandes vacúolos (seta grossa menor) e hifas mais delgadas (seta fina maior) com vesículas ácidas menores (seta fina menor). B. Hifas crescidas em meio AJBDA mostrando grandes vacúolos (seta grossa) e vesículas ácidas de menor tamanho (seta fina). C. Hifas crescidas em meio AMBDA, mostrando o aspecto geral das hifas, com hifas delgadas (seta fina) com pequenas vesículas ácidas e hifas grossas (seta grossa maior) com grandes vacúolos (seta grossa menor). D. Hifas crescidas em meio AMBDA, mostrando hifas mais grossas (seta grossa maior) com vesículas ácidas maiores (seta grossa menor) e mais hifas delgadas (seta fina maior) com vesículas menores (seta fina menor). E. Hifas crescidas em meio AJBDA, mostrando grandes vacúolos (seta grossa) e outras vesículas ácidas menores (seta fina) no citoplasma das hifas. F. Detalhe da figura anterior, mostrando pequenas vesículas ácidas (setas finas) no interior dos vacúolos (seta grossa). G. Hifas crescidas em meio AJBDA, mostrando pequenas vesículas ácidas (setas finas) e grandes vacúolos (setas grossas) no citoplasma (Barras = 10 μ m)

FIGURA 10- ASPECTO MICROSCÓPICO DE HIFAS CORADAS COM VN



LEGENDAS DOS FILMES

FILME 1 – Hifas crescidas em meio SCBDA, sem coloração, mostrando segmentos de hifas com intensa movimentação do conteúdo citoplasmático

FILME 2 – Hifas crescidas em meio AMBDA, sem coloração, mostrando hifas mais jovens (delgadas), com muito conteúdo intracelular e movimentação de vesículas no citoplasma; hifas mais maduras (grossas), com pouco conteúdo intracelular

FILME 3 – Hifas crescidas em meio SCBDA, sem coloração, mostrando as ramificações e a movimentação intracelular de vesículas

FILME 4 – Hifas crescidas em meio SCBDA, coradas com vermelho neutro. Evidente fluxo direcionado e fluxo de vesículas ácidas entre as hifas. Estas vesículas estão presentes, também, nas conexões em gancho

FILME 5 – Hifas crescidas em meio SCBDA e coradas com vermelho neutro. Aparecem hifas mais delgadas com vesículas ácidas pequenas em contraste com hifas grossas com grandes vacúolos. Notar o direcionamento do movimento

FILME 6 - Hifas ramificadas crescidas em meio AMBDA e coradas com vermelho neutro, mostrando vesículas ácidas, grandes vacúolos e evidente movimentação direcionada. O fluxo entre as hifas também pode ser percebido

FILME 7 – Hifas crescidas em meio SCBDA e coradas com vermelho neutro, mostrando os movimentos aleatórios em regiões de septos

FILME 8 - Hifas crescidas em meio AMBDA e coradas com vermelho neutro, nas quais existe um direcionamento dos grandes vacúolos e outras vesículas ácidas

existentes. Num dado momento, os vacúolos arrebentam, liberando seu conteúdo no citoplasma. Notar que dentro deles existiam vesículas ácidas de menor tamanho

FILME 9 – Emaranhado de hifas crescidas em meio AJBDA e coradas com vermelho neutro. Aparecem hifas de menor calibre com vesículas ácidas menores e hifas de maior calibre, que apresentam grandes vacúolos com vesículas ácidas em seu interior, as quais são liberadas no citoplasma no momento em que os vacúolos arrebentam. O fluxo direcionado pode ser percebido

6 DISCUSSÃO

As características observadas nas culturas estão de acordo com os resultados já demonstrados em culturas de *L. sordida* (GRAF, 2004): micélio com coloração violácea e aspecto algodinoso, inclusive no tratamento AMBDA. Apesar da coloração do micélio ter sido afetada no tratamento AJBDA após 8-12 dias de cultura, de uma maneira geral o crescimento radial e o comportamento das hifas observadas nas análises microscópicas (morfologia, movimentação citoplasmática e vacuolização) foram semelhantes entre os controles e os diferentes tratamentos. Esse é um feito extremamente positivo, pois demonstra que o fungo é capaz de crescer em condições de alta concentração dos corantes, fundamental na biorremediação. Um bom micorremediador deve ser minimamente afetado pelo agente tóxico, ou seja, deve ser tolerante ao poluente (TONG *et. al.*, 2004).

A descoloração de ambos os corantes dos meios AMBDA e AJBDA foi alcançada com sucesso pelo *L. sordida* ao final dos 12 dias de incubação. Provavelmente, o fungo estudado produz enzimas, constatadas em outros basidiomicetos, como nas espécies *Phanerochaete chrysosporium* (TUOR *et. al.*, 1995) e *Lentinula (Lentinus) edodes* (BOER, *et. al.*, 2004) produtores de manganês-peroxidase e *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* (RODRÍGUEZ *et. al.*, 1999; CIB, 2004; ABADULLA *et. al.*, 2000), *Pleurotus pulmonarius* (TYCHANOWICZ *et. al.*, 2004) e *Pleurotus sarcocaju* (TUOR *et. al.*, 1995) produtores de lacase.

O conjunto dessas enzimas é capaz de decompor inúmeros compostos orgânicos. Por exemplo, a lacase desmetila cadeias poliméricas, como a lignina, e, em seguida, faz a decomposição de macromoléculas, pelo rompimento de anéis aromáticos e de ligações entre carbonos das estruturas fenólicas (DURAN & ESPÓSITO, 2000). Da mesma forma, está demonstrado que o azul de metileno (estrutura abaixo) é oxidado pela lignina peroxidase (tipo II) através de N-demetilações seguida pela quebra dos anéis aromáticos (FERREIRA –LEITÃO, 2003).

Está bem determinado que a lignina peroxidase, enzima considerada chave da descoloração de corantes, é produzida em condições de deficiência nutricional do meio

(WONG & YU, 1999). Da mesma forma, a lacase é produzida em condições de baixas concentrações de glicose (WONG & YU, 1999). Podemos especular que, neste trabalho, as enzimas envolvidas na descoloração também começaram a ser secretadas após a depleção de nutrientes, uma vez que a descoloração dos meios de cultura AMBDA e AJBDA acontecia nas regiões mais velhas (regiões centrais) e em toda a placa de forma mais intensa a partir do 12º dia da inoculação, isto é, após um certo período de crescimento que pode ser compatível com a diminuição dos nutrientes. A borda das placas mostrando uma leve coloração azulada também é compatível com essa hipótese, uma vez que nessas regiões as hifas são jovens e, provavelmente, há maior riqueza de nutrientes. Uma vez que *L. sordida* promoveu completa descoloração do azul de metileno em água (resultados não mostrados), é possível que o tempo de incubação em meio sólido tenha sido insuficiente para ser observada completa descoloração em todas as placas. É mesmo provável que os esqueletos de carbono resultantes da ação de enzimas sobre os corantes seja utilizado como fonte de carbono, uma vez que a finalidade dessas enzimas é justamente quebrar as moléculas, como lignina, para serem utilizadas como nutrientes (MOORE & LANDEKER, 1996).

O azul de metileno já havia sido relatado como sendo um corante que é degradado parcialmente pela ação de fungos, como *P. pulmonarius* (TYCHANOWICZ *et. al.*, 2004) e *L. edodes* (BOER, *et. al.*, 2004). Existem outros fungos que também descolorem apenas parcialmente outros corantes, como o *P. chrysosporium*, que descoloriu mais de 95% de uma amostra com o corante poli-R-478, (COUTO, *et. al.* 2000) e o *P. sanguineus* que descoloriu 92% do vermelho congo e 40% do verde malaquita (PINKOSKI & THOMAS, 2004). O processo de degradação dos corantes é influenciado pela composição dos meios de cultura, o pH e o tempo de incubação (PINKOSKI & THOMAS, 2004; WONG & YU, 1999).

A degradação do azul jeans provavelmente se deva aos mesmos sistemas enzimáticos. A degradação do corante tartrazina pode produzir um produto que absorve luz visível, mantendo a coloração do meio de cultura mesmo com a degradação (KULLA *et. al.*, 1983). Como a tartrazina entra na composição do corante azul jeans, talvez seja ela a responsável pela persistência de coloração em alguns

meios analisados. A alteração de azul para verde pode ser devida à combinação do azul brilhante remanescente com o laranja claro da tartrazina.

O tempo que *L. sordida* levou para efetuar a descoloração é aproximado de outros basidiomicetos, embora as condições de ensaio e os corantes sejam diferentes. O *P. chrysosporium* degradou corantes artificiais total ou parcialmente em oito dias (CHAGAS & DURRANT, 1998). O *P. sajorcaju* apresentou semelhante resultado no mesmo trabalho realizado por CHAGAS & DURRANT (1998). O fungo *P. pulmonarius* descoloriu total ou parcialmente os corantes testados após 6 dias de cultivo (TYCHANOWICZ *et. al.*, 2004); enquanto *Pycnoporus sanguineus* reduziu a concentração de corantes após 2 dias em cultura líquida (PINKOSKI & THOMAS, 2004). Portanto, a maioria dos fungos aqui descritos demora de dois a oito dias para descolorir os corantes, embora o fungo *Lentinula (Lentinus) edodes* tenha demorado mais tempo para uma total ou parcial descoloração (18 dias de cultivo) (BOER, *et. al.*, 2004), levando até mais tempo que o próprio *L. sordida*.

Os dados demonstrando maior conteúdo intracelular nas hifas mais jovens (mais delgadas) e pouco conteúdo em hifas mais maduras (de maior diâmetro) estão de acordo com relatos anteriores utilizando corpos lipídicos como referencial. A presença de corpos lipídicos no citoplasma das hifas foi observada principalmente nas hifas mais finas e nas hifas em crescimento, em contraste com hifas de maior calibre, que se encontraram praticamente vazias (GRAF, 2004).

A capacidade dos fungos armazenarem em seus vacúolos compostos do meio, como metais pesados, tem sido amplamente estudada em basidiomicetos (KALAC & SVOBODA, 2000; VETTER & BERTA, 1997). Os resultados observados neste trabalho, através de DIC e de microscopia de luz transmitida, demonstrando que não houve acúmulo dos corantes no interior dos vacúolos, sugerem que os mesmos não são captados por endocitose de fase fluída e nem atravessam a membrana, diferentemente do que aconteceu com vermelho neutro. O vermelho neutro é um corante vital que se acumula em compartimentos ácidos (ALLISON & YOUNG, 1969), como os vacúolos, que são de natureza ácida (KLIONSKY *et al.*, 1990).

Embora o mecanismo de captação do corante vermelho neutro em células animais ainda não esteja totalmente esclarecido (NAKA *et al.*, 1995), aceita-se que o mesmo penetra nas células por difusão passiva através da membrana plasmática (LOWE *et al.*, 1995), ou através de endocitose (WEBER *et al.*, 2001) e é retido no lisossoma devido à protonação em pH ácido (SEGLÉN, 1983). O pH ácido é mantido através de uma bomba de prótons que utiliza ATP e que na endocitose também há gasto de ATP (ALBERTS *et al.*, 2000; KLIONSKY *et al.*, 1990). Assim, a retenção do corante nos lisossomas é vastamente utilizada como parâmetro para o estudo da integridade de membrana desse compartimento em variados tipos celulares (LINDSAY *et al.*, 1995; LOWE *et al.*, 1995; REPETTO *et al.*, 1995; SVEDSEN & WEEKS, 1995). Portanto, o fungo crescido em AMBDA e AJBDA apresenta viabilidade e atividade semelhantes ao controle.

A coloração com o vermelho neutro evidenciando a presença de vacúolos maiores em hifas de maior diâmetro e vesículas menores no interior das hifas jovens demonstra vacuolização durante o envelhecimento. Embora não tenham sido encontradas referências que abordem esse assunto em hifas, esse fenômeno já foi mostrado em conídios de *C. graminicola*. Nesses conídios observou-se o acúmulo de pequenas e numerosas vesículas de vermelho neutro no interior celular de conídios jovens e vesículas maiores em conídios velhos (LEITE; 1992; SCHADECK *et al.*, 2003). A fragmentação de grandes vacúolos, contendo corantes, pela ação do laser já havia sido observada anteriormente em conídios de *Colletotrichum acutatum*, tratados com PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil, um inibidor de protease) e corados com laranja de acridina (CARMO, 2003). Provavelmente o corante captado aumenta a pressão osmótica, fragilizando os vacúolos, que não resistem à incidência do laser. As vesículas pequenas que são liberadas podem corresponder a vesículas intravacuolares conforme observada em *C. graminicola* e *C. acutatum* (SCHADECK *et al.*, 2003). Essas vesículas estão de acordo com a presença de vesículas intravacuolares observadas através de microscopia eletrônica de transmissão de hifas de *L. sordida*, fixadas e processadas em 2003 por Letícia Graf (resultados não publicados).

A movimentação direcionada, isto é, um fluxo citoplasmático em uma direção, que acontece de forma similar entre os tratamentos e o controle, deve acontecer sobre os filamentos do citoesqueleto, como em todas as células eucarióticas (ALBERTS *et al.*, 2000). Além disso, está demonstrado em fungos que os microtúbulos desempenham um papel fundamental no transporte de várias organelas, na manutenção do crescimento (FUCHS *et al.*, 2002; BANUETT & HERSKOWITZ, 2002) e na septação (BANUETT & HERSKOWITZ, 2002). Esse transporte de organelas acontece com gasto de ATP (ALBERTS *et al.*, 2000). Logo, está acontecendo produção de ATP também para essa função celular, similar à retenção do vermelho neutro.

Como as hifas dos basidiomicetos são septadas (HAVEN *et al.*, 1996), a interrupção do fluxo nessas regiões provavelmente é devida à barreira mecânica da parede celular. Os resultados mostrando movimentos aparentemente mais aleatórios nessas regiões, como nas próximas às conexões em gancho, sugerem que as vesículas, ao encontrarem a “barreira” (septo), ficam batendo na mesma e em outras vesículas. É comum a formação de septos próximo ao local de fusão das hifas, como na fusão que ocorre em estruturas especializadas dos basidiomicetos, as conexões em gancho (GLASS *et al.*, 2004).

Fungos filamentosos crescem de uma maneira altamente polarizada e com hifas extremamente alongadas (XIANG & PLAMANN, 2003), o que pode contribuir para o fluxo monodirecional observado. Mudanças no fluxo citoplasmático são freqüentemente associadas com a fusão das hifas, como aquelas que ocorrem nas conexões em gancho (GLASS *et al.*, 2004). Já foi determinado que a fusão de hifas (que ocorre durante o ciclo de vida de fungos filamentosos) tem importantes funções, como a comunicação entre hifas, translocação de água e nutrientes e homeostase geral dentro da colônia (RAYNER, 1996; GREGORY, 1984). No *L. sordida*, ocorrem fusões de hifas nas conexões em gancho e embora, neste estudo, não tenham sido observadas fusões de hifas em outras regiões, há a possibilidade de que elas ocorram, já que essas fusões ocorrem naturalmente em outros fungos filamentosos (GLASS *et al.*, 2004).

O conjunto de resultados indica que os corantes utilizados não afetam significativamente o crescimento e a biologia celular de *L. sordida*, o qual é capaz de descolorir o meio de cultura. Dessa maneira, o fungo basidiomiceto *Lepista sordida* tem potencial para ser usado na micorremediação. Entretanto, estudos mais detalhados que avaliem bioquimicamente as amostras, para revelar quais enzimas participam do processo e quais produtos são formados, deverão ser realizados em trabalhos futuros para confirmar tal potencial.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que:

- O micélio tem aspecto algodinoso, coloração violácea e ocupa todo o volume da placa de cultura em 12 dias;
- O aspecto geral do micélio caracteriza-se por hifas sobrepostas, ramificadas, de diferentes calibres e que apresentam conexões em gancho;
- As hifas mais delgadas são mais jovens, apresentam maior conteúdo intracelular e vesículas ácidas de menor tamanho; enquanto as hifas de maior diâmetro são mais velhas, possuem pouco conteúdo intracelular e grandes vacúolos com vesículas ácidas em seu interior;
- Existe um intenso movimento no interior do citoplasma das hifas, sendo que são movimentos mais desordenados em regiões onde existem septos e movimentos mais direcionados em outras regiões;
- O fungo tem a capacidade de descolorir os corantes azul de metileno e azul jeans (adicionados em meio sólido BDA) após 12 dias de cultivo;
- Os corantes adicionados no meio não afetaram, aparentemente, a estrutura e a fisiologia celular das hifas;
- *L. sordida* representa um fungo com potencial para ser empregado na micorremediação de corantes em meio sólido.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADULLA, E.; ROBRA, K. H.; GUBITZ, G. M.; SILVA, L. M.; CAVACO-PAULO, A. Enzymatic decolourisation of textile dyeing effluents. **Text. Res. J.**, v. 70, p. 409-414, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. New York; London, 2000.
- ALLISON, A. C; YOUNG, M. R. In: DINGLE, J., T.; DEAN, R. T. **Lysosomes in Biology and Pathology**, North-Holland Publishing Company – Amsterdam, London, v. 2, p. 620-625, 1969.
- BANUETT, F.; HERSKOWITZ, I. Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. **Fungal Genet Biol.**, v. 37, p. 149-170, 2002.
- BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M. de.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 2, p. 107-112, 2004.
- CARMO, A. E. do. **Estudos sobre a mobilização de lipídeos durante a germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum***. Curitiba, 2003. Relatório de Iniciação Científica-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Avaliação da descoloração de azo-corantes por fungos basidiomicetos. In: **II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**. Florianópolis: Anais da II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, p.1-6, 1998.
- CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. Nova Tecnologia Limpa o Meio Ambiente de Forma Natural. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/biotech08.pdf>> Acessado em 22/07/2004.
- COUTO, S. R.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M. R.; SANROMÁN, A. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biores. Technol.**, v. 74, n. 2, p. 159-164, 2000.
- DURAN, N.; ESPÓSITO, E. Potencial applications of oxidative enzyme and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment a review. **Appl. Catal. B: Environ.**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

DURRANT, L. R. Fungos e bactérias degradam corantes poluidores. **Jornal da Unicamp**, ed. 238, 17 a 30 nov. 2003. p. 4. Entrevista.

DURRANT, L. R. Microrganismos são utilizados no combate à poluição das indústrias. **Correio Popular**, Cenário XXI, 30 maio 2004. Entrevista.

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

FUCHS, F.; PROKISCH, H.; NEUPERT, W.; WESTERMANN, B. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **J Cell Sci.**, v. 115, p. 1931-1937, 2002

GIANFREDA, L.; BOLLAG, J. M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 58, p. 1672-1681, 1994.

GLASS, N. L.; RASMUSSEN, C.; ROCA, M. G.; READ, N. D. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectetedness. **TRENDS in Microbiology**, v. 12, n. 3, 2004.

GRAF, L. V. **Biologia Celular, Interações Micelianas e Cultivo de *Lepista sordida***. Curitiba, 2004. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GREGORY, P. H. The fungal mycelium: a historical perspective. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 82, p. 1-11, 1984.

HAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN. S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 69, p. 273-281, 2000.

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P. K.; EMR, S. D. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 266-292, 1990.

KULLA, H. J.; KLAUSENER, U.; MEYER, B.; LUDEKE, B.; LEISINGER, T. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes orange I and orange II. **Arch. Microbiol.**, v. 135, v. 1-7, 1983.

KUNS, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. de; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25. n. 1, p.78-82, São Paulo, jan./fev., 2002.

LEITE, B. **Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development.** West Lafayette, 1992. Tese de Doutorado - Purdue University.

LILLOA. The Agaricales (Mushrooms) In **Modern Taxonomy**. Tucuman, República Argentina, v. 22, 833 p., 1949.

LINDSAY, C. D.; J. L. HÁ, BROOK, J. L.; USPHALL. Examination of toxicity of *Clostridium perfringens* E-Toxin in MDCK cell line. **Toxic. In Vitro**, v. 9, p. 213-218, 1995.

LOWE, D. M.; SOVERCHIA, C.; MOORE, M. N. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. **Aquatic Toxicol.**, v. 33, p. 105-106, 1995.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 261-278, 2004.

MARKHAM P.; BAZIN M. J. Decomposition of Cellulose by Fungi. In: Arora, D. **Handbook of Applied Mycology**, Delhi, ed. CRC Press, p. 393-424, 1983.

MESSENGUY, F.; COLIN, D.; TEN HAVE, J. Regulation of compartmentation of amino pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. **Eur. J. Biochem**, v. 108, p. 439-447, 1980.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **Int. J. Plant. Sci.**, n. 156, p. 9-18, 1995.

MIX – Indústria de Produtos Alimentícios Ltda. Ficha técnica corante artificial azul jeans 800116, São Bernardo do Campo, 2004.

MOORE-LANDECKER E. **Fundamentals of the Fungi**. 4 ed. Prentice-Hall Inc., 1996.

MUNN, A. L. The yeast endocytic membrane transport system. **Microsc. Res. Tech.**, v. 51, p. 547-562, 2000.

NAKA, W.; FUKUDA, T.; OHMI, T.; KANAI, K.; NISIKAWA, T. Ultrastructure of *Trichophyton mentagrophytes* stained with neutral red. **J. Med. Veter. Mycol.**, v. 33, p. 141-143, 1995.

PINKOSKI, P. I.; THOMAS, R. W. S. P. Degradação de corantes vermelho congo e verde malaquita pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*. Disponível em: <www.ufsc.br/ccb/PDF/5.9.PDF> Acessado em 07/11/2004.

RAYNER, A. D. M. Interconnectedness and individualism in fungal mycelia. In **A Century of Mycology** (Sutton, B.C., ed) Cambridge University Press, p. 193–232, 1996.

REPETTO, G.; SANZ, P.; REPETTO, M. Effects of cobalt on mouse neuroblastoma cells culture “in vitro”. **Toxic. in Vitro**, v. 9, p. 375-579, 1995

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Curr. Microbiol.**, v. 38, n. 1. p. 27-32, 1999.

SCHADECK, R. J. G.; LEITE, B.; BUCHI, D. F. Lipid mobilization and acid phosphatase activity in lytic compartments during conidium dormancy and apressorium formation of *Colletotrichum graminicola*. **Cell Struct.Funct**, v. 23, p. 333-340, 1998.

SCHADECK, R. J. G.; RANDI, M. A F.; BUCHI, D. F.; LEITE, B. Vacuolar System of Ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia: Convergence of Autophagic and Endocytic Pathways. **FEMS Microbiology Letters**, v.218, p. 277-283, 2003.

SEGLÉN, P. Inhibitors of lysosomal function. **Methods Enzymol.**, v. 96, p. 737-765, 1983.

SITE 1: Disponível em: <www.infochembio.ethz.ch/links/mycologie.html>, acessado em 07/11/2004.

SITE 2: Corantes: a química nas cores. **Revista Eletrônica do Departamento de Química – UFSC**. Ano 4, Florianópolis. Disponível em: <quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>, acessado em 27/01/2005.

SITE 3: Disponível em: <www.jtbaker.com/msds/englishhtml/m4381.htm>, acessado em: 28/10/2004.

SITE 4: Disponível em: <164.107.52.42/MSDS/A/acetonitrile.pdf>, acessado em 07/11/2004.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 8, p. 2397-2401, 1992.

SVEDSEN, C.; WEEKS, J. M. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). **Mar. Poll. Bullet.**, v. 31, p. 139-142, 1995.

TONG, Y. P.; KNEER, R.; ZHU, Y.G. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 1, p. 7-9, 2004.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol**, v. 41, n. 1, p. 1-17, 1995.

TYCHANOWICZ, G. K.; ZILLY, A.; SOUZA, C. G. M de.; PERALTA, R. M. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 855-859, 2004.

VETTER, J.; BERTA, E. Mercury content of some common edible mushroom species. **Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 205, p. 316-320, 1997.

WATKINS, G. F.; POPE, T.; WILLIAMS, G.; LUFT, T.; BOWEN, G.; KYLE, M.; FISER, W. Relato de caso: Metahemoglobinemia. Disponível em: <<http://perflin.com/revista/volume7/v7n2/v7n2-04.html>>, acessado em 27/01/2005.

WEBER, R. W.; WAKLEY, G. E.; THINES, E.; TALBOT, N. J. The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. **Protoplasma**, v. 216, p. 101-112, 2001.

WILSON, C. L.; JUNPER, G.; MASON, D. L. Vacuole dynamics in fungal pathogens. **Phytopathology**, v. 70, p. 783-788, 1980.

WONG, Y.; YU, J. Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Wat. Res.**, v. 33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.

XIANG, X.; PLAMANN, M. Cytoskeleton and the motor proteins and filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 628-633, 2003.