

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISANDRO CESAR BRUSCATO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS
TEXTEIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.

CURITIBA

2008

ELISANDRO CESAR BRUSCATO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS
TEXTÉIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à disciplina Estágio em
Genética como requisito para obtenção de
título de bacharel em Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Kava-
Cordeiro

CURITIBA

2008

Dedicado ao grande amigo Marco “*Rolo*” Vinicius Rosa (*in memoriam*)
pela falta que sua alegria nos faz.

AGRADECIMENTOS

A professora Vanessa Kava-Cordeiro, pela orientação, confiança, conversas e principalmente a grande amizade.

Ao professor Jaime Paba e sua mestranda Carolina Heyse pela abertura do laboratório e auxílio nas análises dos dados.

Aos meus pais Arlindo e Célia pela confiança de sempre.

Aos meus irmãos de sangue Alexandre Carlos, Cícero Augusto, Giovanna Teresa e seus apêndices Matheus, Vitória, Lorenzo e Beatriz.

Aos meus irmãos e irmãs de coração Marcello Texi, Murilo Texi, Leonardo Clemente, Ricardo Tanhoffer, Luiz Augusto Slivinski, Vagner Andrade, Danielle Real e Andréia Juliana Almeida de Paula, Maria Cristina Soares.

Aos meus amigos de graduação Rodrigo Neher, Felipe Maurutto, Jeferson Nagata, Bruno Mascarenhas, Luis Felipe, Luiz Fernando, Laercio, David, Marcel, Marcelo e Fábio por fazerem do ambiente acadêmico um ótimo lugar.

Ao pessoal do LabGem, principalmente ao Douglas, Lucinir e Carol Silvano.

Ao pessoal da Mutagênese Ambiental, principalmente a Wanessa.

As minhas amigas Fernanda, Lianna Erika, Melise, Natascha, Camila Gimenes, Cami, Ana Cláudia, Clarissa, Thalita pelas conversas e risada.

E a todos aqueles que por acaso eu tenha esquecido.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 2- OBJETIVOS..... | 9 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 10 |
| 3.1 Corantes Sintéticos..... | 10 |
| 3.1.1 Histórico..... | 10 |
| 3.1.2 Características Químicas..... | 10 |
| 3.1.3 Corantes Têxteis..... | 13 |
| 3.2 Biorremediação..... | 16 |
| 3.3 Biodegradação..... | 16 |
| 3.4 Fungos Endofíticos..... | 17 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 4.1 Meios de Cultura e Soluções Utilizadas..... | 22 |
| 4.1.1 Meio Mínimo..... | 22 |
| 4.1.2 Meio Completo..... | 22 |
| 4.1.3 Meio BDA..... | 22 |
| 4.1.4 Solução de Vitaminas..... | 23 |
| 4.2 Isolamento de Fungos Endofíticos..... | 23 |
| 4.3 Incubação..... | 24 |
| 4.4 Seleção dos Isolados Com Potencial de Biodegradação..... | 24 |
| 4.5.1 Em Meio Semi Solido..... | 24 |
| 4.5.2 Em Meio Liquido..... | 24 |
| 4.6 Análise do Peso Seco do Micélio..... | 25 |
| 4.7 Análise Estatística..... | 25 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 5 RESULTADO E DISCUSSÃO | 26 |
| 5.1 Isolamento de Endofítico..... | 26 |
| 5.2 Avaliação do Potencial de Biodegradação..... | 26 |
| 5.3 Identificação dos Isolados Com Potencial de Biodegradação..... | 33 |
| 6 CONCLUSÃO | 35 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| ANEXO | 40 |

RESUMO

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial. Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidas anualmente em todo planeta. Deste montante, cerca de 20% dos corantes são descartados como efluentes durante o beneficiamento têxtil. Vários processos físico-químicos ou biológicos têm sido desenvolvidos para o tratamento destes resíduos. A biodegradação consiste na aplicação de organismos no tratamento de resíduos. Quando este tratamento ocorre em ambiente contaminado, chama-se biorremediação. Dentre os organismos utilizados, os microrganismos apresentam um grande potencial por estarem naturalmente presentes em áreas degradadas e muitos produzem enzimas como as lignases, que degradam moléculas xenobióticas. Microrganismos endofíticos de plantas de áreas poluídas e/ou contaminadas podem exercer um papel determinante para possibilitar o desenvolvimento de seus hospedeiros nestes ambientes. A melhor maneira de investigar este processo é isolando fungos endofíticos destes hospedeiros, cultivando-os em laboratório e avaliando seu potencial de biodegradação. Desse modo, os objetivos desse trabalho foram isolar fungos endofíticos de plantas de áreas degradadas, identificar as espécies isoladas por características morfológicas e moleculares, selecionar espécies com potencial de biodegradação, realizar bioensaios para conferir o potencial de biodegradação das espécies selecionadas. Das 13 linhagens isoladas neste trabalho, cinco apresentaram potencial para degradação do corante Remazol azul brilhante e uma apresentou também potencial para degradação do corante Remazol amarelo ouro. Um isolado de planta medicinal chamada "Espinheira-santa" (*Maytenus ilicifolia*), o fungo *Pestalotiopsis visme*, pertencente à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da UFPR também apresentou potencial para degradação do corante Remazol azul brilhante. Após 15 e 30 dias de cultivo, respectivamente, foram observadas as seguintes porcentagens de absorvância do corante azul: 25,6 e 53,51 (isolado EA3); 36,68 e 36,68 (*P. visme* 48J); 38,11 e 60,36 (isolado LPA6); 40,11 e 63,15 (isolado EA6); 54,49 e 73,52 (isolado LPB6); 69,18 e 55,89 (isolado LPA3) e para corante amarelo o percentual de degradação foi de 77,2 e 70,9 (isolado LPB6). Foi possível observar que nos meios onde foi adicionado o corante, o micélio estava mais desenvolvido, por análise do peso seco.

1 INTRODUÇÃO

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial. Originou-se na revolução industrial, intensificou-se com a explosão populacional humana e perpassa pelo modelo sócio-econômico-cultural. Em muitas regiões brasileiras que abrigam pólos industriais e densa população, o ecossistema aquático vem sofrendo uma degradação efetiva causada pelos esgotos industriais (BALAN, 2002). Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidos anualmente em todo planeta. Deste montante, cerca de 20% dos corantes são descartados em efluentes durante o beneficiamento têxtil (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

A questão do descarte de resíduos no ambiente tem sido ainda um problema sem solução adequada para muitos casos, os quais envolvem resíduos cujas características físico-químicas os tornam de difícil degradação pelas tecnologias convencionais. Vários tratamentos têm sido desenvolvidos para o tratamento de resíduos de diferentes características, os quais englobam tratamentos físico-químicos ou biológicos. Vários organismos podem ser utilizados na degradação como bactérias, fungos ou plantas, e a eficiência de um ou de outro depende em muitos casos da estrutura da molécula e da presença de enzimas hábeis para degradar o produto, os quais apresentam especificidade para a maioria dos substratos (MEYER, 1978).

Efluentes têxteis possuem características variadas e diferentes composições, que dependem do tipo de corante utilizado em cada caso e do processo de coloração (BRAILE; CAVALCANTI, 1993). Estas características, aliadas às características químicas que lhe conferem grande estabilidade, dificultam sua degradação.

Fungos endofíticos são diferentes dos fungos fitopatogênicos, pois, embora encontrados no interior de plantas durante todo seu ciclo de vida ou em parte dele, aparentemente não causam danos ao hospedeiro. Considera-se que entre estes fungos e seus hospedeiros existe uma relação mutualística ou simbiótica neutra. Os fungos endofíticos podem ser identificados por exame microscópico do tecido

vegetal, pois são geralmente intercelulares, ou podem ser isolados em meios de cultura.

O papel dos microrganismos endofíticos, na maioria dos casos, ainda é desconhecido. Alguns autores relataram uma influência positiva dos endofíticos para a planta hospedeira, como aumento de área foliar, resistência a doenças e produção de metabólitos. Microrganismos endofíticos de plantas de áreas poluídas e/ou contaminadas podem exercer um papel determinante para possibilitar o desenvolvimento de seus hospedeiros nestes ambientes. A melhor maneira de investigar este processo é isolando fungos endofíticos destes hospedeiros, cultivando em laboratório e avaliando o potencial de biodegradação.

Biorremediação é uma técnica em que consiste na aplicação de processos biodegradáveis no tratamento de resíduos para recuperar e regenerar ambientes poluídos principalmente solo e água. A utilização de microrganismos selecionados é uma das técnicas mais utilizadas, pois aceleram o processo de degradação da matéria.

2 OBJETIVOS

- ✓ Isolar fungos endofíticos de plantas de áreas expostas à poluição
- ✓ Selecionar espécies com potencial de biodegradação.
- ✓ Identificar as espécies isoladas
- ✓ Verificar na literatura o potencial de biodegradação das espécies isoladas
- ✓ Verificar o potencial de biodegradação de isolados endofíticos pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos - LabGeM

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corantes Sintéticos

3.1.1 Histórico

A origem dos corantes têxteis é incerta, mas há indicações de seu uso em amostras de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2500 a.C. Até a metade do século XIX, só existiam pigmentos naturais provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais, cujas fórmulas de extração e aplicação eram guardadas secretamente. A grande revolução na história desses compostos ocorreu quando o químico inglês William Henry Perkin sintetizou, em 1856 o primeiro corante sintético – a mauveína (Figura 1), derivado do coque (subproduto do petróleo bruto). Foi o primeiro passo para a produção de corantes orgânicos sintéticos em grande escala (ZANONI, CARNEIRO, 2001). Entretanto, muitos corantes naturais, como o índigo, a alizarina e a henna, utilizados na antiguidade ainda são empregados em larga escala.

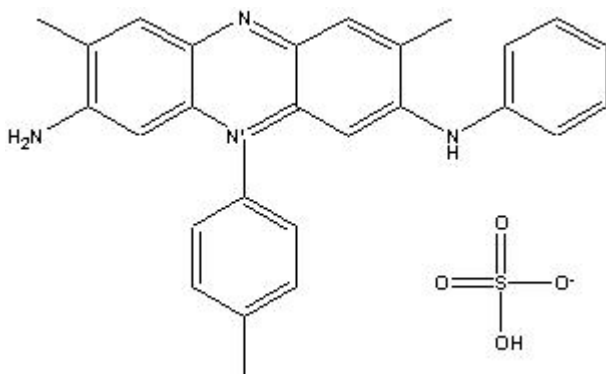


Figura 1: Estrutura química da mauveína.

3.1.2 Características químicas

De acordo com Zanoni e Carneiro (2001), os corantes apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver até 500 reações. Geralmente apresentam um grupo cromóforo (nitro, nitroso, azo e carbonila) responsável pela cor e grupos auxiliares (etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metoxi) que proporcionam sua afinidade pela fibra têxtil natural ou sintética.

Os corantes são classificados por sua estrutura química ou pela aplicação que se destinam. Com base na estrutura química podem ser classificados em nitrofenol, nitrosofenol, azo, trifenilmetano, antraquinona, ftalocianina, vinilsulfônico, pirimidina e triazina, por aplicação ele é classificado de acordo com o tipo de fibra a ser corada.

Tendo em vista que muitos corantes são compostos complexos, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química (alguns são misturas de vários compostos e outros não possuem estrutura química definida). Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, prefere-se utilizar os nomes comerciais. Para identificar os mesmos corantes, comercializados com diferentes denominações, utiliza-se o *Colour Index* (C.I., Tabela 1), catálogo da *American Association of Textile Chemists and Colourists* e da *British Society of Dyers and Colourist*. O C.I. classifica sistematicamente os corantes de acordo com sua estrutura química (definida pelos grupos cromóforos), quando conhecida. Por esta classificação os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos, e registra atualmente mais de oito mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil (WESENBERG *et al.*, 2003).

Tabela 1 – Algumas classes de corantes de acordo com o *Colour Index* (C.I.), adaptado de WESENBERG *et al.*, 2003.

| Código | Classe Química | Código | Classe Química |
|--------|----------------|--------|------------------|
| 10,000 | Nitroso | 42,000 | Triarilmetano |
| 10,300 | Nitro | 45,000 | Xanteno |
| 11,000 | Monoazo | 55,000 | Lactona |
| 20,000 | Diazo | 56,000 | Aminocetona |
| 30,000 | Triazo | 57,000 | Hydroxicetona |
| 35,000 | Poliazo | 58,000 | Antraquinona |
| 37,000 | Azóico | 73,000 | Índigo |
| 53,000 | Súlfur | 74,000 | Natural |
| 40,800 | Carotenóide | 75,000 | Base de oxidação |
| 41,000 | Difenilmetano | 76,000 | Inorgânico |

Os principais grupos de corantes classificados pelo modo de aplicação (utilização por substrato) segundo Guaratini e Zanoni (1999) são:

- ✓ Corantes diretos – solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose através de interações de Van der Waals. Esta classe é constituída principalmente por

corantes contendo mais de um grupo azo ou pré-transformada em complexos metálicos;

- ✓ Corantes azóicos – compostos insolúveis em água, que apresentam ligações azo (ligações -N=N- ligadas a sistemas aromáticos). Durante o processo de tingimento a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, chamado de agente de acoplamento.
- ✓ Corantes ácidos – Se ligam à fibra através de troca iônica envolvendo um par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilatos das fibras protéicas, na forma não protonada. Caracterizam-se por estruturas químicas baseadas em grupos azo, antraquinona, triarilmetano, entre outros.
- ✓ Corantes à cuba – Praticamente insolúveis em água, entretanto durante o processo de tintura são reduzidos, tornando-se solúveis e posteriormente oxidados, regenerando a forma original do corante sobre a fibra;
- ✓ Corantes de enxofre – Compostos macromoleculares com pontes dissulfeto, altamente insolúveis;
- ✓ Corantes dispersos – Insolúveis em água, aplicados em fibras de celulose, através de suspensão. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre corante e a fibra hidrofóbica;
- ✓ Corantes pré-metalizados – caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao grupo azo, permitindo a formação de complexo com íons metálicos.
- ✓ Corantes reativos – apresentam um grupo eletrofílico capaz de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Os principais apresentam grupos azo (N=N) e antraquinona como cromóforos. Dentre os corantes reativos encontra-se o corante Remazol azul brilhante, C.I. Reactive Blue 220, que apresenta em sua estrutura complexo de cobre e formazana.

3.1.3 Corantes têxteis

A molécula de um corante utilizado para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra. (KUNZ 1999).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente nos corantes, mas sem dúvida o mais representativo e largamente utilizado são os da família dos azo-corantes. (KUNZ 1999).

A outra parte da molécula do corante, além do grupo cromóforo, é responsável pela fixação do corante à fibra têxtil. Existem várias classes de corantes classificados segundo a forma de fixação a fibra, como por exemplo, corantes ácidos, diretos, básicos, a tina, enxofre, sendo este último o mais utilizado. (KUNZ 1999).

Normalmente, a fixação do corante à fibra é feita através de reações químicas ou pela adsorção (fixação de moléculas de uma substância na superfície de outra) do corante ou de derivados gerados por reações químicas durante o processo de tintura. Os corantes costumam ser classificados de acordo com a maneira como se fixam à fibra. Eles podem ser reativos, diretos, azóicos, aniônicos (ácidos e básicos), a cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores. (BOLDRIN; CARNEIRO 2001)

Os corantes podem ser classificados em função de dois critérios: pela aplicação ou utilização e pela estrutura química. (GUARATINI, ZANONI 2000).

Utilizando como critério a aplicação, as principais classes de corantes, representando 85% da produção dos Estados Unidos, são listados a seguir.

- ✓ Corantes ácidos para tingir nylon, seda, couro e lã; correspondem a um grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos.
- ✓ Corantes básicos para tingir papel e fibras acrílicas; são corantes catiônicos, alguns demonstram atividades biológicas e são utilizados na medicina como anti-sépticos.
- ✓ Corantes diretos para tingir algodão, papel e celulose; a grande vantagem dessa classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e conseqüente diminuição do conteúdo do corante nas águas de rejeito.

- ✓ Corantes dispersos para tingir fibras de acetato, poliéster e nylon; constituem uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em suspensão sobre as fibras de celulose e fibras hidrofóbicas.
- ✓ Corantes à tina para fibras celulósicas; são corantes praticamente insolúveis em água.
- ✓ Corantes sulfurosos para tingir fibras celulósicas; são corantes altamente insolúveis em água. Numericamente, representam uma pequena classe de corantes que, apesar de apresentarem resíduos altamente tóxicos, representam uma classe importante na economia por apresentarem baixo preço e boas propriedades de fixação. (GUARATINI, ZANONI 2000); (SOTTORIVA 2002).
- ✓ Corantes reativos para tingir algodão, lã e celulose; contém um grupo eletrofílico (reativo), capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas e com grupos amino das poliamidas.

Dentro da classe de corantes reativos há os do tipo Remazol. Neste trabalho foram utilizado o Remazol Vermelho, Remazol Amarelo Ouro e Remazol Azul Brilhante. O mais utilizado devido a sua importância industrial é o Remazol Azul Brilhante, um derivado do antraceno que representa uma classe importante de poluentes orgânicos, freqüentemente tóxicos e recalcitrantes. Sua estrutura química é mantida em segredo industrial.

3.2 Biorremediação

À medida que o crescimento populacional avança, a administração do acúmulo de dejetos gerados pela atividade humana se torna cada vez mais uma prioridade para os grandes centros urbanos. O ambiente tem a qualidade intrínseca de absorver e/ou transformar boa parte dos poluentes nele dispensados. Os principais processos de atenuação natural de poluentes são: dispersão, absorção, volatilização, oxidação abiótica, hidrólise, e a biodegradação, mas os únicos meios efetivos de atenuação, aqueles que destroem os contaminantes ou os transformam em produtos inócuos são: a oxidação abiótica, a hidrólise e a biodegradação (GIANFREDA; RAO, 2004).

A remediação de xenobióticos engloba os diversos mecanismos que levam à mineralização, transformação parcial, formação de húmus ou à alteração do estado de oxido-redução de diferentes substratos poluentes gerando produtos inofensivos

para o ambiente. Esta pode acontecer exclusivamente por processos físico-químicos ou pela ação de organismos sobre o substrato em questão (biodegradação). A biodegradação pode ser realizada por bactérias, fungos, plantas (fitoremediação) ou consórcios de diferentes organismos através de processos de múltiplos passos onde o substrato ou os metabólitos resultantes podem ser utilizados como fonte principal de carbono e energia. Em outros casos, como no co-metabolismo, a transformação do poluente simplesmente acontece como uma atividade paralela do metabolismo celular, quer dizer, o substrato não é uma fonte importante de energia nem participa da síntese de elementos constitutivos no organismo remediador. A biodegradação pode ser realizada *in situ*, em pequenos ambientes controlados como bioreatores ou em escala maior no campo, quando é chamada de biorremediação.

3.3 Biodegradação

A grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser a busca contínua de microrganismos capazes de degradar de maneira eficiente e em tempo razoável, um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, sabemos que isto é muito complicado principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente. Fungos em combinação com métodos biológicos e químicos também têm sido testados e se mostrado bastante eficientes na descoloração de efluentes e corantes têxteis. A utilização de bactérias, como *Pseudomonas* sp e *Sphingomonas* sp têm sido descritas em artigos sobre a degradação de corantes. Estes microrganismos são particularmente úteis para degradação de azo corantes, pois tem a capacidade de realizar a redução das duplas ligações azo deste tipo de composto, fato este que geralmente está associado à enzima azoredutase. Outra alternativa recente para o tratamento de efluentes e compostos resistentes à degradação refere-se ao uso de agentes quelantes naturais, produzidos por alguns fungos e bactérias. Estes compostos apresentam uma alta afinidade por metais, principalmente ferro, formando complexos de alta estabilidade. A função biológica é a de seqüestrar ferro em ambientes com deficiência deste. Entre os organismos utilizados, os fungos lignolíticos têm despertado grande interesse devido à diversidade de enzimas (lignina peroxidases, lacases, fenol oxidases, entre outras) por eles secretados, com ação sobre 15 múltiplos substratos de origem industrial. P

esquisadores têm aumentado o interesse no fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*. Este fungo tem a capacidade de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes a degradação. O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas lignina e manganês peroxidase, as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos. Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando sua capacidade de degradar e mineralizar corantes. SPADARO e *col.* demonstraram que *P. chrysosporium* foi capaz de mineralizar alguns azocorantes.

3.4 Fungos Endofíticos

Microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados de endofíticos pela primeira vez por De Bary em 1866 (STONE, 1988). Carroll (1988) restringiu o uso do termo endofítico para organismos que causam colonizações assintomáticas, excluindo deste conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos tais como os fungos micorrízicos. Petrini (1991) propôs que a definição de Carroll fosse expandida para incluir todos os organismos que fossem capazes de colonizar os tecidos internos dos vegetais, sem causar um dano aparente.

A presença dos endofíticos pode ser demonstrada tanto por exame microscópico do tecido vegetal como também por isolamento em meios de cultivo. Para o isolamento é necessário que o tecido tenha sua superfície esterilizada e então fragmentos deste tecido são colocados em meio de cultura e incubados (MOORE-LANDECKER, 1996). Reissinger, Vilich e Sikora (2001) testaram algumas técnicas de esterilização de superfície com plantas axênicas, livres de microrganismos, que tinham sido propositalmente infectadas com duas espécies de *Chaetomium*. Os autores concluíram que algumas técnicas de esterilização de superfície podem prejudicar a detecção de fungos endofíticos que estão dentro da epiderme da planta.

Petrini (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes fungos.

Embora as interações entre vegetais e endofíticos na maioria dos casos ainda seja uma incógnita, em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas (CLAY, 1987). Latch e Christensen (1985) relataram um maior número de ramificações do caule e um aumento da área foliar em gramíneas, infectadas artificialmente com endofíticos. Também já foram observados casos de plantas com maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL; CARROLL, 1978; CLAY, 1987; CLEMENTE et al., 1990; CARROLL 1988), resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr.; COLE, 1985; WHITE Jr.; COLE, 1986; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN et al., 1992), resistência a nemátodos (WILSON; CLEMENTE; KAISER, 1991) e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE JR.; COLE, 1985).

Rudgers, Koslow e Clay (2004) comprovaram que mesmo fungos endofíticos que aparentemente mantinham uma relação simbiótica neutra com seus hospedeiros, na verdade contribuíam significativamente com a dinâmica populacional do seu ecossistema.

Alguns trabalhos de melhoramento genético em fungos endofíticos já foram descritos ou pelo menos tiveram seu potencial considerado. Murray, Latch e Scott (1992) transformaram o fungo endofítico *Acremonium*, isolado de *Lolium perenne*, e após reintrodução do fungo na planta, verificaram a expressão do gene de interesse. Alguns autores também relataram o potencial que fungos endofíticos apresentam para incompatibilizar o desenvolvimento de patógenos (WHITE JR.; COLE, 1985; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CALHOUN et al., 1992, ARNOLD et al., 2003).

A possibilidade de exploração de fungos endofíticos como produtores de metabólitos para diversos fins foi aventada por alguns pesquisadores e comprovada em certos casos. Fisher, Anson e Petrini (1984) detectaram atividade antibiótica em 10 dos 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de cinco espécies de Ericaceae. Os fungos produziram os metabólitos quando cultivados em culturas líquidas em agitação. Entre os 10 isolados, cinco apresentaram atividades antifúngicas e antibacterianas ao mesmo tempo. Fisher, Anson e Petrini (1986) ensaiaram 25 isolados dos hospedeiros *Ulex europeus* e *U. gallii* e encontraram atividade antibiótica em quatro destes isolados. Os isolados de *Coniothyrium* spp apresentaram atividade antibiótica contra uma ampla faixa de bactérias.

O potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos, especialmente fungos, vem sendo investigado e constatado em vários casos, tornando promissores os estudos envolvendo estes organismos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Os modelos de interação fungo endofítico e planta certamente ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da planta devem ser comuns com linhagens fitopatogênicas. O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas de apressórios (KUBO *et al.*, 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW; KUO; HOCH, 1998). Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a ação mecânica do apressório (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* apresentam ampla distribuição geográfica no mundo, causando as doenças denominadas antracoses, que representam sérios problemas em regiões tropicais e subtropicais. Fungos deste gênero também vêm sendo isolados como organismos endofíticos, em plantas assintomáticas (LIMA, 2008). Este gênero tem como características principais: conidióforos hialinos a castanho, produzindo conidiósporos unicelulares, mas que podem tornar-se septados por ocasião da germinação. Os conidiósporos podem ser retos ou alantóides. Setas pontiagudas coloração castanha, são freqüentemente observadas em várias espécies, assim como presença de esclerócios escuros. As espécies do gênero *Colletotrichum* produzem apressórios ao longo das hifas ou na extremidade do tubo germinativo dos conidiósporos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) do Departamento de Genética e no Laboratório de Biodegradação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Os materiais biológicos utilizados foram fungos filamentosos endofíticos de *Maytenus ilicifolia*, uma planta medicinal conhecida como espinheira-santa,, *Pestalotiopsis microspora* (6JA), *Pestalotiopsis* sp (SD07) e *Pestalotiopsis visme* (48 J), pertencentes à coleção do LabGeM e isolados obtidos no presente trabalho.

Foram selecionadas duas fontes de isolamento: uma leguminosa do *Campus* Politécnico da Universidade Federal do Paraná localizado nas coordenadas 20°26'44.28' S e 49°13'55,42"O, (Figura 2A). Os isolados foram denominadas LPA (Leguminosa Politécnico Ápice) e LPB (Leguminosa Politécnico Base). Também foram isolados fungos de uma árvore cuja raiz está dentro de um rio onde é despejado esgoto doméstico, localizada na Av. Presidente Arthur Bernardes próximo ao chafariz dos anjos com as coordenadas 20°27'17.11"S e 49°18'14.10"O (Figura 2B). Os isolados foram denominadas EA (Esgoto Ápice) e EB (Esgoto Base).

Figura 2: Árvores utilizadas para o isolamento dos fungos endofíticos.



NOTA:1- Leguminosa do Politécnico; 2 árvore com raiz no rio poluído.

Os corantes utilizados na avaliação do potencial de biodegradação dos isolados mencionados acima e dos obtidos neste trabalho foram todos do tipo Remazol, sendo eles: o Azul Brilhante, Amarelo Ouro e Vermelho.

4.1 Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

4.1.1 Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953, modificado pelo autor)

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| NaNO ₃ | 6,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0,5 g |
| FeSO ₄ | 0,02 g |
| ZnSO ₄ | 0,02 g |
| Água destilada | p/ 1.000 mL |

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1 N.

Para MM semi-sólido foi acrescentado 1,5% de ágar.

4.1.2 Meio Completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953 modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

| | |
|---------------------------|--------|
| Meio Mínimo adicionado de | |
| Glicose | 10,0 g |
| Extrato de levedura | 2,0 g |
| Peptona | 2,0 g |
| Caseína hidrolizada | 1,5 g |
| Solução de vitaminas | 1,0 ml |

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1 N.

Para MC semi-sólido foi acrescentado 1,5% de ágar.

4.1.3 Meio BDA

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Batata descascada e cortada | 200g |
| Dextrose | 20g |
| Água destilada | p/ 1.000 mL |

Ferver a batata em água destilada por quinze minutos. Depois de peneirado, adicionar ao caldo resultante a dextrose e completar o volume para 1000mL. Ajustar o pH para 5,8 com NaOH 0,1 N. Para meio BDA sólido, acrescentar 1,5% de ágar.

4.1.4 Solução de Vitaminas

| | |
|-----------------------------------------|-----------|
| Ácido Nicotínico | 100,0 mg |
| Ácido <i>p</i> Aminobenzóico | 0,2 mg |
| Biotina | 0,2 mg |
| Piridoxina | 50,0 mg |
| Riboflavina | 100,0 mg |
| Tiamina | 50,0 mg |
| H ₂ O destilada esterilizada | p/ 100 ml |

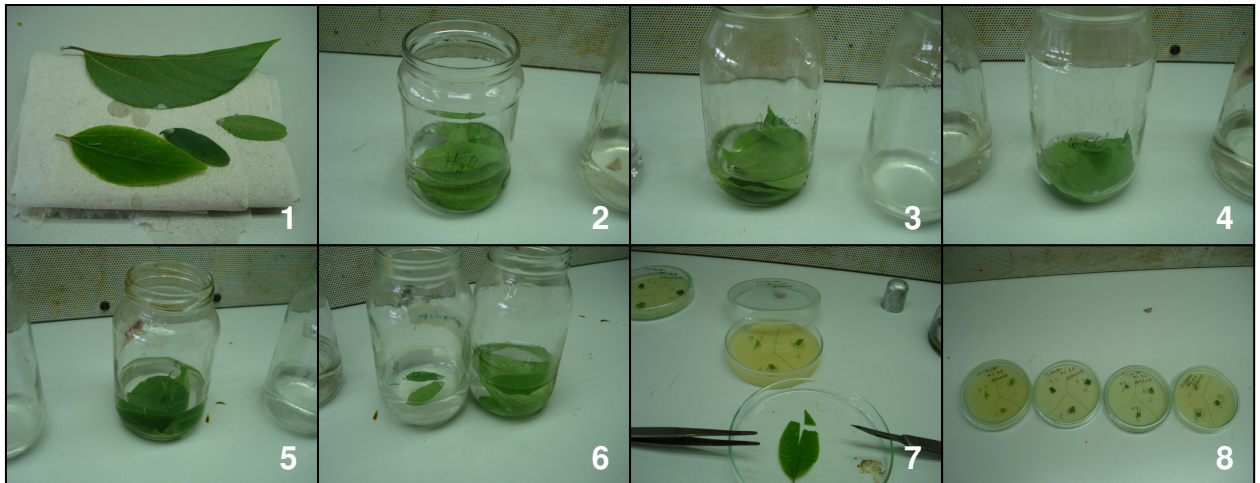
A solução foi aquecida em banho Maria a 98°C por 15 minutos e guardada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

4.2 Isolamento de fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram isolados de acordo com a metodologia descrita por PETRINE (1986) e PEREIRA (1993). As folhas foram desinfetadas superficialmente por meio de imersão em etanol 70% por 1', seguida de tratamento com NaOCl 3% por 4' e posterior lavagem com etanol 70% por 30". Na seqüência as folhas foram lavadas em água destilada esterilizada por 6 minutos (GLIENKE,1995) (Figura 3).

Após este procedimento, um mapa da folha foi traçado fazendo um corte longitudinal seguindo a nervura central e de 4-5 cortes transversais totalizando 8-10 pedaços. As frações da folha foram transferidas para placas com os meios de cultura (BDA), foram incubadas a 28° a cada 24 horas foi feita uma inspeção visual para acompanhar o crescimento dos fungos endofíticos (Figura 3).

Figura 3: Isolamento de Fungos Endofíticos.



NOTA: 1-isolamento do pecíolo com parafina; 2- água destilada esterilizada 3- imersão em etanol 70%; 4- tratamento com NaOCl 3%; 5- lavagem com etanol 70%; 6- água destilada esterilizada; 7- um mapa da folha; 8- folhas em meio de cultura.

4.3 Incubação

Placas foram incubadas a 28°C para o crescimento do fungo em incubadora tipo BOD com luz ininterrupta por 8 dias. Ocasionalmente, foi utilizada outra temperatura para crescimento do fungo.

4.4 Seleção dos isolados com potencial de biodegradação

4.4.1 Em Meio Semi-Sólido

- Preparar meio mínimo semi-sólido com corante (0.2 g/L) azul, amarelo e vermelho.
- Cultivar o fungo em meio mínimo semi-sólido com corante e incubar a 28°C (30 dias antes).
- Observar potencial de degradação do corante por alteração da coloração do meio de cultura em comparação com o controle sem o inóculo.

4.4.2 Em Meio Líquido

- Preparar meio mínimo líquido com corante (0.2 g/L) azul e amarelo.
- Cultivar o fungo em meio líquido com corante e incubar a 28°C (15 e 30 dias).

- Medir a absorvância após 15 e 30 dias de incubação. A absorvância relativa foi medida em espectrofotômetro com leitura para azul de $\lambda_{\text{máx}}$ 600 nm e para amarelo $\lambda_{\text{máx}}$ 440nm.
- Para cada isolado foi feita uma repetição.

4.5 Análise do peso seco do micélio

Após 15 e 30 dias de incubação em meio mínimo líquido com o corante, o micélio foi retirado para a avaliação do crescimento do fungo pelo seu peso seco. Após 12 horas a 50^o C em estufa de secagem de material, a massa do micélio foi aferida. Como controle, foi utilizado meio mínimo sem o corante com a mesma quantidade de inóculo (3 *plugs* de *punch* com 0,5 cm de diâmetro).

4.7 Análise Estatística

Para o experimento, foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) e a partir dos dados obtidos foram feitos a análise de variância (ANOVA) e eventualmente o Teste de Tukey para médias. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa ASSISTAT (SILVA, 2008).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de endofíticos

Da árvore do Centro Politécnico (UFPR) foram obtidos seis isolados: LPA 1; LPA 3; LPA 6; LPB1, LPB 3; LPB 6. E da árvore da Av. Arthur Bernardes foram obtidos seis isolados: EA1, EA3, EA6, EB1, EB3 e EB6.

5.2 Avaliação do Potencial de Biodegradação

Foi realizada, uma seleção prévia dos microrganismos para verificar o potencial de degradação no período de 30 dias, com incubação em meio semi-sólido em placa de Petri a 30°C. Após inspeção visual, os resultados foram organizados em uma tabela (Tabela 2). Os isolados promissores foram selecionadas para o experimento em meio mínimo líquido (Figura 4).

Em nenhum dos ensaios houve evidências de bioadsorção, ou seja, o micélio não adquiriu a cor do corante. Para o corante azul foram selecionadas as seguintes isolados LPA3; LPB6; LPA6; EA3; EA6 e a linhagem da coleção do LabGem 48J (*P. visme*) e para o corante amarelo foi selecionado apenas a linhagem LPB6. Nenhum isolado apresentou potencial de biodegradação para o corante vermelho.

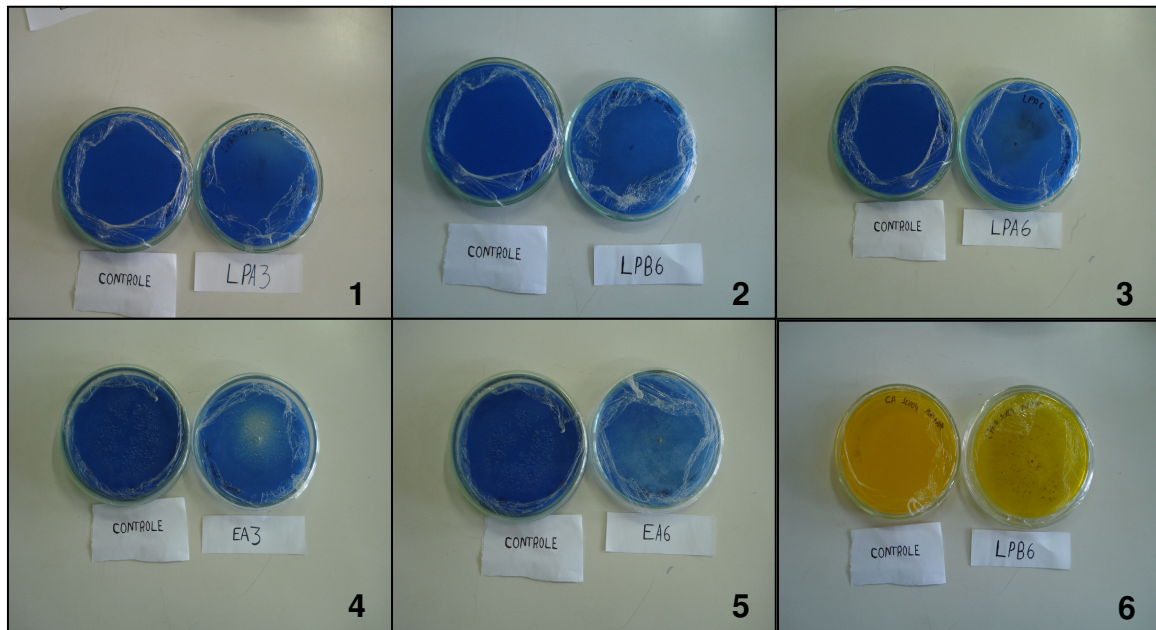
No experimento com meio mínimo líquido foram adicionados 0,02 g/L de corante e os fungos foram inoculados com dois discos de micélios que foram cortados com *punch* com 0,5 cm de diâmetro (Figura 5).

Tabela 2 – Avaliação do potencial de degradação de corantes têxteis por isolados de fungos endofíticos, em meio mínimo semi-sólido com corante (0,2g/L) após 30 dias de incubação.

| ISOLADOS | Remazol Azul Brilhante | Remazol Vermelho | Remazol Amarelo Ouro |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| EB1 | - | - | - |
| EA3 | positivo | - | - |
| LPA1 | - | - | - |
| LPB3 | - | - | - |
| EB6 | - | - | - |
| 48J | positivo | NA | NA |
| EA1 | - | - | - |
| LPB6 | positivo | - | positivo |
| EB3 | - | - | - |
| EA6 | positivo | - | - |
| SD07 | NA | NA | NA |
| LPA6 | positivo | - | - |
| LPA3 | positivo | - | - |
| LPB1 | - | - | - |
| 6JA | NA | NA | NA |

Nota: -: resultado negativo; NA: Não avaliado.

Figura 4: Isolados selecionados através de meio mínimo semi-sólido com corante



NOTA:1- Linhagem LPA3; 2- Linhagem LPB6; 3- Linhagem LPA6; 4- Linhagem EA3; 5- Linhagem EA6; 6- Linhagem LPB6.

Figura 5: Inoculação de micélio em meio mínimo líquido.



Após decorrer 15 e 30 dias incubados em meio mínimo líquido (Figura 6) foram retirados o sobrenadante de experimento (micélio) para avaliar o crescimento do fungo medindo o peso seco, o meio mínimo líquido contendo corantes foi analisado a absorvância relativa em espectrofotômetro (Figura 7) com leitura para azul de $\lambda_{\text{máx}}$ 600 nm e para amarelo $\lambda_{\text{máx}}$ 440nm .

Figura 6: Aspecto do Meio Mínimo com corante azul (0,2g/L) no frasco controle e tratamento após 15 dias de cultivo a 28°C do isolado LPA6

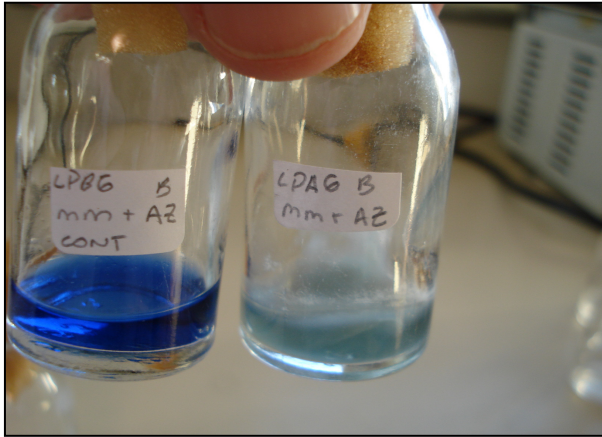
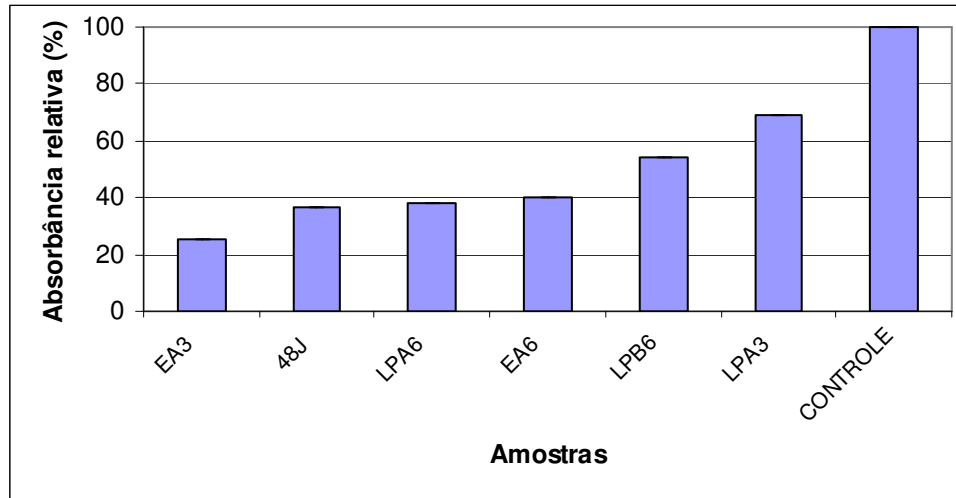


Figura 7: Leituta da absorbância do Meio Mínimo com corante azul.



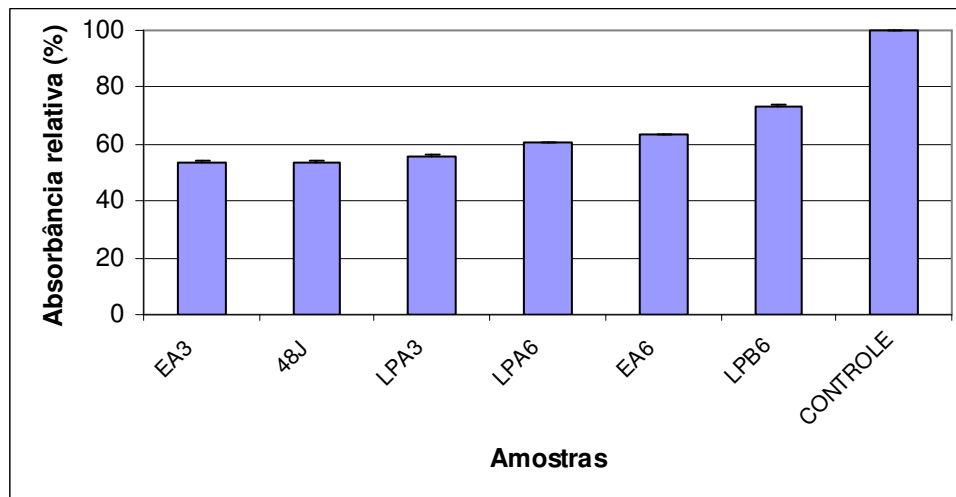
Os resultados de absorbância relativa após 15 e 30 dias estão apresentados nos gráficos 1 e 2 para o corante azul e 3 e 4 para o corante amarelo, respectivamente.

Gráfico 1: Absorbância relativa para corante azul após 15 dias de incubação.



Com 15 dias de incubação a linhagem isolada EA3 mostrou uma melhor degradação do corante azul com apenas 25,6% de corante restante no meio e a linhagem LPA3 foi a que menos degradou com 69,18% de corante restante. A amostra controle foi deixada o tempo todo na estufa junto com as amostras com isolados. O desvio padrão observado foi muito reduzido por causa do pequeno número de repetições das amostras.

Gráfico 2: Absorbância relativa para corante azul após 30 dias de incubação.



Com 30 dias de incubação a linhagem isolada EA3 continuou apresentando a melhor porcentagem de degradação com 53,51% de corantes restantes e a linhagem LPB6 foi a que menos degradou com 73,52% de corante restante, a linhagem LPA3 mostrou uma melhora na degradação com 55,89% de corante restante.

O aumento da absorvância relativa após 30 dias pode ter sido decorrente de uma atividade de polimerização do corante realizado pelas enzimas lignolítica envolvidas no processo.

Gráfico 3: Absorbância relativa para corante amarelo após 15 dias de incubação

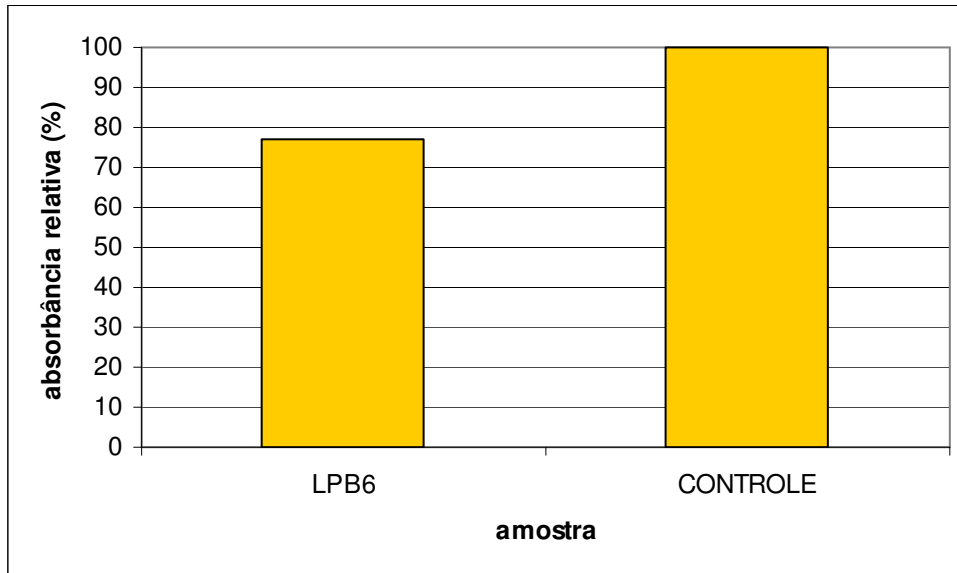
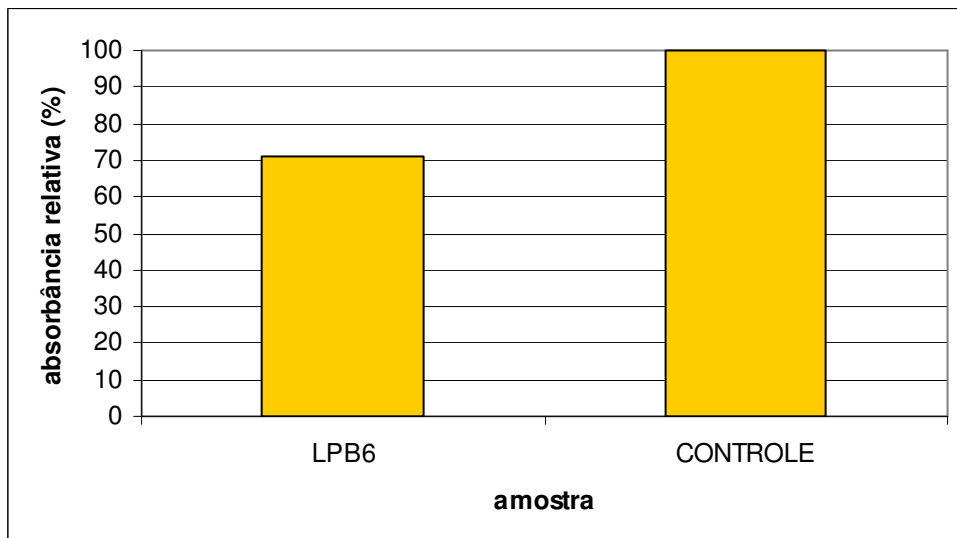


Gráfico 4: absorvância relativa para corante amarelo após 30 dias de incubação



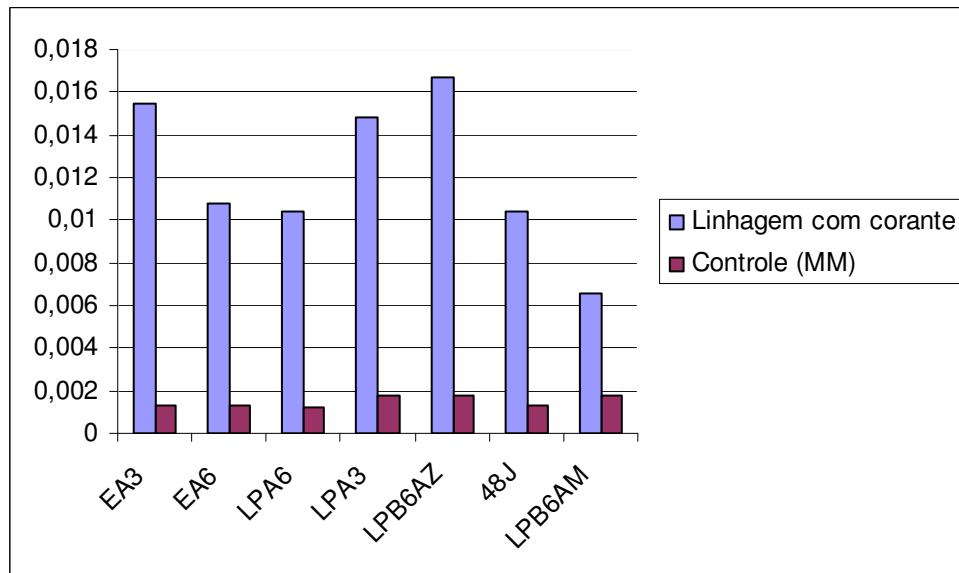
Com 15 e 30 dias de incubação, a linhagem LPB6 nos mostra que a quantidade de corante restante no meio de cultura é de 72,20% para 15 dias e 70,90% para 30 dias.

Apesar de ter tido uma descoloração significativa, isso não acarreta numa redução de toxicidade do poluente analisado, pois os metabólitos gerados podem

ser mais tóxicos que o composto inicial analisados. Análises posteriores devem ser realizadas para avaliar a toxicidade dos metabólitos gerados pela degradação do corante.

Com o objetivo de averiguar se o corante foi utilizado como fonte de nutrientes pelos isolados fúngicos avaliados no presente trabalho, foram realizadas comparações do peso seco do micélio após 15 dias (Gráfico 5) e 30 dias (Gráfico 6) de incubação com o corante azul e com o corante amarelo, em relação ao controle. , comparando os pesos dos isolados em meio mínimo líquido e meio mínimo líquido com corante.

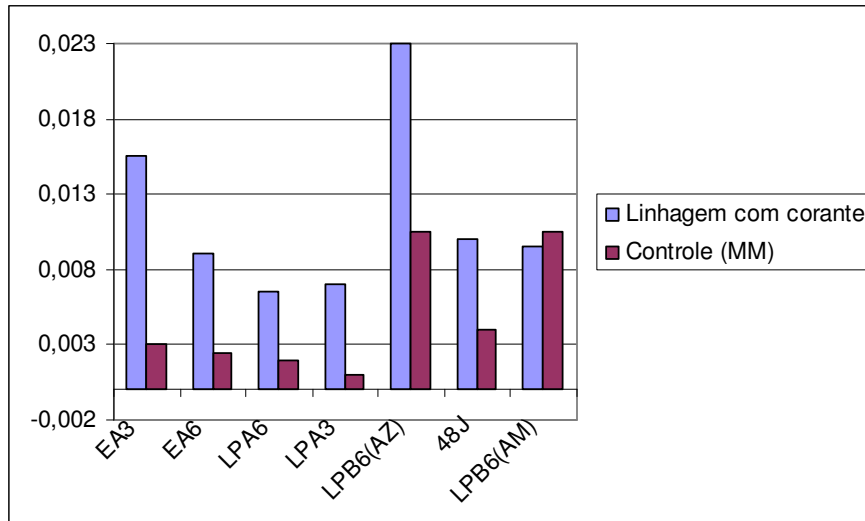
Gráfico 5: Peso seco em gramas do micélio dos isolados após 15 dias de incubação em Meio Mínimo (MM) e MM com corante.



NOTA: à linhagem LPB6 foram adicionadas AZ para indicar peso em linhagem que cresceu em corante azul, e AM para linhagem que cresceu em corante amarelo.

A partir do Gráfico 5 foi possível constatar um maior crescimento dos fungos em meio mínimo com corante. A linhagem LPB6AZ foi a que apresentou um maior crescimento em meio com corante.

Gráfico 6: Peso em gramas do micélio dos isolados após 30 dias de incubação em Meio Mínimo (MM) e MM com corante.



A partir do Gráfico 6 foi possível constatar que linhagem LPB6AZ apresentou o maior crescimento em meio mínimo líquido com corante e a linhagem LPB6AM apresentou um menor crescimento e também apresenta um crescimento menor que o controle em 30 dias.

A comparação dos pesos mostra que 4 isolados tiveram peso diminuído após incubação de 30 dias em comparação a 15 dias. A linhagem LPB6 com corante azul apresentou o maior crescimento em 15 e 30 dias de incubação.

O peso seco dos micélios mostrou-se significativo para os isolados que cresceram em corante azul em 15 e 30 dias, para os que cresceram em meio com corante amarelo o peso não mostrou-se significativo, para as análises estatísticas foi utilizado o Teste Tukey (ver anexo).

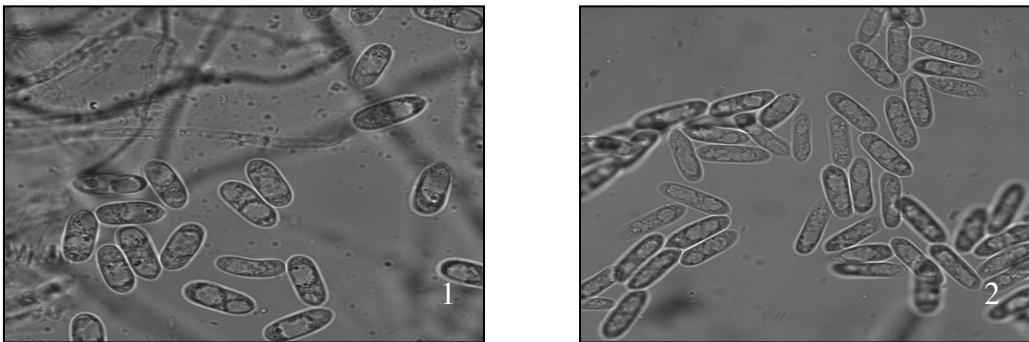
5.3 Identificação dos isolados com potencial de biodegradação

A identificação de fungos filamentosos é baseada na morfologia da colônia em meio de cultura e também pela observação de estruturas morfológicas visíveis ao microscópio óptico, principalmente os conidióforos e os conídios. A conidiogênese em alguns casos só ocorre em condições especiais de cultivo. Para alguns fungos, ela não ocorre em condições de laboratório. Fungos que não podem ser identificados pela falta destas estruturas acabam sendo denominados *Mycelia sterilia*. Atualmente técnicas como o seqüenciamento de regiões ITS e PCRs

espécie-específica têm auxiliado na taxonomia destes organismos (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Dos isolados com potencial para a degradação dos corantes ensaiados, apenas o isolado 48J havia sido previamente identificado ao nível de espécie como *Pestalotiopsis vismae* (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Os isolados LPA3; LPB6; LPA6; EA3 e EA6 estão sendo identificados pela morfologia das colônias em Meio Completo (MC) e BDA. A presença de conídios e conidióforos também vêm sendo investigada por meio de microscopia óptica. Pela morfologia da colônia e dos conídios, os isolados LPA6 e EA6 são possivelmente pertencentes ao gênero *Colletotrichum* (Figura 8). Se ocorrer a confirmação do gênero, serão feitas PCR espécie-específica para a identificação das espécies de *Colletotrichum*.

Figura 8: Conídios dos isolados LPA6 e EA6 por microscopia óptica



NOTA:1- LPA6, 2- EA6. Aumento de 600x.

Os isolados LPA3; LPB6 e EA3 ainda estão sendo investigados em relação à presença de conídios, para a identificação taxonômica.

Os isolados com o melhor potencial na degradação dos corantes serão utilizados em futuros estudos de análise proteômica, nos quais serão avaliadas as proteínas expressas diferencialmente em meio com e sem o corante por meio de eletroforese 2-D.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Fungos endofíticos de plantas de áreas expostas à poluição possuem potencial de biodegradação de corantes têxteis do tipo Remazol, principalmente do Azul Brilhante.

- ✓ Isolados endofíticos de plantas medicinais, como o *Pestalotiopsis vismae* isolado de *Maytenus ilicifolia*, também possuem potencial como biodegradadores de corantes têxteis.

- ✓ Pela análise do peso seco do micélio, os isolados investigados neste trabalho devem estar usando o corante como fonte de nutrientes para o seu crescimento vegetativo.

REFERÊNCIAS

- ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.
- ASSISTÊNCIA ESTATÍSTICA. Disponível em ;< <http://www.assistat.com/>> Acesso em: 07/07/2008
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo : EDUSP, 1973. 288 p.
- BALAN, D.S.L.; Biodegradação e toxicidade de efluentes tóxicos.**Revista ABTT**, p.16- 19., 2002.
- BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.
- BOLDRIN, M. V.; CARNEIRO, P. A. **O descarte dos corantes têxteis**. Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, **Revista Ciência Hoje**, ago., 2001.
- BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E.W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB,1993. 764 p.
- CALHOUN, L.A.; FINDLAY, J.A.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 4, p. 281-286, 1992.
- CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.
- CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.
- CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, Cambridge, v. 93, p. 508-512, 1989.
- CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia (Berlin)**, Berlin, v.73, p. 358-362, 1987.

CLEMENTE, S.L.; PIKE, K.S.; KAISER, W.J.; WILSON, A.D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v.63, n.4, p.646-648, 1990.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

FIGUEIREDO, J.G.; PIMENTEL, I.C.; VICENTE, V.A.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; PEREIRA, J.O.; SOUZA, A.L.; GLIENKE, C. High diversity and bioprospecting endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.1123 - 1132, 2007.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 86, p. 153-156, 1986.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptosporiopsis* sp isolated from *Vaccinium myrtillus*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 83, p. 145-148, 1984

GUARATINI, C. C. I. ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v.1, n.23, p.71-78, 2000.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme Microbiol. Technol.** v. 35, p. 339-354, 2004

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação (Mestrado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

GUTHRIE, R. K. DAVIS, E. M. Biodegradation in Effluents. **Advances in Biotechnological Processes 5**. 1985, p.149-192

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in appressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

KAVA-CORDEIRO, V. ***Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*: Caracterização Morfológica, SCARs e RNA Dupla Fita**. Curitiba, 2004, 135p. Tese (Doutorado). Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Universidade Federal do Paraná.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

KUNZ, A. **Remediação de efluente têxtil: combinação entre processo**

químico (Ozônio) e Biológico (*P. chrysosporium*). 130 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

LATCH, C.G.M.; CHRISTENSEN, M.J. Artificial infection of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.107, p. 17-24, 1985.

MEYER, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A. W. A. **Ecology of Pesticides**. New York: John Willey, 1978. 525 p.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**, 4th ed., Ed. Prentice-Hall, New Jersey, p. 501-513, 1996, 574p.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium endophyte*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.233, p.1-9, 1992.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge, U.K. Cambridge University Press, 1986, p. 175-187.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**, Springer Verlag, 1991, p. 179-197.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MaC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.

RAMSDORF, W.; CASTRO, M. C.; CAPUDI, M. Biodegradação Fúngica de Compostos Lignocelulosicos e Corantes. 80 f. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia em Química Ambiental) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

REISSINGER, A.; VILICH, V.; SIKORA, R.A. Detection of fungi in planta: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 563-566, 2001.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, J.M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v. 7, n. 1, p. 42-51, 2004.

SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and apleridium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p. 258-268, 1998.

SOTTORIVA, P. R. S. **Degradação de corantes reativos utilizando-se processos oxidativos avançados**. Dissertação (Mestre em Química). Setor de Tecnologia, UFPR, 2002, p. 7-12.

SPADARO, J. I.; RENGANATHAN, V. Peroxidase- catalyzed oxidation of azo dye: mechanism of disperse yellow 3 degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v.312, p.301- 307, 1994.

SPADARO, J. I.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dye by lignin- degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.58, n8, p. 2.397- 2.401, 1992.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p. 45-54, 1988.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHONS, S. N. White rot fungi and the enzymes for treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v.22, p. 161- 187, 2003.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lawrence, v.77, p. 323-327, 1985.

WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycologia**, Lawrence, v.78, n.5, p. 846-850, 1986.

WILSON, A.D.; CLEMENTE, S.L.; KAISER, W.J. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germ plasma by direct staining and aphyi assays. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.169-173, 1991.

WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 7, p. 161-166, 1982.

ZANONI, M.V.B; CARNEIRO, P.A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v.29, p 61- 65, 2001.

ANEXO

Análise estatística para avaliar se o peso seco de micélio após 15 dias de incubação apresenta diferença significativa entre o isolado crescido em MM com corante e sem o corante.

DELINEAMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO ANÁLISE DE VARIÂNCIA

| F.V. | G.L. | S.Q. | Q.M | F |
|-------------|------|---------|---------|------------|
| Tratamentos | 13 | 0,00101 | 0,00008 | 30,5825 ** |
| Resíduos | 14 | 0,00004 | 0,00000 | |
| Total | 27 | 0,00105 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$) ns não significativo ($P \geq 0,05$).

GL: 13, 14 F- krit (1%) = 3,75 F = 30,5825 $p < 0,00100$

Há diferença significativa entre os tratamentos.

TESTE DE TUKEY PARA AS MÉDIAS

| | | |
|---------|---------|----|
| EA3 | 0,01755 | a |
| LPB6 AZ | 0,01670 | ab |
| LPA3 | 0,01485 | ab |
| EA6 | 0,01075 | bc |
| LPA6 | 0,01045 | bc |
| 48J | 0,01040 | bc |
| LPB6AM | 0,00660 | cd |
| LPA6C | 0,00210 | d |
| LPA3C | 0,00180 | d |
| LPB6C | 0,00180 | d |
| LPB6C | 0,00180 | d |
| 48JC | 0,00135 | d |
| EA6C | 0,00130 | d |
| EA3C | 0,00130 | d |

DMS = 0,00637

MG = 0,00705

CV% = 22,63444

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Tukey de 5% de probabilidade.

DADOS: Peso seco de micélio após 15 dias de incubação, em gramas

| Isolado | peso seco (A) | peso seco (B) |
|---------|---------------|---------------|
| EA3 | 0,0155 | 0,0196 |
| EA3C | 0,0015 | 0,0011 |
| EA6 | 0,0126 | 0,0089 |
| EA6C | 0,0012 | 0,0014 |
| LPA6 | 0,0107 | 0,0102 |
| LPA6C | 0,0020 | 0,0022 |
| LPA3 | 0,0147 | 0,0150 |
| LPA3C | 0,0023 | 0,0013 |
| LPB6AZ | 0,0167 | 0,0167 |
| LPB6CAZ | 0,016 | 0,0020 |
| LPB6AM | 0,0095 | 0,0037 |
| LPB6CAM | 0,0016 | 0,0020 |
| 48J | 0,0093 | 0,115 |
| 48JC | 0,0010 | 0,0017 |

Siglas e Abreviações:

F.V. = Fonte de variação

G.L.= Graus de liberdade

S.Q.= Soma de quadrado

Q.M.= Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV%= Coeficiente de variação em %

DNS= Diferença mínima significativa.

Análise estatística para avaliar se o peso seco de micélio após 30 dias de incubação apresenta diferença significativa entre o isolado crescido em MM com corante e sem o corante.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

| F.V. | G.L. | S.Q. | Q.M | F |
|-------------|------|---------|---------|-----------|
| Tratamentos | 13 | 0,00092 | 0,00007 | 8,7720 ** |
| Resíduos | 14 | 0,00011 | 0,00001 | |
| Total | 27 | 0,00103 | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$).

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$) ns não significativo ($P \geq 0,05$).

GL: 13, 14 F- krit (1%) = 3,7452 F= 8,7720 $p < 0,00100$

Há diferença significativa entre os tratamentos.

TESTE DE TUKEY PARA AS MÉDIAS

| | | |
|---------|---------|----|
| LPB6 AZ | 0,02300 | a |
| EA3 | 0,01550 | ab |
| LPB6C | 0,01050 | bc |
| LPB6C | 0,01050 | bc |
| LPB6AM | 0,01000 | bc |
| 48J | 0,00950 | bc |
| EA6 | 0,00900 | bc |
| LPA3 | 0,00700 | bc |
| LPA6 | 0,00650 | bc |
| 48JC | 0,00400 | c |
| EA3C | 0,00300 | c |
| EA6C | 0,00250 | c |
| LPA6C | 0,00200 | c |
| LPA3C | 0,00100 | c |

DMS= 0,01133

MG = 0,00814

CV% = 34,88979

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste Tukey de 5% de probabilidade.

DADOS: Peso seco de micélio após 30 dias de incubação, em gramas

| Isolado | peso seco (A) | peso seco (B) |
|---------|---------------|---------------|
| EA3 | 0,017 | 0,014 |
| EA3C | 0,002 | 0,004 |
| EA6 | 0,011 | 0,007 |
| EA6C | 0,002 | 0,003 |
| LPA6 | 0,009 | 0,004 |
| LPA6C | 0,002 | 0,002 |
| LPA3 | 0,006 | 0,008 |
| LPA3C | 0,001 | 0,001 |
| LPB6AZ | 0,017 | 0,029 |
| LPB6CAZ | 0,009 | 0,012 |
| LPB6AM | 0,010 | 0,010 |
| LPB6CAM | 0,009 | 0,012 |
| 48J | 0,009 | 0,010 |
| 48JC | 0,005 | 0,003 |

Siglas e Abreviações:

F.V. = Fonte de variação

G.L.= Graus de liberdade

S.Q.= Soma de quadrado

Q.M.= Quadrado médio

F = Estatística do teste F

MG = Média geral

CV%= Coeficiente de variação em %

DNS= Diferença mínima significativa.