



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL
SINTÉTICO POR MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
AMBIENTES MARINHOS

ELISA PAIS PELLIZZER

Rio Claro - SP
Janeiro – 2019

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL
SINTÉTICO POR MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A
AMBIENTES MARINHOS**

Elisa Pais Pellizzer

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada).

Orientadora: Lara Durães Sette

Co-orientadora: Patricia Giovanella Grazziotin

Rio Claro - SP

Janeiro – 2019

P391d Pellizzer, Elisa Pais
Destoxificação e descoloração de efluente têxtil sintético por micro-organismos associados a ambientes marinhos / Elisa Pais Pellizzer. -- Rio Claro, 2019
89 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientadora: Patricia Giovanella Grazziotin

1. Microbiologia industrial. 2. Biorremediação. 3. Corantes e tingimento. 4. Poluentes. 5. Fungos Biotecnologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Destoxificação e descoloração de efluente têxtil sintético por micro-organismos associados a ambientes marinhos

AUTORA: ELISA PAIS PELLIZZER

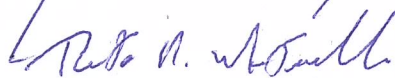
ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

COORIENTADORA: PATRICIA GIOVANELLA GRAZZIOTIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar



Profa. Dra. LUCÉLIA CABRAL
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Rio Claro, 20 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pela vida, pela natureza, pela saúde, pelas oportunidades de crescimento e por ter tantas pessoas queridas em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Lino e Gabriella, pelo amor incondicional doado através de tantas atitudes. À minha querida tia Nene, pelo exemplo de coragem e força. Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos e tios, obrigada pelo afeto e alegria que vocês transmitem. Gratidão por ter uma família como essa.

Ao meu amigo e namorado Iago, pelo companheirismo, paciência e cuidado. Obrigado por ser quem é e por fazer tanto por mim sem nem se dar conta.

Agradeço a professora Lara, por acreditar no meu potencial, dar todo o suporte necessário para pesquisa e pela oportunidade única em coletar amostras na Antártica.

Meu muito obrigada a Paty, por toda ajuda desde compartilhar métodos, discutir resultados, pensar como uma cientista até os papéis mais divertidos.

A todos os integrantes do LAMAI, em especial ao Igor, Ju, Bruno e Gabi. Obrigada meus amigos por tantos momentos compartilhados e toda ajuda prestada. Gratidão também a Dani pelo auxílio nos testes de toxicidade.

Aos técnicos, pessoal da limpeza, secretaria e professores do departamento de bioquímica e microbiologia. Um agradecimento especial ao Dri por estar disposto a ajudar sempre que precisei, pelas críticas construtivas e pelas análises no FTIR.

A todos os meus amigos, onde quer que estejam, por serem tão companheiros, verdadeiros, por acreditarem em mim e me darem forças sempre que preciso. A caminhada fica muito mais leve com vocês.

A UNESP, ao CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2016/07957-7) pelo apoio financeiro.

A todos que participaram da minha caminhada até este momento o meu sincero agradecimento e a certeza que este trabalho é uma conquista de todos nós.

Difficulties are just things to overcome, after all.

Ernest Shackleton

RESUMO

Quantidades significativas de efluentes, contendo corantes, sais e pH alcalino, são produzidas diariamente pelas indústrias têxteis. Esses efluentes devem ser tratados adequadamente antes de serem descartados em corpos d'água, pois são potencialmente tóxicos a vários organismos. Neste contexto, a biorremediação utilizando fungos e bactérias tem sido uma alternativa sustentável para o tratamento destes poluentes. Aliado a isso, a utilização de micro-organismos de origem marinha apresenta vantagens, tendo em vista que esses organismos são adaptados à salinidade e alcalinidade do ambiente marinho. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de micro-organismos associados a ambientes marinhos na destoxificação e descoloração de Efluente Têxtil Sintético (ETS) e otimizar o processo. Para tanto, foram estruturados diversos experimentos com os seguintes micro-organismos: os fungos *Tinctosporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Peniophora* sp. CBMAI 1063, o isolado LAMAI 659 e as bactérias *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Dietzia maris* CBMAI 705. Em adição, foi preparado um efluente têxtil sintético utilizando NaCl 30 g L⁻¹ e os corantes Azul Índigo, Marinho Reativo e Preto Sulfuroso em diversas concentrações. Os experimentos foram analisados quanto à biomassa seca formada, atividade de enzimas ligninolíticas, pH, descoloração, adsorção e toxicidade utilizando os bioindicadores *Artemia* sp., *A. fischeri* e *C. sativus*. O planejamento experimental foi aplicado para otimização dos processos de destoxificação e descoloração. Além disso, foram feitas duas validações para confirmação dos resultados dos planejamentos e analisados os espectros dos tratamentos em UV-Vis e FTIR. Os resultados mostraram que o consórcio formado por *Marasmiellus* sp., *B. subtilis* e *D. maris* foi o mais adequado no biotratamento do ETS. Os planejamentos experimentais utilizando este consórcio elevaram as taxas de descoloração de 41,22% (200 mg L⁻¹ de cada corante) a 71,39% (300 mg L⁻¹ de cada corante) e também de destoxificação (EC₅₀ de 12,16% a 27,56%), nas mesmas concentrações de corantes (200 mg L⁻¹ de cada corante). Os experimentos de validação confirmaram os resultados, que poderiam ser considerados válidos, nos planejamentos experimentais e evidenciaram a necessidade de validação após cada planejamento realizado. Além disso, as análises de UV-Vis e FTIR permitiram a inferência de processos de adsorção e a biotransformação dos corantes têxteis estudados. Os resultados do presente trabalho demonstram a capacidade do fungo *Marasmiellus* sp., em consórcio com as bactérias *B. subtilis* e *D. maris*, nos processos de destoxificação e descoloração de ETS, mesmo em altas concentrações de corantes. Além

disso, os resultados evidenciam a relevância do estudo de micro-organismos derivados de ambientes marinhos em processos de biorremediação.

Palavras-chave: Corantes têxteis, Biotecnologia ambiental, Toxicidade aguda, Biorremediação.

ABSTRACT

Significant amounts of effluent containing dyes, salts and alkaline pH are produced daily by the textile industries. These effluents must be properly treated before being disposed in water bodies, as they are potentially toxic to various organisms. In this context, bioremediation using fungi and bacteria has been a sustainable alternative for the treatment of these pollutants. In addition, the use of microorganisms of marine origin has advantages, since these organisms are adapted to the salinity and alkalinity of the marine environment. Thus, the aims of this work were to evaluate the potential of microorganisms associated to the marine environments in the detoxification and discoloration of Synthetic Textile Effluent (STE) and to optimize the process. For this, several experiments were structured with the following microorganisms: the fungi *Tinctosporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Peniophora* sp. CBMAI 1063, the isolate LAMAI 659, the bacteria *Bacillus subtilis* CBMAI 707 and *Dietzia maris* CBMAI 705. In addition, a STE was prepared using NaCl 30 g L⁻¹ and the dyes Indigo blue, Reactive Blue and Sulfur Black at various concentrations. The experiments were analyzed for dried biomass, ligninolytic enzymes activities, pH, discoloration, adsorption and toxicity using the bioindicators *Artemia* sp., *A. fischeri* and *C. sativus*. The experimental design was applied to optimize detoxification and discoloration processes. In addition, two validations were made to confirm the results of the experimental design and the spectra of the UV-Vis and FTIR treatments were analyzed. The results showed that the consortium formed by *Marasmiellus* sp., *B. subtilis* and *D. maris* was the most suitable in the biotreatment of STE. The experimental design using this consortium increased the discoloration rates from 41.22% (200 mg L⁻¹ of each dye) to 71.39% (300 mg L⁻¹ of each dye) and the detoxification rates as well (EC50 from 12.16% to 27.56%), in the same concentration of dyes (200 mg L⁻¹ of each dye). The validation experiments confirmed the results that could be considered valid in the experimental design and evidenced the need for validation after each planning. In addition, the UV-Vis and FTIR analyzes allowed the inference of adsorption processes and the biotransformation of the studied textile dyes. Results from the present work demonstrate the ability of the fungus *Marasmiellus* sp., in consortium with the bacteria *B. subtilis* and *D. maris*, in the processes of detoxification and discoloration of STE, even in high concentrations of dyes. In addition, the results highlight the relevance of the study of microorganisms derived from marine environments in bioremediation processes.

Key-words: Textile dyes, Environmental biotechnology. Acute toxicity, Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Azul Índigo.	21
Figura 2. Reactive Blue 4.	22
Figura 3. Hipótese da estrutura química do preto sulfuroso.	22
Figura 4. Oxidação de estruturas fenólicas pelas enzimas manganês peroxidase, lignina peroxidase, lacase ou um mediador redox.	27
Figura 5. Catabolismo microbiano de hidrocarbonetos envolvendo as enzimas citocromo P-450 mono-oxigenase, lacase, LiP e MnP.	28
Figura 6. Degradação de benzeno via monooxigenase e dioxigenase.	29
Figura 7. Medidas de biomassa seca dos bioensaios utilizando o isolado LAMAI 659 e <i>Peniophora</i> sp., após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm, na presença e ausência dos efluentes A (50 mg L ⁻¹ de cada corante), B (100 mg L ⁻¹ de cada corante) e C (200 mg L ⁻¹ de cada corante).	44
Figura 8. Análise de toxicidade em <i>Artemia</i> sp. (percentual de indivíduos vivos) submetida a diferentes concentrações do efluente, com proporções iguais dos corantes. O pH foi ajustado para 8,0 com a utilização de hidróxido de sódio, em todas as amostras.	46
Figura 9. Medidas de biomassa seca após bioensaio utilizando os fungos LAMAI 659, <i>Tinctosporcellus</i> sp., <i>Peniophora</i> sp. e <i>Marasmiellus</i> sp., após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm, na presença do ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante).	47
Figura 10. Medidas de biomassa seca dos bioensaios utilizando consórcios microbianos formados pela(s) bactéria(s) (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) por mais 7 dias, na presença do ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante). Além do experimento contendo apenas as bactérias (9 dias). Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm.	49
Figura 11. Medidas de biomassa seca após bioensaio com ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante) utilizando consórcios microbianos em duas estratégias diferentes. Além do bioensaio utilizando apenas <i>Marasmiellus</i> sp. após 9 dias de cultivo de cultivo a 28°C e 140 rpm.	51
Figura 12. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na descoloração do ETS obtidos no planejamento experimental PB1.	54

Figura 13. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na destoxificação do ETS obtidos no planejamento experimental PB1.	55
Figura 14. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na descoloração do ETS obtidos no planejamento experimental PB2.	57
Figura 15. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na destoxificação do ETS obtidos no planejamento experimental PB2.	57
Figura 16. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das duas variáveis na descoloração do ETS obtidos no DCCR.	60
Figura 17. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das duas variáveis na destoxificação do ETS obtidos no DCCR.	60
Figura 18. Medidas de biomassa seca após ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L ⁻¹ utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.	61
Figura 19. Porcentagem de descoloração após ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L ⁻¹ utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 3, 5, 7 e 9 dias.	63
Figura 20. Porcentagem de descoloração do micélio inativo e vivo após ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante) e utilizando o consórcio microbiano durante 7 dias.	64
Figura 21. Medidas de inibição de crescimento radicular de <i>C. sativus</i> após os ensaios 2(PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L ⁻¹) utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle contendo as mesmas condições de cultivo, porém sem o consórcio.	65
Figura 22. Concentração efetiva (EC ₅₀), após 15 minutos de exposição nas amostras contendo ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante) antes e após bioensaio utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) por mais 7 e 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.	66
Figura 23. Medidas de biomassa seca após bioensaios em diferentes condições utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.	68

Figura 24. Porcentagem de descoloração após bioensaios com ETS em diferentes condições utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.....	69
Figura 25. Concentração efetiva (EC ₅₀), após 15 minutos de exposição das amostras contendo ETS antes e após bioensaios em diferentes condições utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) por mais 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.	71
Figura 26. Espectro UV-Vis após Ensaio 4 (PB1) utilizando o fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio.....	72
Figura 27. Espectro UV-Vis após Ensaio 7 (PB2) utilizando o fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio.....	73
Figura 28. Espectro de FTIR após Ensaio 7 (PB2) utilizando o fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio.....	74
Figura 29. Espectro UV-Vis após Ensaio 12 (PB1) utilizando o fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio.....	75
Figura 30. Espectro de FTIR após Ensaio 12 (PB1) utilizando o fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos e bactérias isoladas de ambientes marinhos: descrição de suas propriedades e fontes de isolamento.	25
Tabela 2. Efluentes Têxteis Sintéticos (ETS) preparados com diferentes concentrações de corantes.	34
Tabela 3. Variáveis utilizadas no planejamento experimental 1 (PB16) e as concentrações de cada uma.	40
Tabela 4. Variáveis utilizadas no planejamento experimental 2 (PB12) e as concentrações de cada uma.	41
Tabela 5. Níveis das variáveis estudadas no DCCR.	41
Tabela 6. Análise de toxicidade aguda em <i>Artemia</i> sp. (percentual de sobrevivência) e registro do pH dos ETS A (50 mg L ⁻¹ de cada corante), B (100 mg L ⁻¹ de cada corante) e C (200 mg L ⁻¹ de cada corante) antes e após o bioensaio com os isolados LAMAI 659 e <i>Peniophora</i> sp. cultivados por 7 dias a 28 °C e 140 rpm.	45
Tabela 7. Concentração efetiva (EC ₅₀) de <i>A. fischeri</i> , após 30 min de exposição utilizando as amostras contendo ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante), antes e após bioensaio com os fungos LAMAI 659, <i>Tinctosporcellus</i> sp., <i>Peniophora</i> sp. e <i>Marasmiellus</i> sp.	48
Tabela 8. Concentração efetiva (EC ₅₀), após 30 minutos de exposição no equipamento Microtox®, das amostras contendo ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante) antes e após bioensaio utilizando a(s) bactéria(s) (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) por mais 7 dias, além do experimento contendo apenas as bactérias (9 dias). Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm.	49
Tabela 9. Descoloração e destoxificação (inibição do crescimento das sementes de <i>C. sativus</i>) do ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante) utilizando consórcios microbianos e duas estratégias diferentes. Além do controle contendo o ETS (200 mg L ⁻¹ de cada corante) antes do bioensaio e do bioensaio utilizando apenas <i>Marasmiellus</i> sp. após 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm.	52
Tabela 10. Descoloração e destoxificação do ETS utilizando planejamento experimental PB1. O pH foi medido ao término do experimento. Os ensaios de 17 a 19 são os pontos centrais, utilizados como controles. Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm.	53

Tabela 11. Descoloração e destoxificação do ETS utilizando planejamento experimental PB2. O pH foi medido ao término do experimento. Os ensaios de 13 a 15 são os pontos centrais, utilizados como controles. Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm.	56
Tabela 12. Descoloração e destoxificação do ETS utilizando DCCR com duas variáveis. Os ensaios de 9 a 11 são os pontos centrais, utilizados como controles. Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm.	59
Tabela 13. Medidas de inibição de crescimento radicular de <i>C. sativus</i> após ensaios 4 (PB1) e 7 (PB2) utilizando as bactérias (<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>) durante dois dias, seguido pelo fungo (<i>Marasmiellus</i> sp.) durante 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle contendo as mesmas condições de cultivo, porém sem o consórcio.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABIT - Associação Brasileira da Indústria Têxtil e Confecção
- ABTS – 2,2-azino-bis-etilbentiazolina
- ANOVA – Analysis of variance
- ASW – Água do mar artificial
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BD – *B. subtilis* e *D. maris*
- CBMAI - Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Industria
- CNI - Confederação Nacional da Indústria
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
- CRM – Central de Recursos Microbianos UNESP/RC
- DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional
- EC₅₀ – Concentração efetiva
- EPS – Exopolissacarídeos
- ETS – Efluente Têxtil Sintético
- FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
- HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- LAMAI – Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial
- LiP – Lignina Peroxidase
- M - *Marasmiellus* sp.
- MB - *Marasmiellus* sp. e *B. subtilis*
- MBD - *Marasmiellus* sp., *B. subtilis* e *D. maris*
- MD - *Marasmiellus* sp. e *D. maris*
- MnP - Manganês Peroxidase
- PB – Plackett-Burman
- U – Unidade enzimática
- UFC – Unidades Formadoras de Colônia
- USEPA – *United States Environmental Protection Agency*
- UV-Vis - *Ultraviolet-visible spectroscopy*
- ZDHC – *Zero Discharge of Hazardous Chemicals*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 – Indústria têxtil.....	19
2.1.1 – Corantes têxteis	20
2.1.1.1 - Azul Índigo.....	21
2.1.1.2 – Marinho Reativo	21
2.1.1.3 - Preto sulfuroso	22
2.1.2 – Tratamentos de efluentes têxteis.....	22
2.2 – Biorremediação.....	23
2.2.1. Bioprospecção	23
2.2.1.1. Micro-organismos de origem marinha	23
2.2.1.2. Fungos ligninolíticos	25
2.2.1.3. Bactérias degradadoras	28
2.3. Análise de toxicidade.....	29
2.3.1. <i>Artemia</i> sp.....	29
2.3.2. <i>Aliivibrio fischeri</i> – Microtox®.....	30
2.3.3. <i>Cucumis sativus</i>	30
2.4. Planejamento experimental.....	30
3. OBJETIVO GERAL.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Micro-organismos.....	33
4.2. Cultivo dos fungos e estruturação do experimento para determinação da concentração do Efluente Têxtil Sintético (ETS)	33
4.2.1. Biomassa seca.....	34
4.2.2. Teste de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.....	35
4.3. Determinação do fungo com melhor capacidade de destoxificação.....	35

4.3.1. Teste de toxicidade com <i>A. fischeri</i>	35
4.3.2. Atividade das enzimas ligninolíticas frente ao ETS	36
4.4. Destoxificação utilizando consórcios microbianos	37
4.5. Destoxificação e descoloração utilizando consórcios microbianos em duas estratégias diferentes	37
4.5.1. Teste de toxicidade com <i>C. sativus</i>	38
4.5.2. Descoloração do ETS	38
4.5.3. Adsorção do ETS pela biomassa	38
4.6. Otimização da destoxificação e descoloração do ETS	39
4.6.1. Planejamento experimental Plackett-Burman 1 (PB1).....	39
4.6.2. Planejamento experimental Plackett-Burman 2 (PB2).....	40
4.6.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	41
4.7. Validação experimental	42
4.7.1. Primeira validação	42
4.7.2. Segunda validação	42
4.7.3. FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>).....	43
4.7.4. Análise estatística	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Determinação da concentração do ETS.....	44
5.2. Determinação do fungo com melhor capacidade de destoxificação.....	47
5.3. Destoxificação utilizando consórcios microbianos	48
5.4. Destoxificação e descoloração utilizando consórcios microbianos e duas estratégias diferentes	50
5.5. Otimização da destoxificação e descoloração do ETS	52
5.5.1. Planejamento experimental Plackett-Burman 1 (PB1).....	52
5.5.2. Planejamento experimental Plackett-Burman 2 (PB2).....	55
5.5.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	58
5.6. Validação experimental	61

5.6.1. Primeira validação	61
5.6.2. Segunda validação	67
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICES	87

1. INTRODUÇÃO

A indústria têxtil produz grandes quantidades de efluentes, os quais contêm, principalmente, corantes, sais, surfactantes, compostos de cloro e sólidos suspensos. Embora todas essas substâncias sejam potencialmente tóxicas ao ambiente, os corantes são considerados os principais poluentes do ponto de vista ambiental. Isto é devido, em parte, pela capacidade dos corantes de afetar a transparência da água, mesmo em pequenas concentrações (KHANDEGAR; SAROHA, 2013). Conseqüentemente, os organismos fotossintetizantes dos corpos d'água não recebem a quantidade de luz adequada, sendo prejudicial à toda a cadeia trófica. Além disso, alguns corantes são tóxicos e mutagênicos podendo afetar a qualidade da água para consumo, irrigação e recreação, bem como apresentar efeitos deletérios à fauna, flora e microbiota que estão em contato com a água poluída (PRZYSTAŚ; ZABŁOCKA-GODLEWSKA; GRABIŃSKA-SOTA, 2012; HUBBE et al., 2012).

Nesse contexto, o tratamento dos efluentes provenientes de indústrias têxteis é importante para a manutenção e preservação do meio receptor dos rejeitos. Dessa forma, o tratamento deve ser capaz de descolorir e destoxificar o efluente, para que não ocorram malefícios ao ambiente. Sendo assim, a biorremediação pode ser vista como uma alternativa sustentável para o tratamento de efluentes, pois age otimizando processos que já ocorrem naturalmente, buscando a mineralização dos compostos sem que haja rejeitos tóxicos como resultado. A utilização de micro-organismos de origem marinha para a destoxificação e descoloração de efluentes têxteis pode apresentar vantagens em relação aos micro-organismos isolados de outros ambientes. Isso por que, apresentam tolerância às condições de alta salinidade e alcalinidade, particularidades também encontradas neste tipo de efluente (BUNUGLI-SANTOS et al., 2015).

Estudos de biorremediação têm reportado o sucesso na descoloração e destoxificação de apenas um corante dissolvido. Entretanto, o efluente industrial é uma mistura complexa, composta por múltiplos corantes e outras substâncias. O que faz com que estes compostos interajam quimicamente, alterando a toxicidade inicial, ou seja, podem apresentar um efeito sinérgico que aumenta a toxicidade do efluente. Portanto, a utilização de uma solução que simule um efluente têxtil real tem sido uma estratégia utilizada em diversos estudos (MACHADO et al., 2006; SAROJ et al., 2015; KURADE et al., 2017). Além disso, a utilização de efluente têxtil sintético é uma alternativa eficaz em estudos laboratoriais, pois com o conhecimento das concentrações exatas de corantes e de outros compostos no efluente

é possível comparar e mensurar as substâncias antes e depois da ação microbiana (bioprocesso).

Considerando o que foi exposto acima, no presente trabalho foram utilizados fungos filamentosos associados ao ambiente marinho (*Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Tinctosporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e o isolado LAMAI 659, os quais foram selecionados devido à capacidade de produção de enzimas e degradação/destoxificação de poluentes ambientais (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010; MENEZES et al., 2010; BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2016, PAIVA, 2016). Os três primeiros pertencem ao grupo dos basidiomicetos e foram isolados de esponjas marinhas e o último é um ascomiceto (ainda não identificado) isolado de sedimento marinho. Em adição, foram também utilizadas bactérias associadas ao ambiente marinho (reservatório de petróleo *offshore*), pertencentes a dois gêneros já reportados como degradadores de corantes têxteis, *Bacillus* e *Dietzia* (LEELAKRIANGSAK; BORISUT, 2012; DAS et al., 2015), as quais foram previamente selecionadas por apresentarem capacidade de degradar compostos orgânicos e poluentes ambientais (DELLAGNEZZE et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2011; VIEIRA, 2016).

Nesta perspectiva, o grupo de pesquisa coordenado pela professora Dra. Lara Durães Sette, há mais de uma década vem concentrando esforços em pesquisas relacionadas com o isolamento de fungos de ambiente marinho, visando produção de enzimas e aplicação das mesmas, ou dos próprios micro-organismos em processos de biorremediação de poluentes ambientais (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; MAGRINI, 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2012; VIEIRA, 2016; PAIVA, 2016; BONUGLI-SANTOS et al., 2016; OTERO et al., 2017; MAINARDI et al., 2018; VIEIRA et al., 2018).

O foco do presente estudo foi avaliar o potencial dos fungos *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Tinctosporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e LAMAI 659 e das bactérias *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Dietzia maris* CBMAI 705 na destoxificação e descoloração de efluente têxtil sintético, bem como conhecer a influência de diferentes fatores visando otimização do processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Indústria têxtil

Segundo a Confederação Nacional da Indústria – CNI (2017), o setor têxtil brasileiro possui importância econômica relevante, sendo a maior cadeia têxtil completa do Ocidente, possuindo desde as plantações de algodão, passando pelas fiações, tecelagens, beneficiadoras, confecções e varejo até os desfiles de moda. Além disso, é a quinta maior indústria têxtil do mundo, tendo faturado 51,58 bilhões de dólares em 2017, o que representa 8,64 bilhões de dólares a mais do que o total faturado em 2016 (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e Confecção - ABIT, 2018). Sendo assim, é um setor industrial que a cada ano cresce mais e é responsável por 1,5 milhões de empregos diretos.

Porém, embora a indústria têxtil tenha sua importância econômica, há uma série de impactos ambientais decorrentes dos rejeitos desse setor. A indústria têxtil utiliza grandes quantidades de água e uma série de compostos químicos em várias etapas do processamento de têxteis. Segundo Arslan-Alaton et al. (2008), há geração de até 100 litros de efluentes para a confecção de 1 quilo de tecido. Entre os compostos utilizados, destacam-se os corantes, sais, surfactantes e compostos de cloro, sendo os corantes os maiores contaminantes dos efluentes têxteis (KHANDEGAR; SAROHA, 2013). Os processos que mais geram efluentes no setor têxtil são os de preparação do tecido (purga, desengomagem, alvejamento) e o de tingimento (CNI, 2017).

Um dos impactos gerados pelos corantes no efluente têxtil, inadequadamente tratado, é o turvamento da água, dificultando a entrada de luz. Consequentemente, a taxa fotossintética diminui, causando deficiência de oxigênio. Além disso, alguns corantes são tóxicos e mutagênicos. Portanto, esse contaminante pode prejudicar a qualidade da água para consumo, irrigação e recreação e causar efeitos deletérios a fauna, flora e microbiota que estão em contato com a água poluída do rio. (PRZOYSTAŚ; ZABŁOCKA-GODLEWSKA; GRABIŃSKA-SOTA, 2012; HUBBE et al., 2012). Outro fato alarmante relacionado aos corantes sintéticos foi levantado por Revankar e Lele (2007), onde aproximadamente todo material orgânico de corantes inseridos no meio ambiente é proveniente da descarga de rejeitos da indústria têxtil.

Seguindo esse panorama, embora as indústrias têxteis representem um componente fundamental para a economia brasileira, há um descaso ambiental, referente à poluição gerada por esse segmento industrial. Tendo em vista a poluição gerada pelos setores industriais em

geral, os governos e agências regulatórias criaram leis para que haja um controle sobre os efluentes lançados.

No mundo, há países como os Estados Unidos da América, Canadá, e os participantes da União Europeia que possuem legislações específicas para as descargas de efluentes industriais têxteis, o que é um avanço para a preservação do ambiente (ZDHC, 2016). No Brasil, a Resolução nº 357 de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nos artigos 14, 15 e 16, estabelece que nos corpos de água doce classe 1, 2 e 3 não é permitida a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processos de coagulação, sedimentação e filtração convencionais (BRASIL, 2005). Nesse contexto, com relação à quantidade de componentes tóxicos que compõem o efluente, grande parte dos parâmetros são exigidos em referência às suas concentrações em águas residuais, o que favorece o uso desnecessário de água para a diluição do efluente, anteriormente à descarga do mesmo no ambiente (THE TEXTILE INSTITUTE, 2007). Esse ato de diluição é considerado ilegal também pela legislação brasileira (BRASIL, 2005). Porém, assim como outros setores da indústria brasileira, há uma deficiência de fiscalização e planos de monitoramento para que a lei seja cumprida corretamente.

2.1.1 – Corantes têxteis

Os primeiros registros de coloração de tecidos mostram a utilização do corante natural Índigo, retirado de uma planta, o qual é ainda utilizado, porém, em sua forma sintética. Apesar de haver atualmente corantes naturais, a maior parte das indústrias utiliza corantes sintéticos por terem menor custo de produção, maior fixação nos tecidos onde são aplicados e maior durabilidade. Isso é devido à estrutura química estável e às fortes ligações covalentes que possuem. Entretanto, essas características também dificultam a degradação química e biológica dos corantes (CHAKRABORTY, 2011).

Os corantes têxteis podem ser classificados basicamente em duas classes. A primeira é em relação à estrutura química do corante, por exemplo, os corantes azos, antraquinona e índigo. E a segunda é de acordo com o método de aplicação destes corantes, como os corantes reativos, à cuba (*vat dyes*), diretos, ácidos, básicos e dispersos (IBRAHIM, 2011).

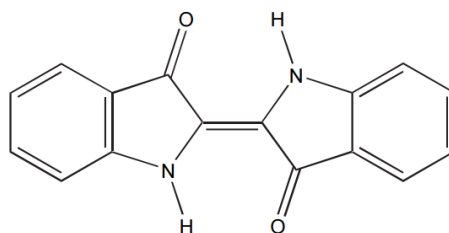
Os corantes à cuba são compostos orgânicos insolúveis em água devido à presença de grupos cetônicos em seu cromóforo. O mais importante corante deste tipo é o Índigo. Corantes reativos são assim chamados pois um grupo reativo é introduzido no corante e assim, este se liga covalentemente às moléculas das fibras do tecido. Para tingir tons suaves que oferecem alta resistência à umidade e à luz são utilizados os corantes sulfurosos. Porém,

esses corantes apresentam uma estrutura química complexa e muitas vezes desconhecida. Corantes ácidos são utilizados para coloração de fibras animais em conjunto com uma solução ácida, que pode ser ácido acético, sulfato de sódio, ácido sulfúrico e surfactantes. Os corantes azoicos são reconhecidos por conterem o grupo azo (-N=N-), são insolúveis em água e geralmente aplicados em algodão e fibras sintéticas (GUARATINI; ZANONI, 2000).

2.1.1.1 - Azul Índigo

O corante Azul Índigo tem caráter básico e é utilizado no tingimento de fios de algodão empregados na manufatura do tecido conhecido como jeans. É um composto azul e possui como característica química a presença do grupo cetônico (C = O) (Figura 1). Cerca de 5 a 20% do corante é perdido no processo de tingimento, e quando é descartado diretamente no ambiente, pode gerar sérios problemas nos processos biológicos aquáticos (SOUSA et al., 2008).

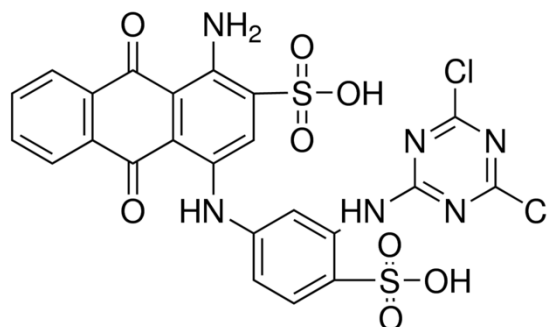
Figura 1. Estrutura molecular do Azul Índigo. Fonte: Christie (2007).



2.1.1.2 – Marinho Reativo

Os corantes reativos são muito utilizados na indústria têxtil para colorir fibras de algodão, lã e poliamida, os quais proporcionam uma grande variedade de tonalidade de cores (Figura 2). São também fáceis de aplicar e tem aumentado sua demanda pelo crescente uso de algodão mundialmente. Geralmente, o tingimento é realizado em banhos contendo 25 a 100 g L⁻¹ de sais (NaCl ou Na₂SO₄). Além disso, durante as colorações, até 50% do corante inicial permanece no banho em sua forma hidrolisada, a qual não tem afinidade com o tecido e é descartado como efluente têxtil (MAHAPATRA, 2016).

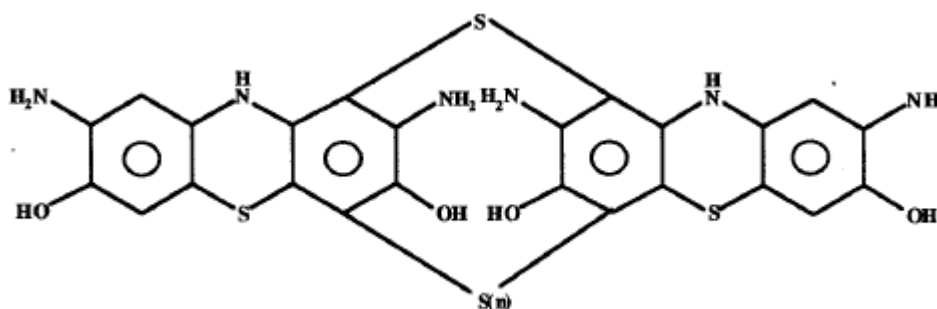
Figura 2. Estrutura molecular do Marinho Reativo 4. Fonte: Sigma-Aldrich



2.1.1.3 - Preto sulfuroso

Corantes sulfurosos se caracterizam por apresentar enxofre integrando o cromóforo e sob a forma de pontes sulfídicas. São os corantes mais comuns produzidos para corar algodão, em termos de volume, e a sua aplicação nos tecidos ocorre através de redução em meio alcalino e por isso são responsáveis por altos graus de contaminação ambiental (ESTEVES, 2000). Além disso, são baratos, tem boa solidez à lavagem e são fáceis de aplicar. O preto é o corante sulfuroso mais utilizado e tem a fórmula empírica $C_{24}H_{16}N_6O_8S_7$ ou $C_{24}H_{16}N_6O_8S_8$. Entretanto, sua estrutura molecular ainda precisa ser elucidada (Figura 3) (CHAKRABORTY, 2011).

Figura 3. Hipótese da estrutura molecular do preto sulfuroso. Fonte: Esteves (2000).



2.1.2 – Tratamentos de efluentes têxteis

Atualmente, as indústrias brasileiras utilizam principalmente tratamentos físicos e/ou químicos para reduzir a carga poluidora dos efluentes gerados. Entretanto, os métodos convencionais utilizados não têm sido suficientes para remoção dos contaminantes, antes dos mesmos serem despejados nos corpos d'água (FERREIRA, 2011). Tendo isso em vista, a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2009) desenvolveu um Estudo Prospectivo Setorial Têxtil e Confecção, no qual descreve a visão de Futuro do setor até 2023. Nesta

visão, fica nítida a importância do desenvolvimento sustentável para a diferenciação competitiva do setor têxtil brasileiro a nível global.

2.2 – Biorremediação

O processo de biorremediação é um tratamento que consiste em utilizar micro-organismos para diminuir ou anular a contaminação de poluentes (BOOPATHY, 2000). Comparada aos tratamentos físico-químicos, a biorremediação apresenta vantagens como o baixo custo e o fato de ser uma alternativa considerada melhor do ponto de vista ambiental. Além disso, os micro-organismos são capazes, muitas vezes, de mineralizar completamente os poluentes, produzindo produtos não tóxicos (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004).

Os micro-organismos que possuem o aparato enzimático capaz de degradar poluentes são os mais promissores para a biorremediação. Porém, como a maioria dos corantes têxteis possui moléculas com alta estabilidade e recalcitrância, a probabilidade de degradar esses poluentes aumenta se forem utilizados consórcios microbianos constituídos por dois ou mais micro-organismos (SARATALE et al., 2009; DAVE; PATEL; TIPRE, 2015). Isso porque eles atuam de maneira sinérgica, aumentando as vias metabólicas para biotransformação, e conseqüentemente, há a melhora na eficácia do processo biodegradativo (DAS; DASH, 2014).

Os bioprocessos mais utilizados para a biorremediação de corantes têxteis são a biossorção, biodegradação e a bioacumulação. A biossorção é um processo independente do metabolismo dos micro-organismos e que pode ocorrer tanto com a biomassa viva ou morta. Ela se baseia na ligação dos poluentes à biomassa, fazendo com que se diminua a concentração dos corantes ou até mesmo os remova completamente do meio (SRINIVASAN; VIRARAGHAVAN, 2010). A biodegradação é um mecanismo que demanda de energia e do metabolismo do micro-organismo, onde as moléculas complexas de corantes são degradadas em moléculas menores através da ação de determinadas enzimas. A bioacumulação também é um processo dependente de energia e do metabolismo, onde células ativas acumulam os poluentes dentro do citoplasma (WANG; HU, 2008).

2.2.1. Bioprospecção

2.2.1.1. Micro-organismos de origem marinha

Os ambientes marinhos são caracterizados pelas condições físicas e químicas diversas, de pH, salinidade, variações de temperatura, entre outras. Desta forma, os micro-organismos que habitam os ambientes marinhos estão adaptados às condições adversas presentes nos mesmos e, por isso, podem apresentar vantagens em processos salinos e alcalinos quando

comparados aos seus análogos terrestres (DASH et al., 2013). Devido ao fato de resistirem e de se desenvolverem em condições variáveis, os micro-organismos de origem marinha possuem grande potencial para aplicação em processos de biorremediação, principalmente aqueles conduzidos em condições salinas (BIROLI et al., 2016).

Os fungos derivados de ambiente marinho não podem ser definidos somente por critérios fisiológicos, necessitam de um vasto estudo de sua ecologia para serem classificados como fungos marinhos obrigatórios, aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em estuários e ambientes marinhos, ou fungos marinhos facultativos, que são organismos terrestres e aquáticos que conseguem crescer em ambientes marinhos (KOHLMEYER e KOHLMEYER 1979). Desta forma, quando não é possível comprovar que o fungo isolado é obrigatório ou facultativo, utiliza-se a expressão “fungo derivado” de ambiente marinho (OSTERHAGE, 2001).

A associação entre micro e macro-organismos é uma característica proeminente dos ecossistemas marinhos. Corais e esponjas são conhecidos por manterem relações simbióticas ou de parasitismo com micro-organismos como cianobactérias, fungos e bactérias, o que os torna um conglomerado em miniatura de vários organismos. Entretanto, para muitos dos organismos marinhos a natureza destas associações não foi, até o presente momento, rigorosamente investigada e definida.

Vários animais marinhos, como as esponjas, se alimentam por meio da filtração da água que os rodeia e, portanto, podem estar sujeitos ao contato com poluentes, impurezas do fitoplâncton ou outras substâncias. Dessa forma, é possível encontrar micro-organismos que estão nestes animais e que são capazes de degradar a matéria orgânica. Utilizando suas enzimas hidrolíticas e/ou oxidativas, esses organismos conseguem obter nutrientes dos poluentes que estão em contato (WANG, 2006; SETTE; BUNUGLI-SANTOS, 2013).

Na Tabela 1 estão apresentados os micro-organismos associados a ambientes marinhos utilizados neste estudo. Os fungos já foram previamente estudados e apresentaram resultados relevantes na produção de enzimas ligninolíticas e/ou degradação de poluentes ambientais, incluindo a descoloração/destoxificação de corantes têxteis. As bactérias selecionadas apresentaram capacidade de degradar hidrocarbonetos e produzir EPS (exopolissacarídeos). No estudo de Vieira (2016) o melhor consórcio degradador de poluentes ambientais (óleo diesel, pireno e corante têxtil RBBR) continha em sua composição as bactérias *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Dietzia maris* CBMAI 705, além do fungo marinho basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e de um zigomiceto de origem marinha *Mucor racemosus* CBMAI 847.

Representantes dos gêneros *Bacillus* e *Dietzia* são capazes de produzir azoredutases, enzimas responsáveis pela quebra das ligações azo, presentes em muitos corantes têxteis (LEELAKRIANGSAK; BORISUT, 2012; BABU et al., 2015). No estudo de Das et al. (2015) a bactéria *Dietzia* sp. foi capaz de degradar diferentes corantes azo.

Tabela 1. Fungos e bactérias isoladas de ambientes marinhos: descrição de suas propriedades e fontes de isolamento. Fonte: Elaborado pela autora.

Micro-organismo	Fonte de isolamento	Propriedades	Referências
<i>Tinctosporellus</i> sp. CBMAI 1061	<i>Dragmacidon reticulatum</i> (esponja)	Produção de Lacase, LiP e MnP; Degradação de HPA	(BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010; MAGRINI, 2012).
<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>Amphimedon viridis</i> (esponja)	Produção de Lacase, LiP e MnP; Degradação de HPA; Descoloração de corante têxtil	(BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012).
<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	<i>Amphimedon viridis</i> (esponja)	Produção de Lacase, LiP e MnP; Degradação de HPA; Descoloração e destoxificação do corante Preto Reativo	(BONUGLI-SANTOS et al., 2010; MAGRINI, 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2016).).
Isolado LAMAI 659	Sedimento Marinho	5 Produção de Lacase	(PAIVA, 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707	Petróleo altamente degradado	Degradação de fenantreno Produção de EPS	(DELLAGNEZZE et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2011)
<i>Dietzia maris</i> CBMAI 705	Petróleo altamente degradado	Degradação de <i>n</i> -octadecano e de fenantreno + <i>n</i> -octadecano	(DELLAGNEZZE et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2011)

2.2.1.2. Fungos ligninolíticos

Fungos que degradam a molécula de lignina (presente na madeira), são chamados de fungos ligninolíticos. Estes fungos não utilizam a lignina como única fonte de carbono e nitrogênio. A degradação da lignina é geralmente feita pelo metabolismo secundário do fungo, quando o mesmo se encontra em condições adversas de falta de nutrientes. Levando

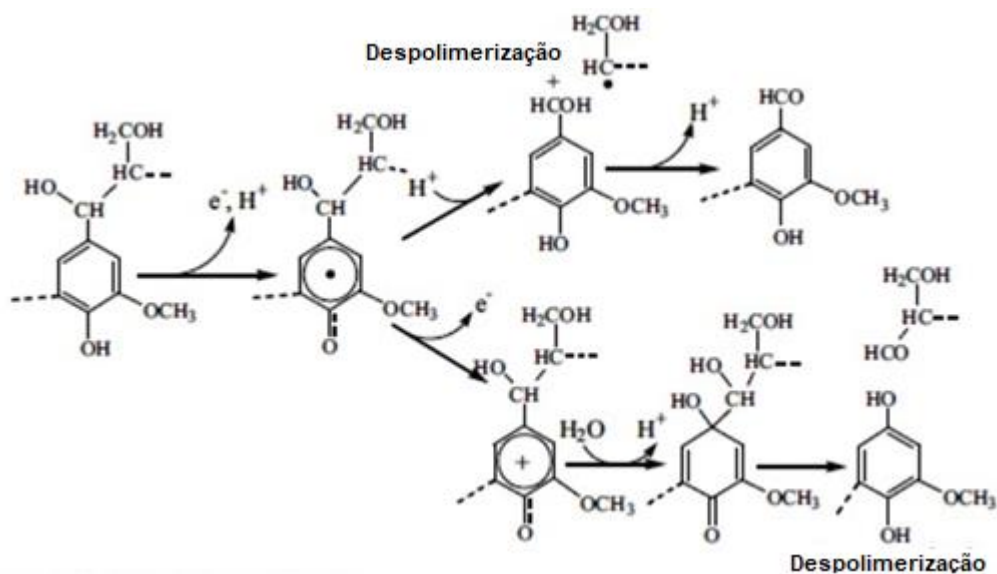
em conta que a molécula de lignina é uma estrutura orgânica complexa, com vários anéis aromáticos e de difícil degradação, um conjunto de enzimas precisa ser secretada para a sua degradação. Os fungos basidiomicetos conhecidos como de podridão branca são considerados os degradadores mais eficientes da madeira, tendo desenvolvido mecanismos não específicos para degradar a lignina (BAZANELLA et al., 2014). Considerando o fato de que a estrutura química dos corantes têxteis é semelhante à da lignina, os fungos ligninolíticos têm sido utilizados na oxidação desses corantes (MOREIRA-NETO et al., 2013; DHARAJIYA; SHAH; BAJPAI, 2016; KURADE et al., 2017).

As principais enzimas responsáveis pela degradação da lignina são a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP) e as lacases (SÁNCHEZ 2009; KARIGAR; RAO, 2011; BUGG, et al., 2011; BONUGLI-SANTOS et al., 2015), as quais geram quinonas que após a fissão do anel aromático são metabolizadas a CO_2 e H_2O (CERNIGLIA, 1997; TUOMELA et al., 2000).

As enzimas manganês peroxidase [EC 1.11.1.13] e lignina peroxidase [EC 1.11.1.14] pertencem à família das oxidoreduases. Elas reduzem o oxigênio dissolvido em peróxido de hidrogênio com a simultânea oxidação de grupos hidroxil de substratos específicos da carbonila. Catalisam, assim, várias oxidações das cadeias de lignina e de outros compostos (SHARMA et al., 2007). Nos radicais fenólicos, os elétrons são absorvidos por um mediador redox ou pela enzima ligninolítica (Figuras 4 e 5).

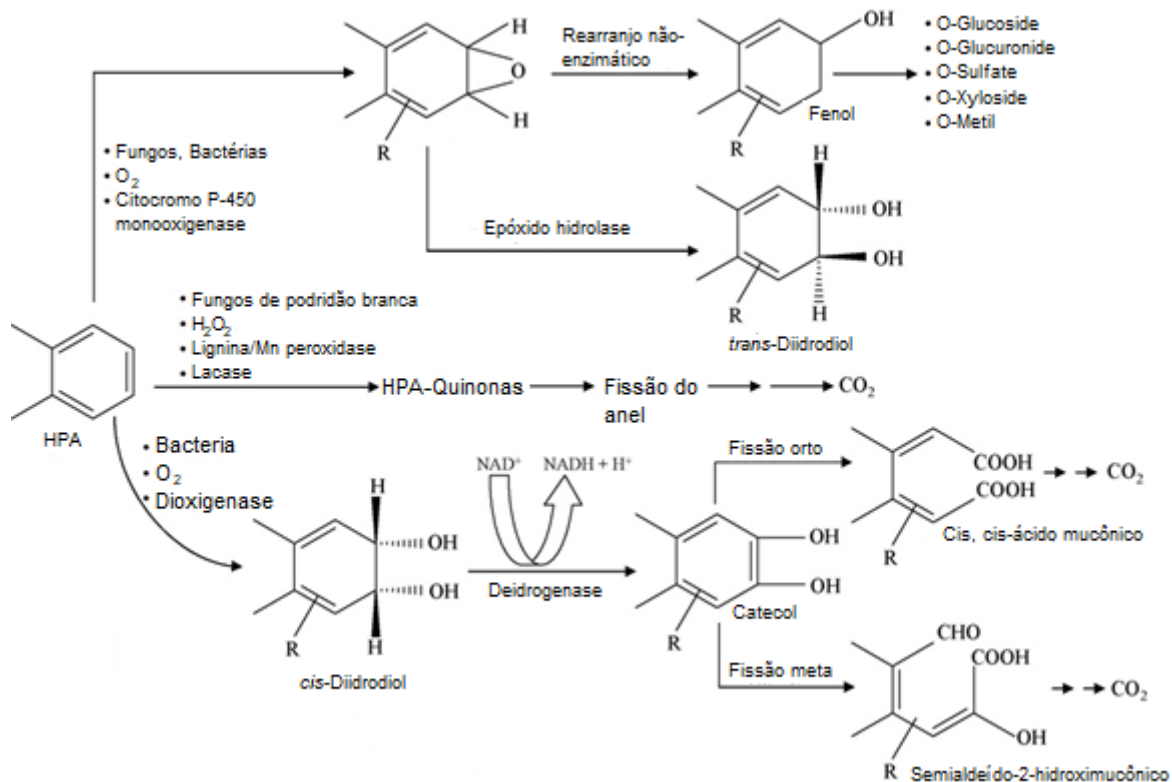
As lacases (benzenediol: oxigênio oxi-redutase) [EC 1.10.3.2] são glicoproteínas pertencentes ao grupo de enzimas multicobre oxidases, contendo em sua estrutura quatro átomos de cobre. Estas enzimas oxidam um grande número de reações de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (SHARMA et al., 2007), reduzindo oxigênio à água, sem necessidade de coenzima (Figura 5) (LEONOWICZ, et al., 2001; DURÁN et al., 2002).

Figura 4. Oxidação de estruturas fenólicas por um mediador redox. Fonte: Traduzido de Teerii; Henriksson (2009).



Outra via metabólica conhecida para degradação de poluentes orgânicos presente em fungos envolve a hidroxilação do composto pela enzima citocromo P-450 mono-oxigenase, mediante uma sequência de reações que é semelhante às que estão envolvidas no metabolismo de mamíferos (CAPOTORTI et al., 2004; HARITASH; KAUSHIK, 2009). Esta via é também utilizada por fungos não-ligninolíticos (Figura 5).

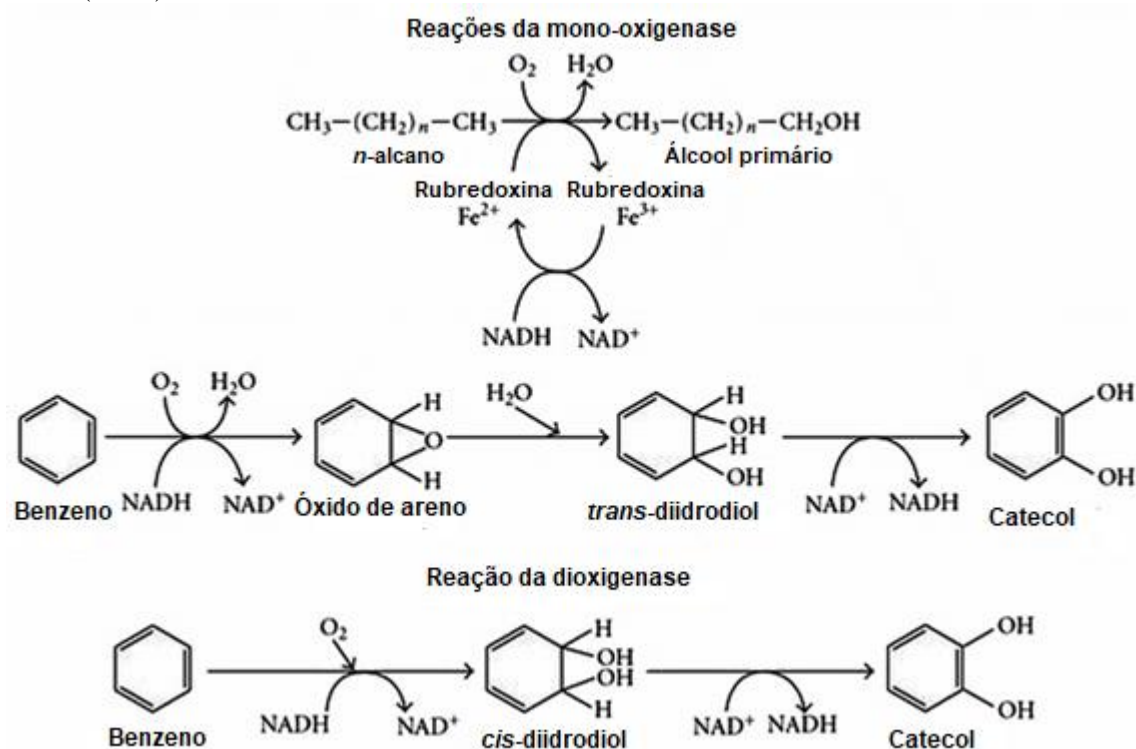
Figura 5. Catabolismo microbiano de hidrocarbonetos envolvendo as enzimas citocromo P-450 monooxigenase, lacase, LiP e MnP. Fonte: Modificado e traduzido de Haritash, Kaushik (2009).



2.2.1.3. Bactérias degradadoras

As bactérias utilizam oxigenases para a degradação aeróbica de poluentes ambientais (compostos orgânicos), por meio da adição de oxigênio molecular ao substrato. As dioxigenases catalisam a adição de dois grupos hidroxil, enquanto as mono-oxigenases catalisam a introdução de um átomo de oxigênio na molécula (Figura 6). Esse mecanismo resulta na formação de diidrodiol, o qual será desidrogenado, formando outros compostos intermediários que poderão ser metabolizados até CO_2 e H_2O (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; HARITASH; KAUSHIK, 2009; FUENTES et al., 2014).

Figura 6. Degradação de benzeno via monooxigenase e dioxigenase. Fonte: Traduzido de El Mahdi, Aziz (2017).



2.3. Análise de toxicidade

A eficácia da biodegradação é frequentemente determinada em termos da diminuição da concentração do contaminante. Entretanto, a redução dos níveis do poluente muitas vezes não está diretamente relacionada com a diminuição da atividade biológica (toxicidade). Em muitos casos, a transformação biológica do poluente resulta na formação de metabólitos intermediários que podem ser mais tóxicos do que o composto original, mesmo que se apresentem em pequenas concentrações (BOOPATHY, 2000; VIEIRA, 2016). Desta forma, a determinação da redução da toxicidade deve ser realizada.

Neste contexto, é recomendado que se realizem análises de toxicidade em organismos de diversos níveis tróficos, tais como bactérias, microcrustáceos, algas e plantas (MOLNÁR; GRUIZ; HALÁSZ, 2007; GIROTTI et al., 2008).

2.3.1. *Artemia* sp.

O microcrustáceo do gênero *Artemia* sp. pode ser encontrado em vários corpos d'água, servindo de alimento para peixes (BUSTOS-OBREGON; VARGAS, 2010). Como são animais filtradores e aquáticos, estão altamente expostos ao ambiente onde estão, e podem ser

sensíveis aos poluentes. Portanto, se há contaminação no meio onde estão, esses organismos podem proporcionar respostas toxicológicas rápidas. Além disso, possuem a vantagem do baixo custo e a não necessidade de equipamentos especiais (ALMEIDA; CORSO, 2014).

Estudos previamente realizados utilizaram com sucesso *Artemia* sp. como bioindicador de toxicidade de corante têxtil e outros poluentes (ALMEIDA, 2013; LEME et al., 2015; MORAES; BIDOIA, 2015; DUARTE, 2016; VIEIRA, 2016).

2.3.2. *Aliivibrio fischeri* – Microtox®

A bactéria bioluminescente *A. fischeri* tem sido utilizada como bioindicador em diversos trabalhos científicos, demonstrando a mudança na toxicidade de corantes têxteis após os tratamentos utilizados, sejam eles físicos, químicos ou biológicos (LEME et al., 2015; VIEIRA, 2016; PAŹDZIOR et al., 2017; GIOIA et al. 2018). Utilizando o luminômetro Microtox®, os testes são rápidos, possuem alta sensibilidade, reprodutibilidade, além do fato de demandarem um pequeno volume de amostra para serem feitos.

2.3.3. *Cucumis sativus*

A dicotiledônea *C. sativus*, popularmente conhecida como pepino-caipira e outras plantas superiores são reconhecidas como importantes indicadoras ambientais. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – *United States Environmental Protection Agency*), por exemplo, já validou e indica o uso de vegetais em testes de toxicidade (USEPA, 1985). Os testes consistem, geralmente, em colocar as sementes em contato com os poluentes antes e após o tratamento, até que as medidas de porcentagem de germinação, crescimento radicular e do hipocótilo sejam medidas. Pela comparação entre essas medidas é possível analisar se a toxicidade aumentou, diminuiu ou permaneceu a mesma.

As sementes de *C. sativus* já foram utilizadas em diversos trabalhos para a análise de toxicidade de corantes têxteis (BEDOUI et al., 2015; MORAES; BIDOIA, 2015; OLIVEIRA et al. 2018), tendo demonstrado resultados confiáveis.

2.4. Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma abordagem estatística e tem se mostrado ser uma ferramenta útil na otimização de bioprocessos (SHUIB et al., 2016; HASHEM et al., 2018). Isto porque é possível avaliar diversas variáveis independentes, diminuindo consideravelmente o número de ensaios a serem feitos, além da grande economia de custos e tempo que o maior número de ensaios geraria (DENIZ, 2014). Utilizando variáveis como as

fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e a concentração de corantes, é possível atingir resultados que apontem para maior descoloração e destoxificação em bioensaios.

No estudo de Hashem et al. (2018) foi possível otimizar as condições de cultivo para a descoloração do corante azo *Remazol black B* pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* KY284155. Utilizando o planejamento Plackett–Burman, 100% de descoloração foi atingida em 32 h. No ensaio que teve a maior descoloração o meio de cultivo otimizado foi composto por 4 g K_2HPO_4 ; 4 g KH_2PO_4 ; 2 g $(NH_4)_2SO_4$; 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g $CaCl_2$; 0,5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g L^{-1} de glicose e 8 g L^{-1} de extrato de malte no pH 5 e temperatura de 37 °C.

Baseado no desenho experimental utilizando Plackett-Burman, Shuib et al. (2016) conseguiram analisar onze variáveis na biodegradação do corante têxtil RBBR (*Remazol Brilliant Blue R*). Os resultados revelaram que quatro dessas variáveis (concentração de corante, extrato de malte, inóculo e tempo de incubação) foram os fatores mais efetivos na biodegradação. Mostrando assim, a eficiência e rapidez na seleção de variáveis com a mínima quantidade de ensaios. No estudo de Vieira (2016), utilizando o mesmo corante, foi utilizado o planejamento experimental para otimizar a biorremediação por consórcio microbiano, o qual permitiu que se chegasse a uma condição de cultivo de baixo custo e similar às condições reais dos efluentes têxteis. Em adição, Bonugli-Santos et al. (2016) obtiveram sucesso na descoloração e destoxificação do corante Preto Reativo 5 pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, de origem marinha, utilizando o planejamento experimental.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial dos fungos *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Tinctosporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e LAMAI 659 e das bactérias *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Dietzia maris* CBMAI 705 na destoxificação e descoloração de efluente têxtil sintético, bem como conhecer a influência de diferentes fatores visando otimização do bioprocesso.

Objetivos específicos:

- Preparar um efluente têxtil sintético utilizando corantes e substâncias que simulem um efluente proveniente da indústria têxtil.
- Selecionar o fungo com maior capacidade de destoxificar o efluente sintético.
- Avaliar a destoxificação do efluente sintético, utilizando o fungo com o melhor desempenho de destoxificação em consórcio com as bactérias *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Dietzia maris* CBMAI 705.
- Otimizar o processo de destoxificação/descoloração do efluente têxtil sintético por meio de desenho experimental, avaliando a influência de diferentes fatores.
- Validar os ensaios com os melhores resultados do desenho experimental e avalia-los utilizando a técnica de FTIR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Os fungos basidiomicetos de origem marinha utilizados neste trabalho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Tinctosporellus* sp. CBMAI 1061 foram isolados das esponjas marinhas *Amphimedon viridis* (dois primeiros) e *Dragmacidon reticulatum* (terceiro) coletadas no litoral norte do Estado de São Paulo (MENEZES et al., 2010) e foram identificados por Bonugli-Santos e colaboradores (2010). O fungo LAMAI 659 foi isolado de sedimento marinho em Alcatrazes (litoral norte do Estado de São Paulo). A identificação deste isolado ainda não foi concluída. Entretanto, análises taxonômicas preliminares indicam ser este um representante do grupo dos ascomicetos. Todos os fungos estudados estão preservados por dois métodos distintos (criopreservação e Castellani) na coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) do Instituto de Biociências da UNESP campus Rio Claro, a qual é parte da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas e identificadas pelo grupo de pesquisa da Dra. Valéria Maia de Oliveira do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). *B. subtilis* CBMAI 707 e *D. maris* CBMAI 705 foram isoladas de reservatórios de petróleo na Bacia de Campos, Rio de Janeiro (VASCONCELLOS et al., 2011; DELLAGNEZZE et al., 2014). Ambas bactérias fazem parte do acervo da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP.

4.2. Cultivo dos fungos e estruturação do experimento para determinação da concentração do Efluente Têxtil Sintético (ETS)

Os fungos *Peniophora* sp. e o isolado LAMAI 659 foram cultivados em placas de Petri contendo ágar malte (extrato de malte 2% e ágar 2%) durante 7 dias. Após esse período, três cilindros (0,5 cm de diâmetro) de cada fungo, separadamente, foram transferidos para tubos de fundo cônico de 50 mL contendo 10 mL de extrato de malte 1,5%. Os fungos foram cultivados por 48 horas a 28 °C, sob agitação de 140 rpm (pré-inóculo). A massa fúngica filtrada foi adicionada a frascos Erlenmeyers contendo 50 mL do ETS preparado com diferentes concentrações de corantes (Tabela 2) e outros compostos: 30 g L⁻¹ de NaCl (SAROJ et al., 2015); 3 mg L⁻¹ de extrato de malte e NaOH para ajuste do pH para 8,0 (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Os corantes foram cedidos pela empresa TEXPAL

QUÍMICA (Valinhos, SP) e foram escolhidos por serem amplamente utilizados pelas indústrias têxteis nacionais e devido à recalcitrância dos mesmos.

Tabela 2. Efluentes Têxteis Sintéticos (ETS) preparados com diferentes concentrações de corantes. Fonte: Elaborado pela autora.

Corante	Azul Índigo	Marinho Reativo	Preto Sulfuroso
ETS A	50 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹
ETS B	100 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
ETS C	200 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹

A solução do corante Marinho Reativo foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm. Entretanto, os outros dois corantes ficaram retidos no filtro e essa técnica de esterilização não pôde ser utilizada. A solução de Preto Sulfuroso, por apresentar pH 12 e impossibilitar o crescimento de micro-organismos (fato verificado em placas com meio de cultura) não foi esterilizada. A solução de Azul Índigo foi apenas passada por filtro comum. Os demais componentes dos efluentes foram autoclavados por 20 min a 120 °C e 1 atm. Nos experimentos utilizando o consórcio microbiano (três estratégias diferentes) e no planejamento experimental a solução do corante Azul Índigo foi autoclavada (20 min, 120 °C e 1 atm) e seu perfil na UV-Vis foi verificado antes e após autoclavação, não apresentando alterações.

Os fungos foram testados com os três efluentes, em três réplicas, e foram mantidos em incubadoras de agitação durante 7 dias a 140 rpm e 28 °C na ausência de luz. Como controles negativos foram utilizados os ETS A, B e C (separadamente) na ausência dos fungos. Como controles positivos foram utilizados meio de cultivo (malte) sem adição dos corantes.

4.2.1. Biomassa seca

Foram medidas as massas de tubos de fundo cônico, previamente secos em estufa a 105 °C por 18 h. Os cultivos dos diferentes experimentos foram centrifugados por 15 min a 10.000 rpm e 4 °C nos tubos previamente secos. O sobrenadante foi reservado para as outras análises e a massa fúngica foi seca em estufa a 105 °C por 18 h. A massa seca (tubo e micélio secos) foi novamente medida. A biomassa seca foi determinada pela diferença entre a massa final (tubo e fungos secos) e a massa inicial do tubo seco. Nos controles contendo apenas o efluente foi feito o mesmo procedimento, pois houve formação de um precipitado após a centrifugação. Sendo assim, a massa desse precipitado foi descontada de cada bioensaio.

4.2.2. Teste de toxicidade com *Artemia* sp.

Os ovos de *Artemia* sp. foram colocados em aquário contendo 800 mL de água do mar artificial (ASW), contendo em g L⁻¹ de água destilada: MgCl₂.6H₂O (10,83), CaCl₂.2H₂O (1,51), SrCl₂.6H₂O (0,022), NaCl (23,93), Na₂SO₄ (4,01), KCl (0,68), NaHCO₃ (0,20), KBr (0,1), H₃BO₃ (0,03) (KESTER et al., 1967). O aquário foi recoberto com papel pardo para evitar a entrada de luz e deixado com um lado exposto sob luz artificial por 48 h. Após esse período, as larvas eclodidas foram utilizadas nos ensaios de toxicidade da seguinte maneira: 30 larvas foram colocadas em contato com 10 mL de amostra (após o bioensaio) e com o ETS não tratado. Controles contendo apenas água do mar artificial, na ausência dos efluentes sintéticos, também foram testados. Após 24 h, foi verificada a porcentagem de larvas sobreviventes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3. Determinação do fungo com melhor capacidade de destoxificação

Foi estruturado um experimento a fim de selecionar o melhor fungo destoxicador do ETS. Para isso, os fungos associados ao ambiente marinho: *Peniophora* sp., *Marasmiellus* sp., isolado LAMAI 659 e *Tinctosporellus* sp. foram utilizados. O pré-inóculo de cada fungo foi preparado como descrito no experimento anterior, bem como o ETS, porém para esta etapa a concentração utilizada foi de 200 mg L⁻¹ de cada corante (item 4.2). Os fungos foram inoculados separadamente em frascos Erlenmeyer com 50 mL do ETS preparado e permaneceram sob agitação de 140 rpm a 28 °C por 7 dias. Passado este período, foram realizadas as análises de biomassa seca (assim como no item 4.2.1) e toxicidade aguda utilizando o equipamento Microtox® (item 4.3.1).

4.3.1. Teste de toxicidade com *A. fischeri*

A toxicidade foi analisada utilizando o equipamento Microtox®. A técnica consiste na exposição da bactéria bioluminescente *A. fischeri* a uma amostra, a qual acusa a toxicidade de acordo com a quantidade de luz emitida pela bactéria. Com o auxílio do equipamento Microtox® é possível detectar a concentração efetiva (EC₅₀) que diminui em 50% a quantidade de luz emitida pela bactéria. Para tanto, foi feita uma suspensão inicial da bactéria liofilizada em tampão de reativação (10⁸ células mL⁻¹). Posteriormente, foi feita uma primeira diluição da bactéria, sendo 150 µL transferidos para 1.500 µL de NaCl 2%. A partir dessa diluição, 100 µL foram transferidos para cubetas e verificados a luminescência da bactéria (T0). Um volume de 2.500 µL da amostra em diferentes concentrações foi misturada com 250 µL de NaCl 22 %, e a mistura foi utilizada para a confecção de diluições seriadas (1:1). Para o

controle foi utilizado NaCl 2 %. As diluições (900 µL) foram transferidas para as cubetas contendo 100 µL de bactéria. A leitura em luminômetro foi realizada em tempos de 5, 15 e 30 min. Os resultados da leitura da luminescência da bactéria *A. fischeri* foram avaliados em programa específico do equipamento Microtox®, onde foram gerados dados de dose-resposta e determinado o EC₅₀.

4.3.2. Atividade das enzimas ligninolíticas frente ao ETS

Após o período de 7 dias, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi utilizado (caldo enzimático) para a determinação das atividades das enzimas ligninolíticas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, de acordo com os protocolos abaixo descritos.

Lignina Peroxidase (LiP): A atividade da LiP foi avaliada por espectrofotometria UV/Vis a partir do aldeído veratrílico produzido ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na oxidação do álcool veratrílico, usado como substrato. A mistura foi composta de 0,8 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0; 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,5 mL do caldo enzimático. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm, após 10 min de reação (ARORA; GILL, 2001).

Manganês Peroxidase (MnP): Esta atividade foi quantificada pelo método modificado de Wariishi, Valli e Gold (1992) com a adição de 50 µL de H₂O₂ (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 mM; pH 4,5), 50 µL de MnSO₄ (10 mM), e 0,1 mL de caldo enzimático. A formação do complexo Mn⁺³-malonato foi acompanhada a 270 nm ($\epsilon = 11590\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), após 5 min de reação.

Lacase: A atividade enzimática de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS): a mistura foi composta de 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,1 mL de solução de ABTS ($\epsilon = 36000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 0,03 % e 0,6 mL do caldo enzimático (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm, após 10 min de incubação a 37 °C.

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U L⁻¹ do caldo

enzimático e os cálculos realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Beer-Lambert:

$U L^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t$, onde:

ΔA Diferença entre a absorbância final e a inicial

V Volume da reação (0,001 L em todos os casos)

10^6 Converte os mols de ϵ para μmols

ϵ Coeficiente de extinção ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

R Quantidade de caldo enzimático (L)

T Tempo de reação (min)

4.4. Destoxificação utilizando consórcios microbianos

Após ter sido selecionado o fungo com o melhor resultado de destoxificação, foi feito um novo experimento utilizando as bactérias *B. subtilis* e *D. maris*. As bactérias foram mantidas em placas de Petri contendo Agar Nutriente (peptona 5 g L⁻¹, extrato de carne 3 g L⁻¹ e Agar 15 g L⁻¹). Após dois dias de crescimento foi preparado o pré-inóculo utilizando uma alçada de bactérias em 15 mL de meio nutriente líquido, o qual foi colocado sob agitação de 140 rpm a 28 °C por 2 dias. O experimento consistiu em adicionar 0,4 mL de cada bactéria, lavada em solução de NaCl 0,9%, na absorbância de 0,4 (leitura no comprimento de onda de 600 nm) no ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante), preparado como mencionado no item 4.2. Após dois dias, foi adicionado o fungo com o melhor resultado de destoxificação, o qual permaneceu por 7 dias sob agitação de 140 rpm a 28 °C e ausência de luz. Ao término do experimento foram feitas as análises de biomassa seca (conforme item 4.2.1) e de toxicidade aguda utilizando o equipamento Microtox®, da mesma forma relatada no item 4.3.1.

4.5. Destoxificação e descoloração utilizando consórcios microbianos em duas estratégias diferentes

Com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores foi feito outro experimento utilizando duas estratégias diferentes. A primeira estratégia consistiu em utilizar as duas bactérias juntas ou separadas por dois dias e posteriormente colocar o fungo por 7 dias (como feito no experimento anterior). Na segunda estratégia o fungo foi colocado por 7 dias e depois as bactérias foram acrescentadas juntas ou separadas por mais dois dias. Ambos os experimentos totalizaram nove dias com os micro-organismos em contato com o efluente. O ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizado neste experimento foi preparado conforme o item

4.2. Além disso, foi testado apenas o fungo selecionado, sem as bactérias, e controles contendo apenas o ETS. A biomassa seca das amostras foi determinada (de acordo com o item 4.2.1) e diferentemente dos outros experimentos, a destoxificação foi avaliada utilizando sementes de *C. sativus*.

4.5.1. Teste de toxicidade com *C. sativus*

O teste utilizando *C. sativus* foi conduzido em placas de Petri baseado no estudo de Wang et al. (2001), com modificações. Foram colocadas em papel filtro 15 sementes sem agrotóxicos e 5 mL do efluente de cada bioensaio diluído em água (25% de cada amostra). Após o preparo, as placas foram envoltas individualmente por filme plástico para evitar a evaporação de água, e acondicionadas em BOD a 24 °C ao abrigo de luz, por 5 dias. O controle negativo foi composto por solução de ZnSO₄ 0,05 M e o controle positivo por água destilada. Ao final do período de exposição foram tomadas as medidas da raiz, onde foram consideradas as sementes que apresentaram crescimento maior ou igual a 5 mm. O cálculo de inibição de crescimento radicular foi realizado utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{média do controle positivo} - \text{média do bioensaio}}{\text{média do controle positivo}} \times 100$$

4.5.2. Descoloração do ETS

A descoloração de cada bioensaio foi avaliada de acordo com Bonugli-Santos, Durrant e Sette (2012). Para isso, após a centrifugação, os sobrenadantes foram diluídos em água destilada na proporção 1:10 e as absorvâncias medidas em amplo espectro (190 nm a 1100 nm). Tanto para o controle, contendo o ETS, quanto para os sobrenadantes dos tratamentos. O percentual de descoloração foi avaliado no comprimento de onda 589 nm, onde há o pico de absorvância máxima do efluente preparado, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{\text{Absorvância inicial} - \text{Absorvância final}}{\text{Absorvância inicial}} \times 100$$

4.5.3. Adsorção do ETS pela biomassa

Os fungos foram cultivados conforme item 4.2 e as bactérias conforme item 4.4. Ao final de dois dias de pré-inóculo os micro-organismos foram autoclavados, separadamente,

por 45 min, 120 °C e 1 atm para inativação fúngica e enzimática. Após a adição do ETS, o experimento foi conduzido da mesma forma como descrito no item 4.5. Os cultivos foram centrifugados, o sobrenadante diluído na proporção 1:10 e as absorbâncias medidas em amplo espectro (190 nm a 1100 nm), tanto para o controle, contendo o ETS, quanto para os fungos inativados. No pico de absorbância máxima do ETS (589 nm) foi avaliado o percentual de adsorção pela biomassa, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Adsorção (\%)} = \frac{\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância final}}{\text{Absorbância inicial}} \times 100$$

4.6. Otimização da destoxificação e descoloração do ETS

Foram realizados planejamentos experimentais para investigar o efeito de diferentes variáveis no processo de descoloração e destoxificação do ETS, bem como obter as condições necessárias para essa finalidade (condição otimizada). Para isso, foram empregados dois planejamentos do tipo Plackett-Burman (PB) (PLACKETT; BURMAN, 1946) e um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). A capacidade de destoxificação de todos os ensaios dos planejamentos e do DCCR foi avaliada utilizando *C. sativus* como bioindicador, de acordo com o método descrito no item 4.5.1. A descoloração do ETS foi determinada para todos os ensaios de acordo com o item 4.5.2, sendo o controle constituído de água deionizada e corante (nas mesmas concentrações empregadas em cada ensaio). Os ensaios dos planejamentos experimentais não contêm réplicas, exceto os pontos centrais, que foram avaliados em triplicata.

A avaliação do efeito das diferentes variáveis independentes empregadas nos planejamentos experimentais Plackett-Burman, assim como no DCCR frente à destoxificação e descoloração (variáveis dependentes) do ETS foi realizada utilizando o programa STATISTICA 8.0® (STATSOFT, INC. 2007), sendo empregado p-valor < 0,1.

4.6.1. Planejamento experimental Plackett-Burman 1 (PB1)

O primeiro planejamento experimental foi composto por 11 variáveis independentes em uma matriz PB16 (Apêndice A), totalizando 19 ensaios. As variáveis independentes e as suas respectivas concentrações estão apresentadas na Tabela 3. Em todos os ensaios foi utilizado NaCl 30 g L⁻¹ e o pH inicial foi ajustado para 7,0. Pensando na estratégia de bioestimulação, foram utilizadas algumas variáveis de modo que houvesse fontes de carbono (extrato de malte e sacarose), nitrogênio (extrato de levedura e sulfato de amônio) e fósforo

(fosfato de potássio). Foi utilizado carbonato de sódio para mimetizar um efluente têxtil real e também cloreto de cálcio, o qual já foi reportado como indutor para descoloração (DAWKAR et al., 2009). O ETS também foi colocado como variável para que se analisasse novamente a melhor concentração que os micro-organismos atuariam. Os micro-organismos também foram colocados como variáveis a fim de obter as melhores quantidades de inóculo para a destoxificação e descoloração do ETS.

Tabela 3. Variáveis utilizadas no planejamento experimental 1 (PB16) e as concentrações de cada uma. Fonte: Elaborado pela autora.

Variáveis	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1
1. Inóculo <i>Marasmiellus</i> sp. (cilindros de 0,5cm de diâmetro)	1	3	5
2. Inóculo <i>B. subtilis</i> (UFC mL ⁻¹)	0,5 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷
3. Inóculo <i>D. maris</i> (UFC mL ⁻¹)	0,5 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷
4. Extrato de malte (g L ⁻¹)	0	3	6
5. Sacarose (g L ⁻¹)	0	3	6
6. Extrato de levedura (g L ⁻¹)	0	0,5	1
7. (NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	0	0,5	1
8. KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	0	1	2
9. CaCl ₂ (mM)	0	1	2
10. NaCO ₃ (mM)	0	1	2
11. Concentração de cada corante (mg L ⁻¹)	100	200	300

4.6.2. Planejamento experimental Plackett-Burman 2 (PB2)

Os resultados do PB1 foram tomados como base para a estruturação do segundo planejamento experimental, no qual nove variáveis independentes (Tabela 4) foram utilizadas em uma matriz PB12 (Apêndice B). Em todos os ensaios foi utilizado o ETS na concentração de 200 mg L⁻¹ (de cada corante), NaCl 30 g L⁻¹ e o pH inicial foi ajustado para 7,0. Os pontos centrais foram em triplicata. As variáveis extrato de levedura e carbonato de sódio não foram mantidos neste planejamento.

Tabela 4. Variáveis utilizadas no planejamento experimental 2 (PB12) e as concentrações de cada uma. Fonte: Elaborado pela autora.

Variáveis	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1
1. Inóculo <i>Marasmiellus</i> sp. (cilindros de 0,5cm de diâmetro)	1	3	5
2. Inóculo <i>B. subtilis</i> (UFC mL ⁻¹)	0,5 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷
3. Inóculo <i>D. maris</i> (UFC mL ⁻¹)	0,5 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷
4. Extrato de malte (g L ⁻¹)	3	6	9
5. Sacarose (g L ⁻¹)	0	3	6
6. (NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	0	1	2
7. KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	0	1,5	3
8. CaCl ₂ (mM)	0	1,5	3

4.6.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após os resultados do PB2 frente à descoloração e destoxificação do ETS, foi estruturado um DCCR considerando duas variáveis independentes: extrato de malte e cloreto de sódio. O DCCR foi composto pelos níveis inferior e superior, o ponto central, bem como os pontos axiais (Apêndice C), os quais estão apresentados na Tabela 5, com suas respectivas concentrações para as variáveis analisadas. Para esse planejamento foram fixadas as seguintes variáveis: ETS na concentração de 200 mg L⁻¹ (de cada corante), 5 cilindros de *Marasmiellus* sp., 1,5 x 10⁷ de *B. subtilis*, 0,5 x 10⁷ de *D. maris*, além dos parâmetros fixos desde o primeiro planejamento: NaCl 30 g L⁻¹ e pH inicial 7,0.

Tabela 5. Níveis das variáveis estudadas no DCCR. Fonte: Elaborado pela autora.

Variáveis	Ponto axial inferior -1,41	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1	Ponto axial superior +1,41
1. Extrato de malte (g L ⁻¹)	4,50	5,67	9,00	12,33	13,50
2. CaCl ₂ (mM)	1,00	1,58	3,00	4,42	5,00

4.7. Validação experimental

4.7.1. Primeira validação

A validação experimental consistiu em repetir os dois ensaios que apresentaram a melhor condição de destoxificação e descoloração do ETS ao longo dos planejamentos realizados, para confirmar a resposta obtida. Além dos bioensaios, foram analisados controles constituídos pelas mesmas condições dos bioensaios, porém sem os micro-organismos. Todas as condições (bioensaio e controles) foram realizadas em quadruplicata. Os experimentos da validação foram cultivados a 28 °C e 140 rpm por 3, 5, 7 e 9 dias em contato com o fungo *Marasmiellus* sp. e mais dois dias finais com as bactérias *B. subtilis* e *D. maris*. A biomassa seca dos experimentos de validação foi determinada conforme descrito no item 4.2.1. O caldo enzimático resultante dos experimentos de validação foi avaliado quanto à descoloração e adsorção pela biomassa (somente dos ensaios de 7 dias), de acordo com os itens 4.5.2 e 4.5.3, respectivamente. A atividade enzimática de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) foi quantificada, segundo os protocolos descritos no item 4.3.2. Quanto à destoxificação, foi feito experimento com as sementes de *C. sativus* (conforme item 4.5.1) e com a bactéria *A. fischeri* (conforme item 4.3.1), sendo que com a bactéria foram avaliados apenas os experimentos dos 7 e 9 dias de cultivo.

4.7.2. Segunda validação

De acordo com os resultados de destoxificação com as sementes de *C. sativus*, obtidos na primeira validação experimental, foi necessário fazer outra validação experimental. Sendo assim, foram escolhidos outros ensaios dos PB1 e PB2 para esta nova validação. Desta vez, foram repetidos três bioensaios avaliando os resultados após 7 dias em contato com o fungo e mais dois dias com as bactérias a 28 °C e 140 rpm. Além disso, foram feitos os controles (sem micro-organismos) e todas as condições avaliadas em quintuplicata, a fim de diminuir o desvio padrão obtido nos experimentos passados. Ao término dos bioensaios foram avaliados a biomassa seca (conforme item 4.2.1), descoloração (conforme item 4.5.2) e atividade enzimática (conforme item 4.3.2). Além disso, a destoxificação, foi avaliada utilizando as sementes de *C. sativus*, de acordo com o item 4.5.1, e foi feito ensaio com a bactéria *A. fischeri* (conforme item 4.3.1). Por fim, o sobrenadante dos bioensaios foi submetido à análise em FTIR, de acordo com o método descrito a seguir.

4.7.3. FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

As análises de FTIR (Shimadzu FTIR-8300) foram realizadas para se obter, qualitativamente, informações sobre a possível degradação do ETS, após o processo de biodegradação pelo consórcio microbiano na validação experimental. Este método é útil para analisar os metabólitos formados nos processos de biodegradação de corantes (ALMEIDA; CORSO, 2014). Assim, para as análises de FTIR, as amostras foram colocadas em estufa a 60 °C por e secas em dessecador por dois dias. O KBr foi macerado em contato com a amostra em uma proporção de 10 mg da amostra: 150 mg de KBr. Essa mistura foi compactada em discos e as análises foram executadas em região média de infravermelho (400–4000 cm^{-1}), com 32 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} .

4.7.4. Análise estatística

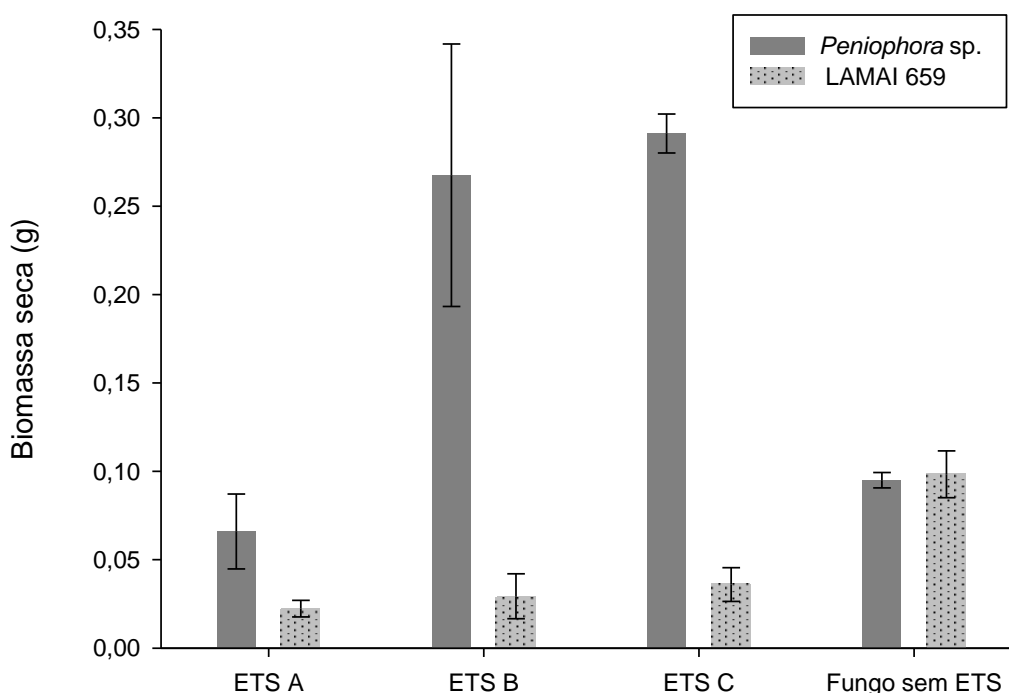
Os resultados da biomassa seca, descoloração e destoxificação (*C. sativus* e *A. fischeri*) das duas validações experimentais foram submetidos a análise estatística utilizando o programa Minitab 17®. A significância das variações foi analisada pela variância simples (*One-way ANOVA*). Só foram considerados os resultados paramétricos para o Teste de Tukey ($p < 0,05$), ou seja, os dados de descoloração da primeira validação e de biomassa seca da segunda validação. Os resultados não paramétricos não foram submetidos ao Teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação da concentração do ETS

Os resultados da biomassa seca do isolado LAMAI 659 e *Peniophora* sp. na presença e ausência dos ETS A, B e C estão apresentados na Figura 7. O bioensaio com o fungo *Peniophora* sp. apresentou maior quantidade de biomassa nos ETS B (0,268 g) e C (0,291 g), quando comparado ao crescimento do fungo sem ETS (0,095 g), ou seja, o controle positivo. Enquanto que, para o isolado LAMAI 659, a resposta foi oposta obtendo maior quantidade de biomassa na ausência de ETS. A diminuição do crescimento do isolado LAMAI 659 pode estar relacionada a toxicidade do efluente.

Figura 7. Medidas de biomassa seca dos bioensaios utilizando o isolado LAMAI 659 e *Peniophora* sp., após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm, na presença e ausência do ETS A (50 mg L⁻¹ de cada corante), ETS B (100 mg L⁻¹ de cada corante) e ETS C (200 mg L⁻¹ de cada corante). Fonte: Elaborado pela autora.



Os resultados da análise de toxicidade em *Artemia* sp. podem ser vistos na Tabela 6. Analisando os ETS antes do bioensaio nota-se que as três concentrações influenciaram negativamente no percentual de sobrevivência. Além disso, é possível notar que quanto maior a concentração do ETS, menor a taxa de sobrevivência (ETS A 78,89%, ETS B 44,33 e ETS C 36,66%). Indicando assim, a toxicidade do efluente para o microcrustáceo nas concentrações testadas. Já nas amostras tratadas com o fungo *Peniophora* sp. pode-se

verificar taxas de sobrevivência maiores, tanto no ETS B quanto no C (61,67% e 80,56%), respectivamente. Esses resultados, analisados concomitantemente aos de biomassa (Figura 7) sugerem que o fungo *Peniophora* sp. pode ter utilizado os corantes como fonte de carbono para o crescimento e duplicação celular, diminuindo assim, a toxicidade no meio.

Analisando o bioensaio do ETS A com o isolado LAMAI 659, não foi observada alteração da toxicidade. Com os outros efluentes, não foi possível avaliar a toxicidade após o bioensaio com o isolado LAMAI 659 devido ao baixo pH. Conforme os resultados apresentados na Tabela 6, em pH abaixo de 4,95 a taxa de sobrevivência do indicador de toxicidade *Artemia* sp. foi de 0%. Provavelmente, os produtos do metabolismo dos fungos tornaram o efluente ácido, impossibilitando a sobrevivência do microcrustáceo.

Tabela 6. Percentual de sobrevivência de *Artemia* sp. e registro do pH dos ETS A (50 mg L⁻¹ de cada corante), ETS B (100 mg L⁻¹ de cada corante) e ETS C (200 mg L⁻¹ de cada corante) antes e após o bioensaio com os isolados LAMAI 659 e *Peniophora* sp. cultivados por 7 dias a 28 °C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.

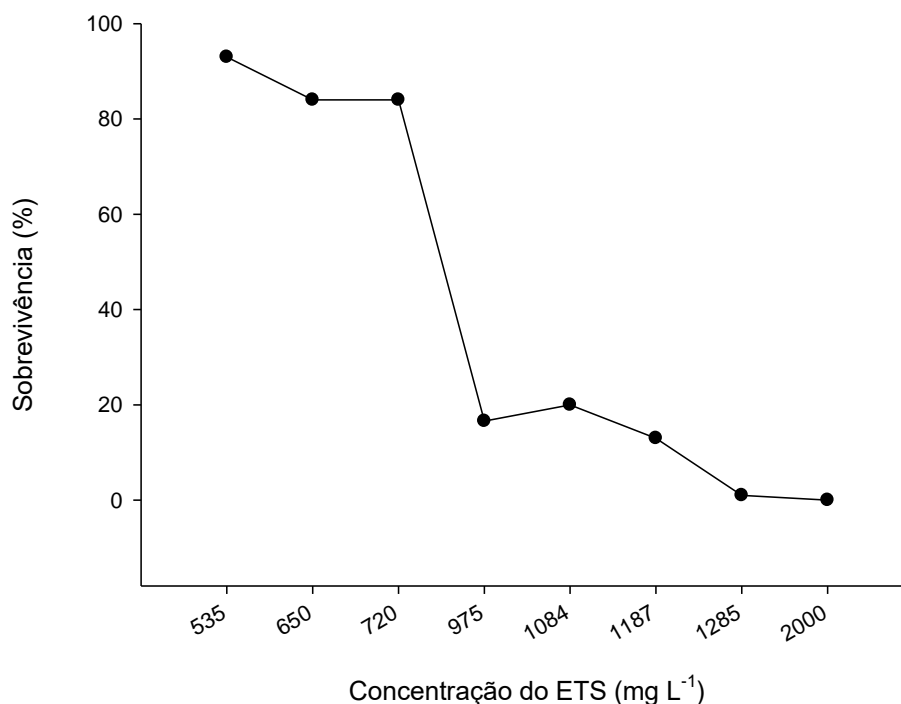
Efluente	Ensaio	Sobrevivência (%)	Desvio padrão	pH
ETS A	ETS antes do bioensaio	78,89	±1,92	6,70
	LAMAI 659	81,11	±16,19	6,23
	<i>Peniophora</i> sp.	0,00	0,00	4,95
ETS B	ETS antes do bioensaio	43,33	±5,77	6,75
	LAMAI 659	0,00	0,00	4,91
	<i>Peniophora</i> sp.	61,67	±16,50	5,27
ETS C	ETS antes do bioensaio	36,66	±3,33	6,50
	LAMAI 659	0,00	0,00	4,77
	<i>Peniophora</i> sp.	80,56	±2,55	5,80
	Controle <i>Artemia</i> sp.	97,78	±3,33	8,00

Considerando o fato de que a *Artemia* sp. apresentou uma porcentagem de sobrevivência de 36,66% mesmo na maior concentração de ETS testada (200 mg L⁻¹ de cada corante), foi feita uma análise de rastreamento utilizando concentrações mais altas do ETS, preparado da mesma forma como já descrito anteriormente, com proporções iguais de cada corante. Como pode ser verificado na Figura 8, as concentrações totais 535 mg L⁻¹, 650 mg L⁻¹

¹ e 720 mg L⁻¹ foram pouco tóxicas para o microcrustáceo. Enquanto que as concentrações 1.285 mg L⁻¹ e 2.000 mg L⁻¹ foram letais para sobrevivência dos mesmos.

Além da concentração do ETS afetar a sobrevivência do bioindicador, o pH também interferiu neste índice. Na Tabela 6 nota-se que no ETS C antes do bioensaio (concentração total de 600 mg L⁻¹ e pH 6,5) a sobrevivência não condiz com o resultado apresentado na Figura 8 para a concentração de 650 mg L⁻¹ e pH 8,0. Esse resultado indica que além da concentração do corante, o pH também afetou diretamente a sobrevivência da *Artemia* sp.

Figura 8. Análise de toxicidade em *Artemia* sp. (percentual de indivíduos vivos) submetida a diferentes concentrações do efluente, com proporções iguais dos corantes. O pH foi ajustado para 8,0 com a utilização de hidróxido de sódio, em todas as amostras. Fonte: Elaborado pela autora.



Considerando a interferência do pH, foi feita a análise de sobrevivência de *Artemia* sp. utilizando água do mar em diferentes pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0). A taxa de sobrevivência em todos os pH analisados foi próxima a 100%. Indicando assim, que é a combinação do ETS com os pH mais baixos que interferem na sobrevivência do microcrustáceo.

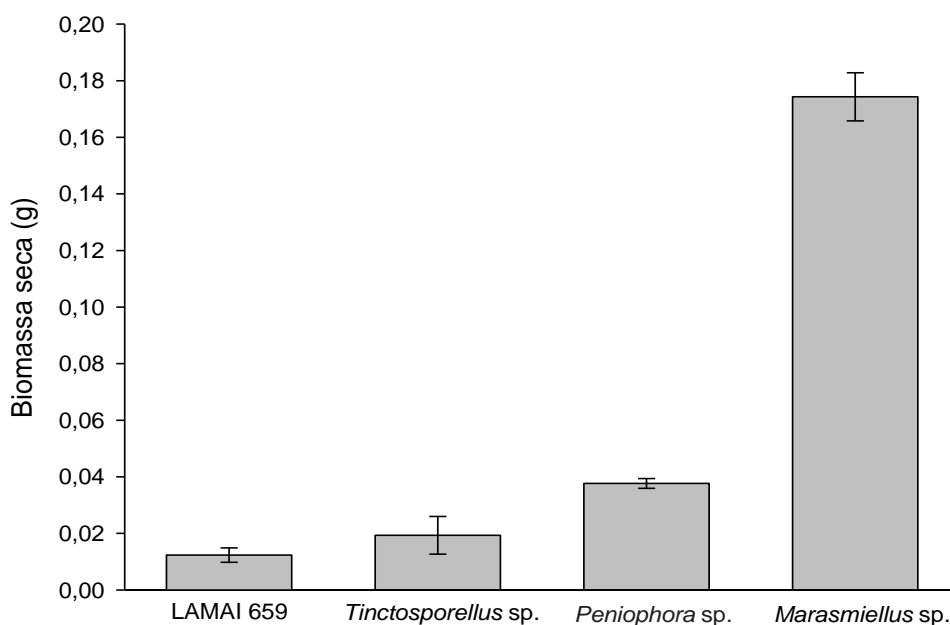
Apesar da interferência do pH, o melhor resultado de destoxificação foi obtido no ETS com a maior concentração de corantes, após o bioensaio utilizando *Peniophora* sp. (Tabela 6). Portanto, considerando a tolerância do fungo *Peniophora* sp. (conforme os resultados de

biomassa seca e toxicidade) a concentração de ETS (200 mg L⁻¹, de cada corante) foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

5.2. Determinação do fungo com melhor capacidade de destoxificação

Os resultados das medidas de biomassa seca do experimento utilizando os fungos LAMAI 659, *Tinctosporellus* sp., *Peniophora* sp. e *Marasmiellus* sp. estão apresentados na Figura 9. Conforme o gráfico, o fungo *Marasmiellus* sp. apresentou a maior quantidade de biomassa (0,174 g).

Figura 9. Medidas de biomassa seca do bioensaio utilizando os fungos LAMAI 659, *Tinctosporellus* sp., *Peniophora* sp. e *Marasmiellus* sp., após 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm, na presença do ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante). Fonte: Elaborado pela autora.



Levando em consideração os resultados anteriores de sensibilidade da *Artemia* sp. às variações de pH, a bactéria *A. fischeri* foi utilizada nesta etapa para a análise da toxicidade aguda. A concentração efetiva, após 30 minutos de exposição, foi maior utilizando o fungo *Marasmiellus* sp. (12,16%) (Tabela 7). Este resultado indica redução da toxicidade do ETS para *A. fischeri* após o bioensaio, já que foi necessária uma concentração maior para inibir a bioluminescência da bactéria em 50%. Enquanto foi preciso uma concentração muito menor (0,31%) do ETS antes do bioensaio para atingir a EC₅₀. Esse resultado corrobora com a maior biomassa observada para este mesmo fungo (Figura 9).

Tabela 7. Concentração efetiva (EC_{50}) de *A. fischeri*, após 30 min de exposição utilizando as amostras contendo ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante), antes e após bioensaio com os fungos LAMAI 659, *Tinctosporellus* sp., *Peniophora* sp. e *Marasmiellus* sp. Fonte: Elaborado pela autora.

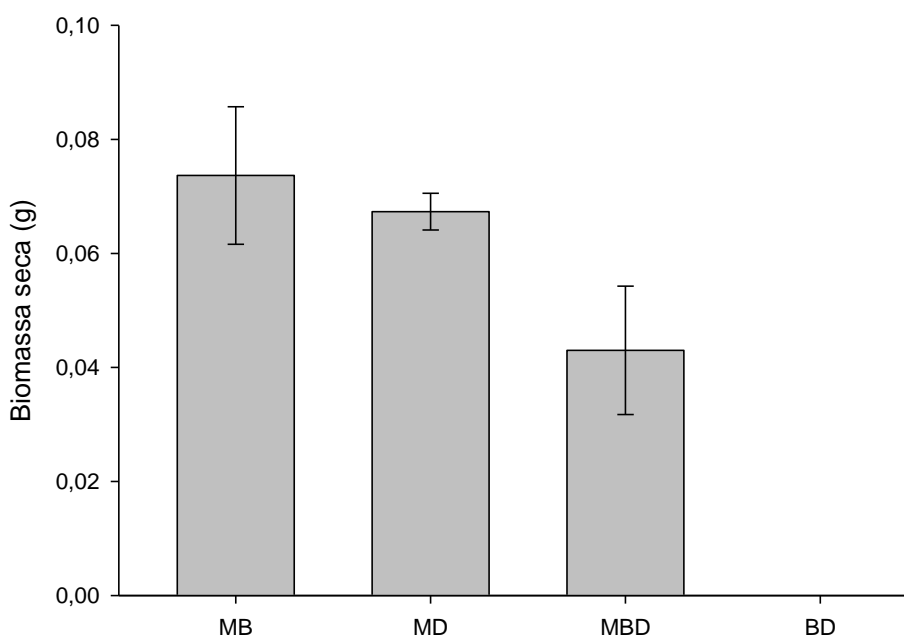
	LAMAI 659	<i>Tinctosporellus</i> sp.	<i>Peniophora</i> sp.	<i>Marasmiellus</i> sp.	ETS antes do bioensaio
EC₅₀ (%)	0,35	0,28	0,34	12,16	0,31
Desvio padrão	±0,12	±0,05	±0,10	±3,49	±0,03

Após o bioensaio com cada um dos quatro fungos foi realizado ensaio enzimático para determinação de lacases nas amostras de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2. Contudo, não foi detectada atividade enzimática em nenhuma amostra utilizando ABTS como substrato.

5.3. Destoxificação utilizando consórcios microbianos

Visto que o fungo *Marasmiellus* sp. apresentou o melhor resultado de destoxificação (Tabela 7) e a maior quantidade de biomassa (Figura 9), ele foi selecionado para formar os consórcios, juntamente com as bactérias *B. subtilis* e *D. maris*. A biomassa seca deste experimento utilizando o fungo *Marasmiellus* sp. e as bactérias *B. subtilis* e *D. maris* está apresentada na Figura 10. Nota-se que as biomassas secas dos consórcios (0,074 g, 0,067 g e 0,043 g) foram menores do que a apresentada no experimento utilizando apenas o fungo *Marasmiellus* sp. (0,174 g, Figura 9). Além disso, no experimento utilizando apenas as duas bactérias não houve crescimento de biomassa, detectada em peso seco.

Figura 10. Medidas de biomassa seca dos bioensaios utilizando consórcios microbianos formados pela(s) bactéria(s) (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) por mais 7 dias, na presença do ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante). Além do experimento contendo apenas as bactérias (9 dias). Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm. (MB) *Marasmiellus* sp. e *B. subtilis*; (MD) *Marasmiellus* sp. e *D. maris*; (MBD) *Marasmiellus* sp., *B. subtilis*. e *D. maris*; (BD) *B. subtilis* e *D. maris*. Fonte: Elaborado pela autora.



Os resultados da toxicidade utilizando a bactéria *A. fischeri* estão apresentados na Tabela 8. É possível notar que o melhor resultado foi na presença do fungo *Marasmiellus* sp. e da bactéria *B. subtilis*, o qual apresentou 6,7% de EC₅₀ comparado a 0,51% do ETS antes do bioensaio.

Tabela 8. Concentração efetiva (EC₅₀), após 30 minutos de exposição, das amostras contendo ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) antes e após bioensaio utilizando a(s) bactéria(s) (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) por mais 7 dias. Além do experimento contendo apenas as bactérias (9 dias). Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.

	EC ₅₀ (%)	Desvio padrão
ETS antes do bioensaio	0,51	±0,36
<i>Marasmiellus</i> sp. e <i>B. subtilis</i>	6,70	±3,13
<i>Marasmiellus</i> sp. e <i>D. maris</i>	2,26	±2,26
<i>Marasmiellus</i> sp., <i>B. subtilis</i> . e <i>D. maris</i>	1,47	±0,37
<i>B. subtilis</i> e <i>D. maris</i>	0,52	±0,03

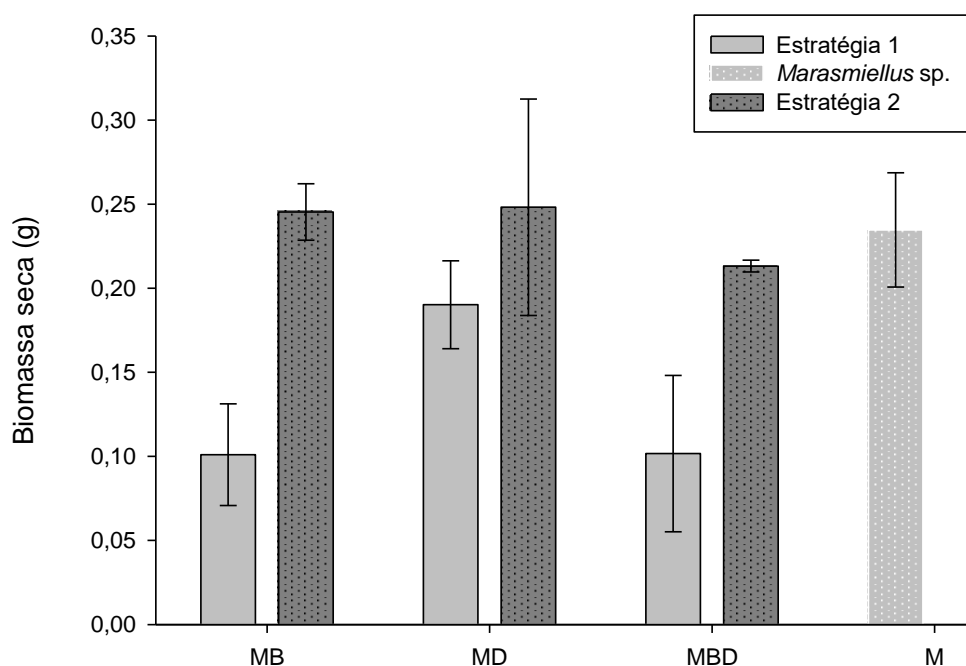
Os resultados referentes aos ensaios enzimáticos para detecção de lacase e manganês peroxidase nas amostras tratadas com os consórcios, indicaram presença de lacase (3 U L^{-1}) apenas no bioensaio contendo *Marasmiellus* sp. e *B. subtilis*.

5.4. Destoxificação e descoloração utilizando consórcios microbianos e duas estratégias diferentes

Pela análise dos dados de biomassa do ETS antes do bioensaio (controle negativo sem micro-organismos) concluiu-se que o ETS estava contaminado por apresentar biomassa que passou de 0,036 g para 0,05 g. Desta forma o experimento (estratégia 1) foi repetido utilizando o ETS esterilizado. Em adição, foi utilizada a estratégia de inocular o fungo antes das bactérias para verificar se a interação entre os micro-organismos seria diferente e consequentemente, os resultados também (estratégia 2).

Os resultados das medidas de biomassa seca (utilizando as duas estratégias diferentes) estão apresentados na Figura 11. Primeiramente, é possível notar que houve maior crescimento da biomassa de todos os consórcios utilizados na estratégia 1 comparado ao experimento anterior (Figura 10). Isto foi provavelmente devido ao fato do ETS não apresentar contaminação. Além disso, todas as amostras utilizando o fungo primeiramente (estratégia 2) apresentaram biomassa seca maior em comparação com a outra estratégia, onde a(s) bactéria(s) foi(foram) primeiramente inoculada(s) no efluente sintético (estratégia 1). Provavelmente, houve inibição do fungo pelas bactérias, as quais estavam em maior quantidade após dois dias em contato com o ETS.

Figura 11. Medidas de biomassa seca após bioensaio com ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizando consórcios microbianos em duas estratégias diferentes. Além do bioensaio utilizando apenas *Marasmiellus* sp. após 9 dias de cultivo de cultivo a 28°C e 140 rpm. Estratégia 1: Bactéria(s) cultivada(s) por 2 dias e fungo por mais 7 dias; Estratégia 2: Fungo cultivado por 7 dias e adição da(s) bactéria(s) por mais 2 dias; (MB) *Marasmiellus* sp. e *B. subtilis*; (MD) *Marasmiellus* sp. e *D. maris*; (MBD) *Marasmiellus* sp., *B. subtilis*. e *D. maris*; (M) *Marasmiellus* sp. Fonte: Elaborado pela autora.



Nesta etapa foram utilizadas as sementes de *C. sativus* como bioindicador de toxicidade, a fim de baratear o custo dos experimentos. Levando em conta que os materiais para utilização do equipamento Microtox® são onerosos, optou-se por utiliza-lo nas etapas finais do trabalho.

Nesta etapa, foi determinada a porcentagem de descoloração desconsiderando a adsorção dos corantes do ETS pelo micélio do fungo (Tabela 9). O resultado mais relevante de descoloração menos a adsorção (30,32%) foi observado no experimento utilizando o fungo inicialmente e as duas bactérias posteriormente (estratégia 2). Sendo que a adsorção correspondeu a 10,90% e a descoloração com os micro-organismos ativos foi de 41,22%.

Quanto ao experimento de destoxificação, os resultados mais relevantes foram vistos nos ensaios utilizando *B. subtilis* inicialmente (71,05%), *B. subtilis* e *D. maris* inicialmente (70,74%) e *B. subtilis*. e *D. maris* após 7 dias com o fungo (72,49%) (Tabela 9). Esses resultados indicam que os três micro-organismos atuam no processo de descoloração e destoxificação do ETS.

Tabela 9. Descoloração e destoxificação (inibição do crescimento das sementes de *C. sativus*) do ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizando consórcios microbianos e duas estratégias diferentes. Além do controle contendo o ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) antes do bioensaio e do bioensaio utilizando apenas *Marasmiellus* sp. após 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Estratégia 1: Bactéria(s) cultivada(s) por 2 dias e fungo por mais 7 dias; Estratégia 2: Fungo cultivado por 7 dias e adição da(s) bactéria(s) por mais 2 dias. Fonte: Elaborado pela autora.

	Descoloração (%)	Desvio padrão	Inibição de crescimento de <i>C. sativus</i> (%)	Desvio padrão
ETS antes do bioensaio	-	-	84,40	±2,20
Estratégia 1:				
<i>Marasmiellus</i> sp. e <i>B. subtilis</i>	11,43	±2,69	71,05	±2,96
<i>Marasmiellus</i> sp. e <i>D. maris</i>	6,51	±4,40	81,28	±2,53
<i>Marasmiellus</i> sp., <i>B. subtilis.</i> e <i>D. maris</i>	25,83	±9,17	70,74	±1,98
Estratégia 2:				
<i>Marasmiellus</i> sp. e <i>B. subtilis</i>	24,92	±3,34	76,33	±2,78
<i>Marasmiellus</i> sp. e <i>D. maris</i>	24,96	±0,85	80,63	±2,54
<i>Marasmiellus</i> sp., <i>B. subtilis.</i> e <i>D. maris</i>	30,32	±1,56	72,49	±3,54
<i>Marasmiellus</i> sp.	27,59	±2,54	80,05	±2,26

5.5. Otimização da destoxificação e descoloração do ETS

5.5.1. Planejamento experimental Plackett-Burman 1 (PB1)

A partir dos resultados do experimento anterior, a estratégia 2 (fungo cultivado inicialmente e as bactérias posteriormente) foi selecionada para otimização da descoloração e destoxificação utilizando o planejamento experimental visando investigar o efeito de diferentes variáveis nos processos. Os resultados dos diferentes bioensaios estão apresentados na Tabela 10.

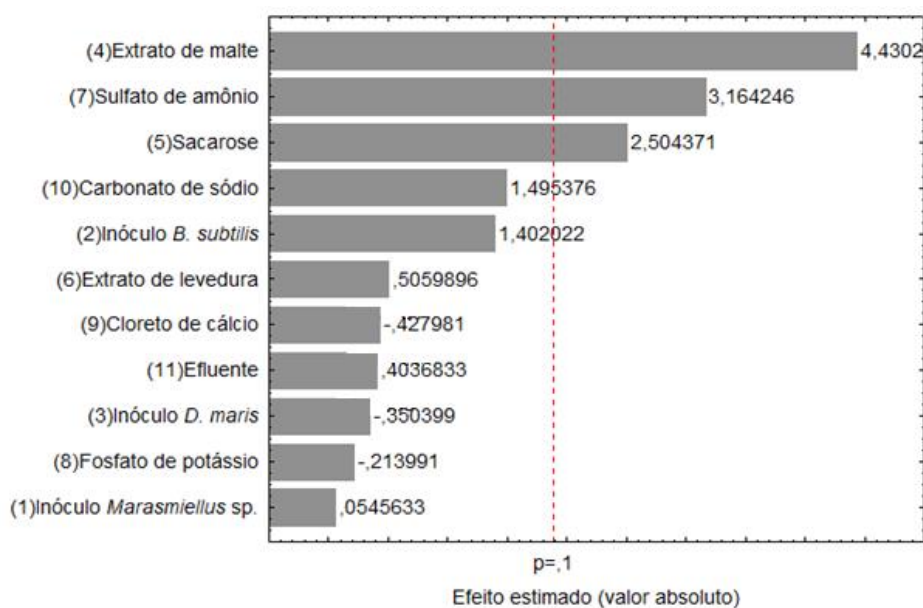
Tabela 10. Descoloração e destoxificação do ETS utilizando planejamento experimental PB1. O pH foi medido ao término do experimento. Os ensaios de 17 a 19 são os pontos centrais, utilizados como controles. Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio	Descoloração (%)	Inibição do crescimento de <i>C. sativus</i> (%)	pH
1	22,05	51,16	6,63
2	36,33	43,12	8,37
3	46,82	96,63	7,45
4	55,31	56,63	7,14
5	53,98	73,39	5,38
6	62,28	94,01	7,14
7	92,33	93,92	2,67
8	53,98	104,17	6,65
9	66,09	74,70	6,24
10	67,13	78,36	6,26
11	56,01	83,82	6,36
12	92,10	72,68	2,33
13	48,58	92,66	6,75
14	29,95	59,57	8,23
15	59,51	86,00	6,17
16	24,91	97,02	7,00
17	66,95	66,03	4,95
18	64,76	61,93	4,97
19	68,62	64,66	5,00

Nos ensaios 7 e 12 foram observadas as maiores porcentagens de descoloração (92,33% e 92,10%, respectivamente) utilizando a maior concentração do ETS (300 mg L⁻¹ de cada corante). Além disso, nesses mesmos ensaios foi visualmente notado que o ETS tornou-se roxo ao término do experimento. Fato similar foi registrado por Bonugli-Santos et al. (2016) utilizando o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, onde o corante Preto Reativo 5 (200 mg L⁻¹) tornou-se roxo inicialmente (24 h) e ficou sem cor ao término do experimento (144 h).

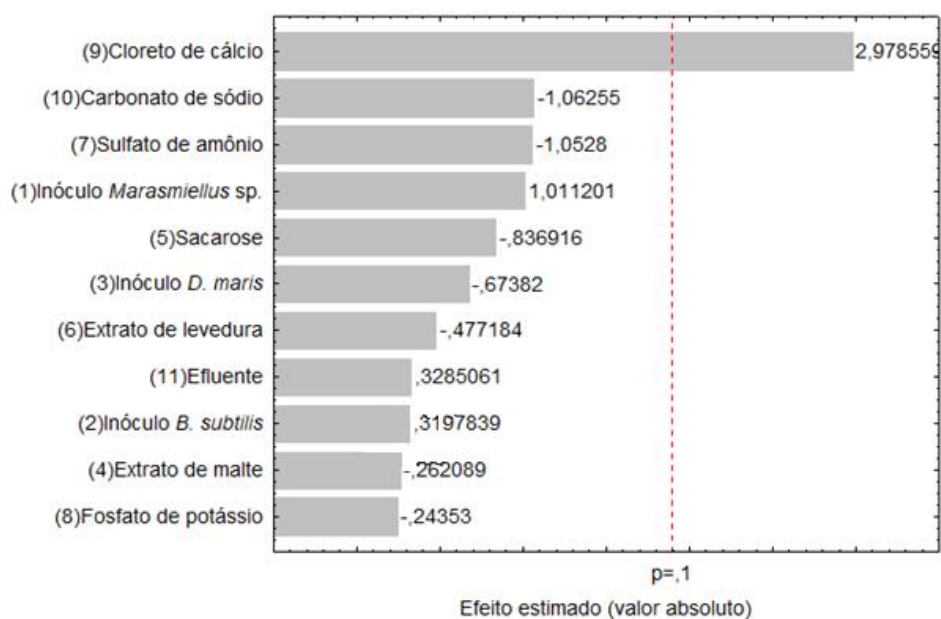
Após a análise dos dados no programa STATISTICA 8.0 (Figura 12), pôde-se verificar que o extrato de malte, a sacarose e o sulfato de amônio apresentaram efeito positivo e significativo na descoloração ($p < 0,1$). As concentrações das fontes de carbono (extrato de malte e sacarose) e nitrogênio (sulfato de amônio) são importantes, pois podem interferir no processo de biodegradação. No caso de concentrações muito elevadas desses compostos, por exemplo, é possível que haja inibição do processo.

Figura 12. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na descoloração do ETS obtidos no planejamento experimental PB1. Fonte: Elaborado pela autora.



Quanto à destoxificação (Figura 13), apenas o cloreto de cálcio apresentou efeito significativo ($p < 0,1$) e positivo. Portanto, esta variável foi mantida e as concentrações aumentadas no planejamento experimental 2. Apesar do ETS em sua maior concentração (300 mg L^{-1} de cada corante) ter apresentado uma descoloração significativa (Ensaio 7 e 12), optou-se por utilizar a concentração de 200 mg L^{-1} (de cada corante) no PB2 e deixa-lo como um parâmetro fixo no intuito de alcançar maiores taxas de destoxificação. Tendo em vista que o extrato de levedura e o carbonato de sódio não foram significativos nem para a descoloração (efeitos positivos) nem para a destoxificação (efeitos negativos), decidiu-se não utilizá-los como variáveis no PB2.

Figura 13. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na destoxificação do ETS obtidos no planejamento experimental PB1. Fonte: Elaborado pela autora.



5.5.2. Planejamento experimental Plackett-Burman 2 (PB2)

Para o segundo planejamento experimental, as duas fontes de carbono e o sulfato de amônio foram mantidas, levando em conta que foram as variáveis significativas para a descoloração no PB1. O fosfato de potássio não foi significativo no PB1, entretanto foi mantido por ser a única fonte de fósforo e o cloreto de cálcio foi mantido, pois foi significativo para a destoxificação. Como foram escolhidas oito variáveis para este segundo planejamento, foi utilizada a matriz PB 12. Os resultados dos bioensaios podem ser vistos na Tabela 11.

Tabela 11. Descoloração e destoxificação do ETS utilizando planejamento experimental PB2. O pH foi medido ao término do experimento. Os ensaios de 13 a 15 são os pontos centrais, utilizados como controles. Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.

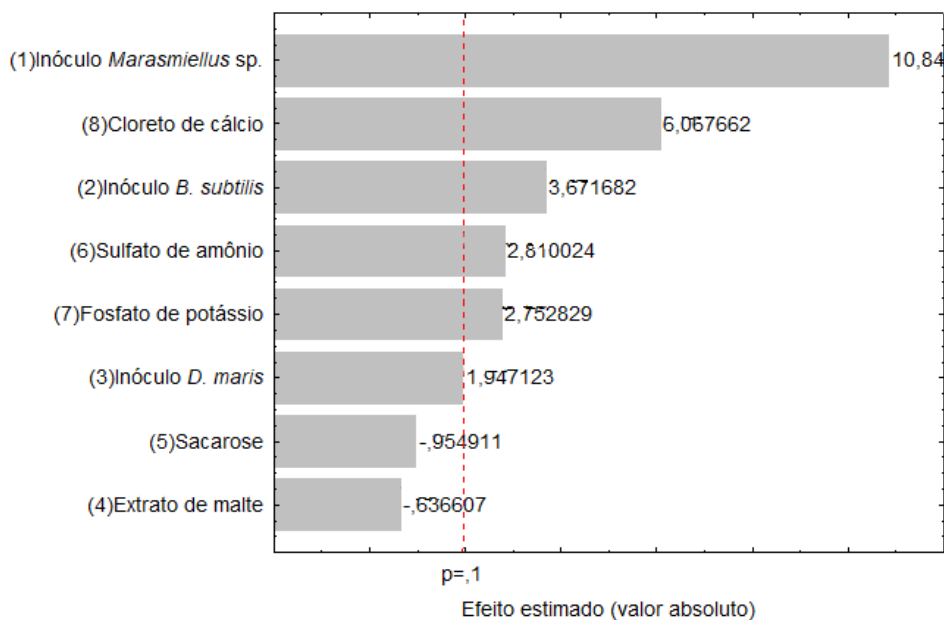
Ensaio	Descoloração (%)	Inibição de crescimento de <i>C. sativus</i> (%)	pH
1	75,90	81,94	7,43
2	79,37	20,22	4,31
3	32,98	99,14	6,55
4	63,10	91,32	5,68
5	62,50	86,52	6,74
6	91,27	61,51	2,69
7	51,66	75,45	6,49
8	53,01	72,90	6,52
9	37,50	40,65	5,50
10	67,32	83,66	6,57
11	64,01	80,95	6,58
12	25,90	93,63	6,85
13	57,23	75,19	6,54
14	59,04	88,39	7,00
15	57,53	84,51	6,96

O ensaio 2 foi o que apresentou a menor porcentagem de inibição de crescimento do bioindicador (20,22%) e a segunda maior porcentagem de descoloração (79,37%) (Tabela 11). Além disso, houve diminuição do pH para 4,31, isso se deve, provavelmente, aos metabólitos formados pelo fungo durante o processo de degradação dos corantes. A maior descoloração ocorreu no ensaio 6 (91,27%), onde também houve a diminuição do pH. Fato semelhante ocorreu também no PB1, onde as maiores taxas de descoloração também ficaram com o pH ácido, com valores próximos a 2.

A análise estatística da descoloração do PB2 mostrou que todas as variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$), exceto a sacarose e o extrato de malte (Figura 14), os quais não apresentaram efeito significativo. Curiosamente, este resultado é o contrário do que foi visto no PB1 (Figura 12), onde a sacarose e o extrato de malte apresentaram efeito significativo e positivo. Por outro lado, o cloreto de cálcio, que apresentou efeito não significativo e negativo no PB1, desta vez foi significativo e positivo na descoloração. Dawkar et al. (2009), em experimento com *Bacillus* sp. e o corante azo Navy Blue 2GL, conseguiram diminuir o tempo de descoloração para menos da metade utilizando 1 mM de

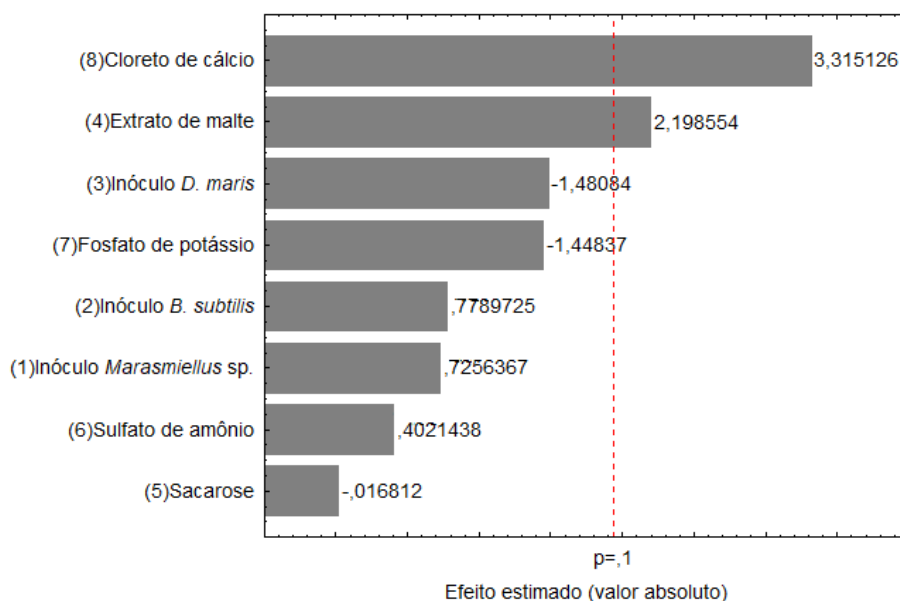
cloreto de cálcio como indutor. No PB2 foram utilizadas concentrações maiores deste composto (1,5 mM e 3 mM) em relação ao PB1, onde se utilizou 1 mM e 2 mM. Esta pode ter sido a razão do efeito significativo e positivo ter sido observado apenas no PB2.

Figura 14. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na descoloração do ETS obtidos no planejamento experimental PB2. Fonte: Elaborado pela autora.



As variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) e positivo para a destoxificação foram o extrato de malte e o cloreto de cálcio (Figura 15). Resultado semelhante ocorreu no PB1, onde o cloreto de cálcio também foi significativo para a destoxificação.

Figura 15. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das onze variáveis na destoxificação do ETS obtidos no planejamento experimental PB2. Fonte: Elaborado pela autora.



Os planejamentos experimentais Plackett-Burman utilizados permitiram que se analisassem onze variáveis com uma quantidade muito menor de ensaios do que se fosse avaliada cada variável separadamente. Além disso, foi possível obter respostas das variáveis em conjunto com as outras. Isso resultou em economia de tempo, recursos e em respostas estatísticas significativas. Por essas razões que o desenho experimental vem sendo utilizado em vários estudos de biorremediação de corantes têxteis e outros poluentes ambientais. Utilizando o fungo *Aspergillus niger* na biodegradação dos corantes Marinho Reativo 19 e Preto Reativo 5, Al-Prol et al. (2017) atingiram a máxima descoloração utilizando o mínimo de experimentos. Isso foi possível, pois utilizaram planejamentos experimentais do tipo PB, os quais se adequam bem às etapas iniciais de seleção de variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

No estudo de Khan e colaboradores (2014) também foi utilizado planejamento experimental PB na descoloração de corante têxtil (Violeta Reativo 5) por consórcio de bactérias (*Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum intermedium* M16-10-4, *Enterococcus faecalis*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Kocuria flavus*, *Bacillus beijingensis* e *Citrobacter freundii*). Foi observado que o sulfato de amônio, peptona, extrato de malte, sulfato de magnésio, temperatura e a quantidade do inóculo afetaram positivamente a descoloração. As variáveis estudadas dependem principalmente dos micro-organismos utilizados e do corante, por isso é importante notar que algumas das variáveis positivas são diferentes das do presente estudo. Apesar de Khan e colaboradores (2014) terem alcançado 100% de descoloração, não foram feitos ensaios de destoxificação com biondicadores.

5.5.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Tendo em vista que o cloreto de cálcio teve efeito significativo para a destoxificação no PB1 e PB2 e também foi significativo para a descoloração no PB2 (Figura 14) ele foi selecionado como variável no DCCR. Apesar do extrato de malte ter apresentado efeito negativo e não significativo para a descoloração no PB2, ele apresentou efeito significativo e positivo na descoloração do PB1 e na destoxificação do PB2. Portanto, essas duas variáveis foram escolhidas para que se pudesse obter com mais precisão a concentração ideal nos bioensaios, de forma a otimizar o processo. Além disso, tendo como base o ensaio 2 do PB2, o qual exibiu o melhor resultado de destoxificação e uma relevante descoloração, foi escolhida a mesma quantidade de inóculo para o DCCR. Os resultados deste experimento estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Descoloração e destoxificação do ETS utilizando DCCR com duas variáveis. Os ensaios de 9 a 11 são os pontos centrais, utilizados como controles. Os cultivos foram realizados a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio	Descoloração (%)	Inibição de crescimento de <i>C. sativus</i> (%)
1	52,70	81,24
2	53,07	77,16
3	48,98	31,97
4	55,12	59,13
5	52,33	46,82
6	51,96	68,68
7	52,89	70,45
8	54,75	21,53
9	52,51	56,12
10	52,89	41,44
11	65,55	32,30

O melhor resultado de destoxificação foi o do ensaio 8 (21,53%). Quanto à descoloração, os resultados foram muito semelhantes em todos os ensaios, com exceção do ensaio 11, onde se obteve uma porcentagem um pouco maior (65,55%). Apesar de ter sido feito o DCCR com o objetivo de otimizar ainda mais o bioprocesso, os valores de descoloração foram inferiores aos ensaios do PB1 (Tabela 10) e PB2 (Tabela 11), cujas melhores porcentagens foram superiores a 90%.

Para a descoloração, nenhuma variável teve efeito significativo (Figura 16). Porém, na destoxificação o cloreto de cálcio (linear) e o extrato de malte (quadrático) foram significativos, sendo o primeiro com efeito positivo e o segundo com efeito negativo (Figura 17).

Figura 16. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das duas variáveis na descoloração do ETS obtidos no DCCR. Fonte: Elaborado pela autora.

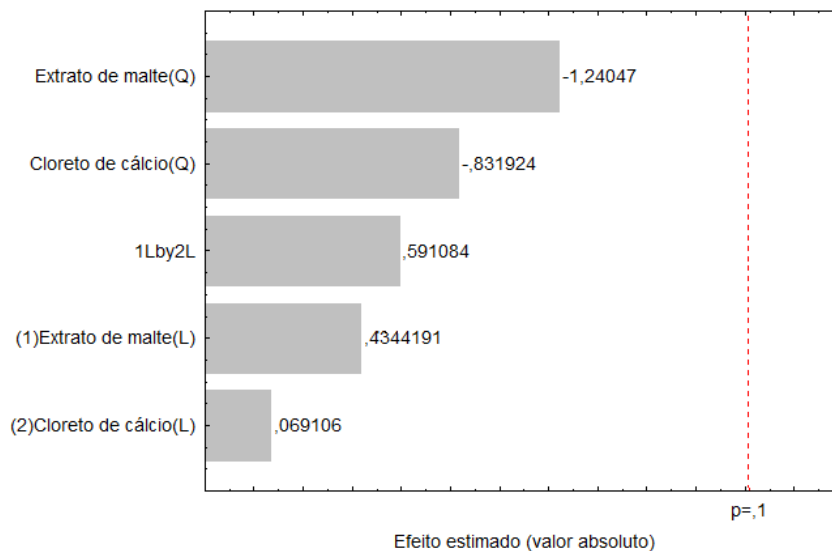
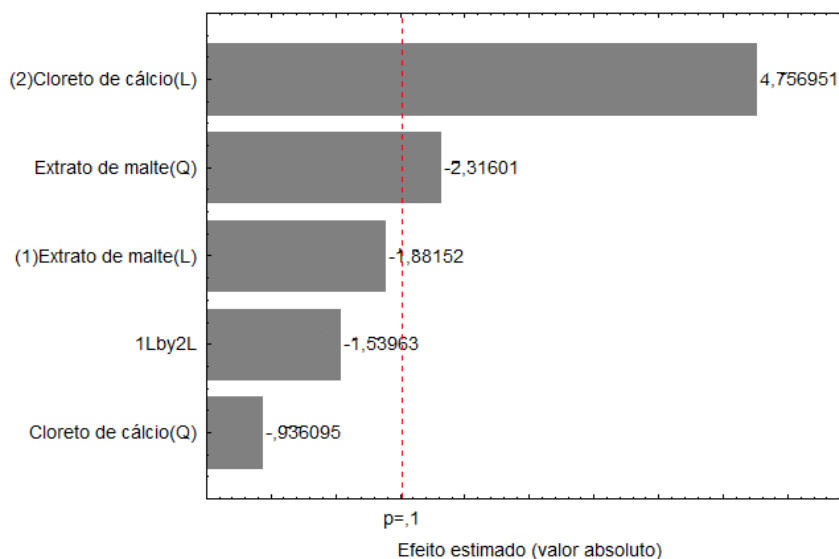


Figura 17. Diagrama de Pareto com o efeito estimado das duas variáveis na destoxificação do ETS obtidos no DCCR. Fonte: Elaborado pela autora.



O DCCR em um planejamento experimental é útil na metodologia de superfície de resposta para a construção de um modelo de segunda ordem (quadrática) para a resposta da variável (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Isso sem a necessidade de usar um experimento fatorial completo de três níveis. Dessa forma, é possível otimizar as concentrações das variáveis em menos tempo e com menos recursos. É relevante frisar, porém, a importância em se validar os experimentos, ou seja, repetir os ensaios com os melhores resultados, para que haja maior confiabilidade nos resultados.

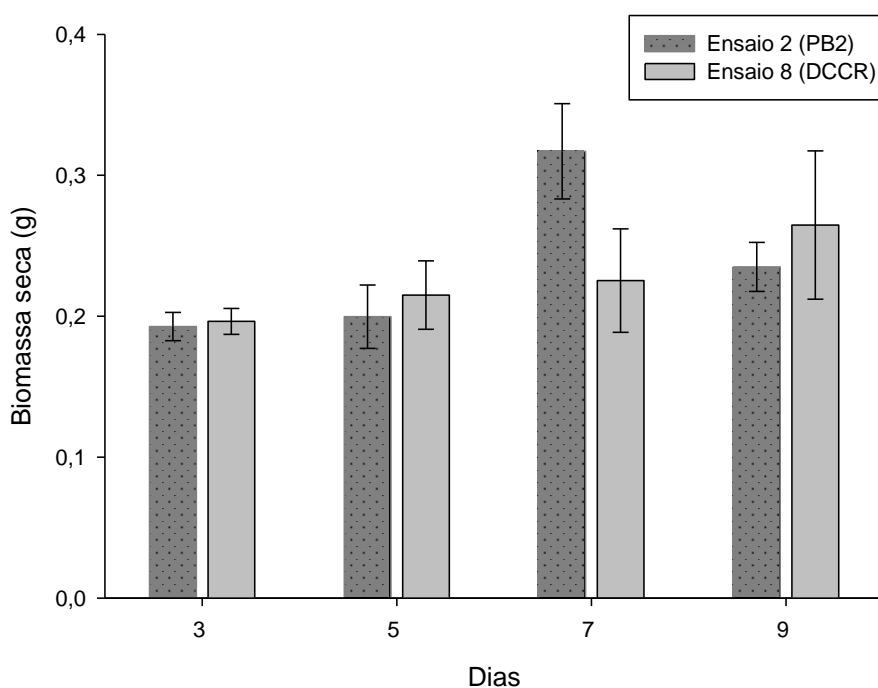
5.6. Validação experimental

5.6.1. Primeira validação

Para a primeira validação experimental foram escolhidos os ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR), por apresentarem os menores valores de inibição de crescimento de *Cucumis sativus* entre todas as estratégias experimentais. Além disso, as taxas de descoloração do ETS para ensaio 2 (PB2) e 8 (DCCR) foram de 79,37% e 54,75%, respectivamente.

Os resultados da biomassa seca destes experimentos estão apresentados na Figura 18. No ensaio 8 (DCCR) houve um aumento linear da biomassa seca ao longo dos dias, já que no experimento de 3 dias a biomassa era de 0,19 g e no de 9 dias a biomassa foi de 0,26 g. Enquanto que, nas condições do ensaio 2 (PB2), os resultados sugerem que o consórcio está entrando na fase de declínio com 9 dias de experimento. Entretanto, para elucidar o perfil de crescimento da biomassa seca mais dias de experimento seriam necessários nas condições do ensaio 8 (DCCR).

Figura 18. Medidas de biomassa seca após ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 3, 5, 7 e 9 dias, seguidos pela s bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, cultivo a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.



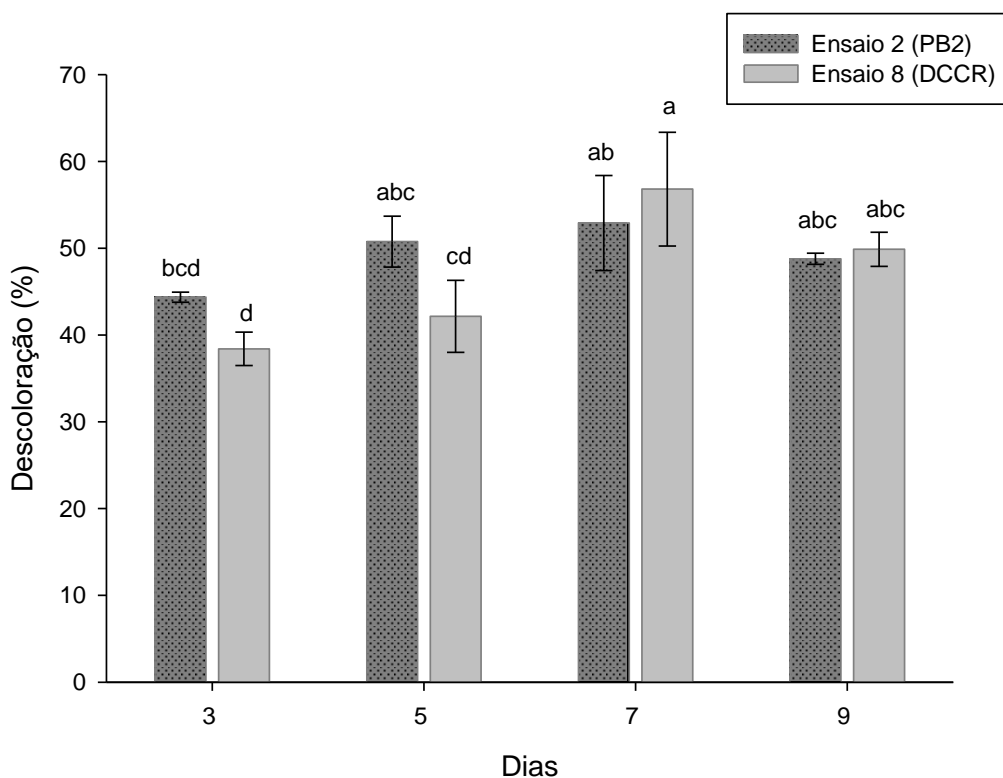
Para a descoloração (Figura 19) ao longo do tempo, no ensaio 2 (PB2) há relação entre biomassa e descoloração, sendo o experimento com 7 dias de cultivo o que apresentou a maior descoloração (52,90%) e biomassa (0,32 g). Entretanto, pelo teste de Tukey, o ensaio 2

(PB2) não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os dias analisados. Isso sugere que para a descoloração, o ensaio 2 (PB2) poderia ter apenas 3 dias do fungo em contato com o ETS, diminuindo assim, o tempo necessário para a descoloração. O ensaio 8 (DCCR) não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) nos experimentos de 7 dias e 9 dias, dessa forma, para a descoloração, o tempo de experimento poderia ser de 7 dias.

O que diferiu entre os dois ensaios realizados foi basicamente a quantidade de cloreto de cálcio utilizada. Enquanto no ensaio 2 foram 3 mM de cloreto de sódio, no ensaio 8 foram 5 mM. Entretanto, não houve diferença significativa entre os ensaios, se analisados nos mesmos dias de experimento. O que supõe que a quantidade de cloreto de cálcio a ser utilizada, de forma a otimizar o processo, poderia ser de 3 mM.

Comparando aos resultados anteriores, de 7 dias, o ensaio 2 (PB2) apresentou uma taxa de descoloração menor na validação (52,90%) em relação ao resultado obtido no PB2 (79,37%). Isso pode ser devido aos inúmeros repiques que foram feitos com o fungo *Marasmiellus* sp. e com as bactérias, os quais podem ter feito os micro-organismos produzirem menos enzimas necessárias para o processo de descoloração. Já a validação do ensaio 8 (DCCR) apresentou resultado semelhante (56,80%) ao que foi registrado no DCCR (54,75%). Pressupondo a questão dos inúmeros repiques, o DCCR foi feito temporalmente mais próximo à validação do que o PB2, o que poderia justificar o resultado semelhante.

Figura 19. Porcentagem de descoloração após ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 3, 5, 7 e 9 dias, seguidos pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, cultivo a 28°C e 140 rpm. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os bioensaios de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). Fonte: Elaborado pela autora.

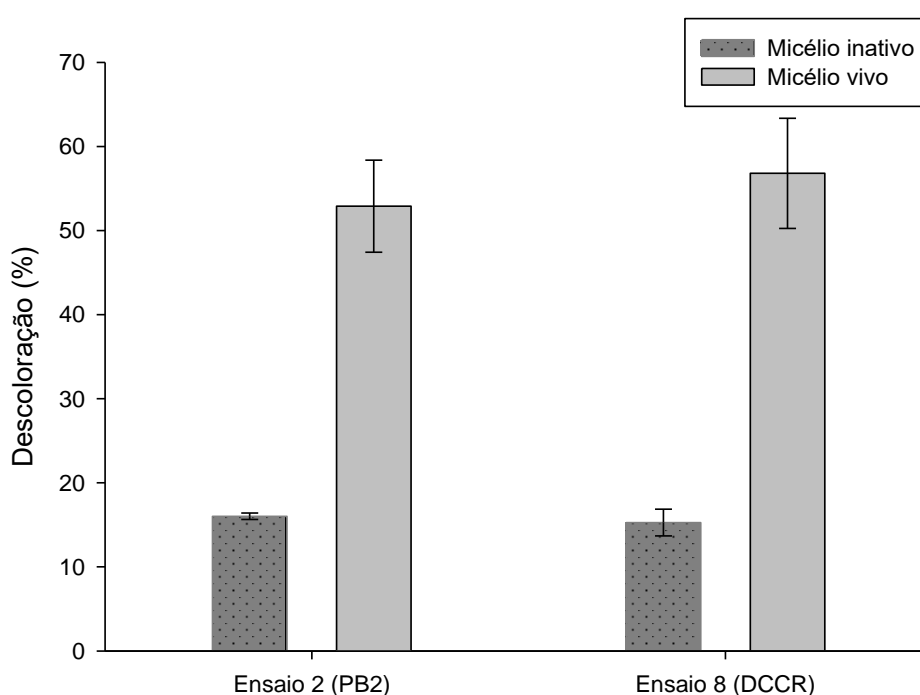


A adsorção pelo micélio fúngico inativo foi semelhante nos dois ensaios, com 7 dias de experimento (Figura 20). Sendo a porcentagem de descoloração com o micélio inativo (adsorção) no ensaio 2 (PB2) de 16,01% e de 52,91% com o micélio vivo. No ensaio 8 (DCCR) a adsorção foi de 15,27% e a descoloração com o micélio vivo foi de 56,80%. Provavelmente a adsorção pelo micélio vivo foi maior do que o valor estimado com o micélio inativo, já que o fungo continua crescendo após ser colocado em contato com o ETS. O valor de adsorção obtido é um parâmetro importante para entendermos a atuação microbiana na degradação do poluente, considerando a capacidade de adsorção.

A atividade das enzimas ligninolíticas foi avaliada, porém nenhuma delas foi detectada nos ensaios realizados. Este resultado indica que a descoloração não ocorreu pela ação das enzimas LiP, MnP e/ou lacase. Possivelmente, outras rotas metabólicas como a da enzima citocromo P-450 podem ter atuado na degradação dos corantes, já que os genes dessa enzima estão presentes na grande maioria dos fungos e bactérias. A citocromo P-450 é capaz de catalisar diversas reações como desalogações, peroxidações, desaminações, oxido-reduções,

entre outras reações e já foi reportada em processos de biodegradação de corantes têxteis (WANG et al., 2012). Uma via alternativa pode ter sido das enzimas mono e dioxigenase, as quais sob condições aeróbias, (como neste experimento) catalisam a incorporação de oxigênio no anel aromático de compostos aromáticos antes da fissão do anel (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

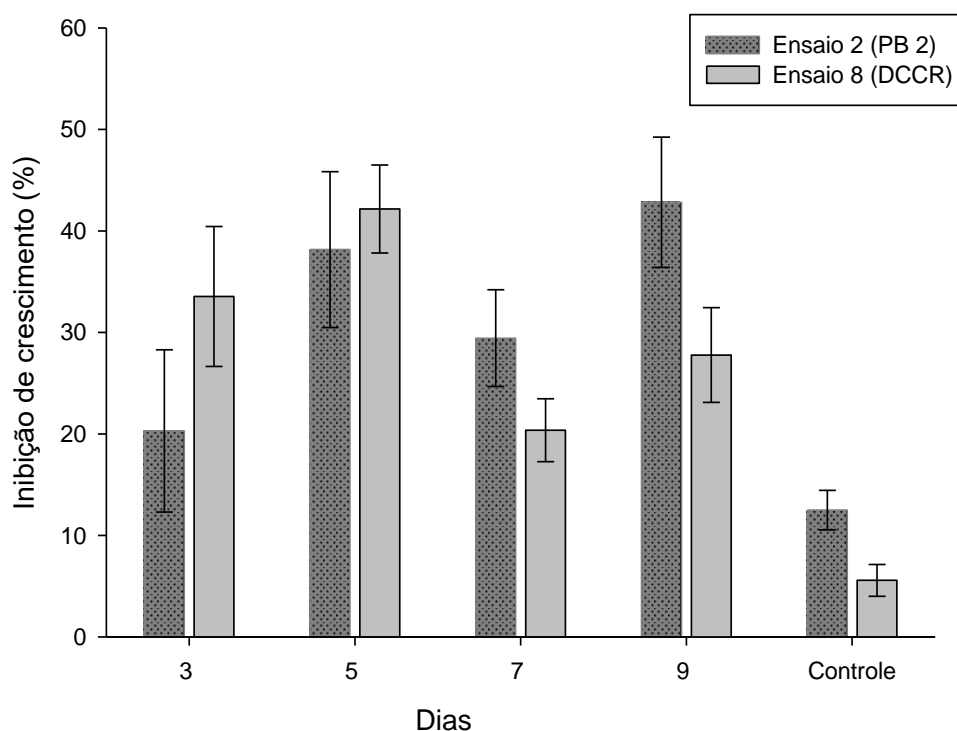
Figura 20. Porcentagem de descoloração do micélio inativo e vivo após ensaios 2 (PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7, seguido pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, cultivo a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.



Quanto à destoxificação (Figura 21), pode-se notar que os controles dos dois ensaios em validação apresentavam menor toxicidade quando comparados aos tratamentos. Este resultado sugere que o ETS tornou-se mais tóxico a partir do processo de biodegradação. Entretanto, considerando os resultados dos experimentos anteriores onde foi utilizada a mesma concentração de corantes e os mesmos compostos, com exceção do cloreto de cálcio, e se obteve uma inibição de crescimento de 84,40% (Tabela 9) e 82,44% (PB1- dado não mostrado), pode-se supor que houve uma interferência do cloreto de cálcio na taxa de crescimento das sementes de *C. sativus*. No PB1 este problema não foi detectado, pois nos planejamentos experimentais, quando se começou a usar o cloreto de cálcio, o controle utilizado era composto pelos corantes, cloreto de sódio e água. Como o objetivo do planejamento experimental é o de minimizar o número de ensaios e avaliar os efeitos das

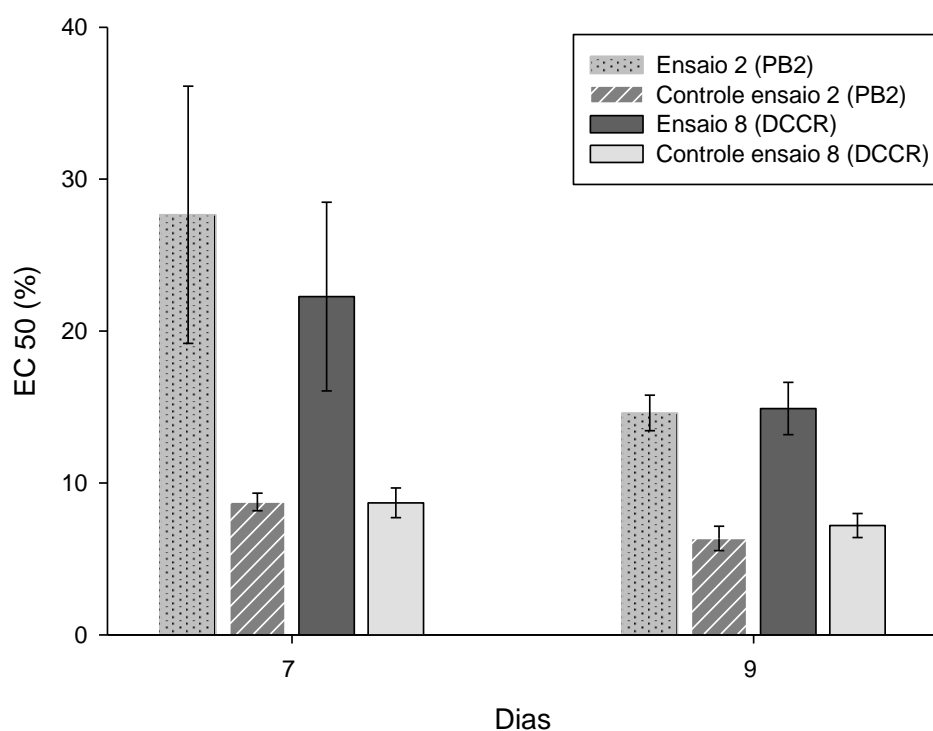
variáveis considerando suas interações, onde cada ensaio do planejamento experimental são introduzidas diferentes variáveis em diferentes concentrações, não se realiza um controle para cada ensaio. Esses resultados revelam a importância de testes preliminares com os bioindicadores a serem utilizados, a fim de que se verifique o efeito tanto positivo, quanto negativo dos compostos sobre o indicador. Além disso, é evidente que apenas um bioensaio toxicológico não fornece respostas inequívocas quanto à toxicidade de um poluente.

Figura 21. Medidas de inibição de crescimento radicular de *C. sativus* após os ensaios 2(PB2) e 8 (DCCR) com ETS (200 mg L⁻¹ de cada corante) utilizando as bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle contendo as mesmas condições de cultivo, porém sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.



Diante disso, foi realizada outra análise de destoxificação para esses bioensaios em validação, utilizando a bactéria *A. fischeri* (Figura 20). Comparando os controles com os ensaios, é possível verificar que houve diminuição da toxicidade nos dois ensaios, nos 7 e 9 dias de cultivo. Sendo que a maior EC₅₀ (27,56%) foi registrada no experimento de 7 dias do ensaio 2 (PB2).

Figura 22. Concentração efetiva (EC_{50}), após 15 minutos de exposição nas amostras contendo ETS (200 mg L^{-1} de cada corante) antes e após bioensaio utilizando as bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) por mais 7 e 9 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.



Apesar de alguns valores de destoxificação terem sido influenciados pelo cloreto de cálcio e este fato ter sido verificado apenas na etapa de validação, o desenho experimental é um método atrativo para a seleção e otimização de variáveis em processos como a biorremediação de corantes têxteis. Bonugli-Santos et al. (2016), por exemplo, utilizaram o desenho experimental na otimização da descoloração do corante Preto Reativo 5 (200 mg L^{-1}), o que possibilitou atingir elevado percentual de descoloração (de 70 % para mais de 90 %) e degradação (98 %) do corante. O presente trabalho foi realizado de forma similar ao trabalho de Bonugli-Santos et al. (2016) onde foram utilizados dois planejamentos do tipo Plackett-Burman (PB16 e PB12) e dois DCCR com o fungo derivado de ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Tendo em vista os resultados dos ensaios com planejamento experimental, verificamos que é essencial validar os ensaios com os melhores resultados de descoloração e destoxificação logo após cada planejamento experimental realizado. Desta forma, será possível detectar se alguma variável está interferindo nas medições de descoloração e

destoxificação. Em adição, é importante analisar como cada variável pode interferir nos dados de descoloração e destoxificação, pois caso haja interferências os dados não podem ser considerados confiáveis.

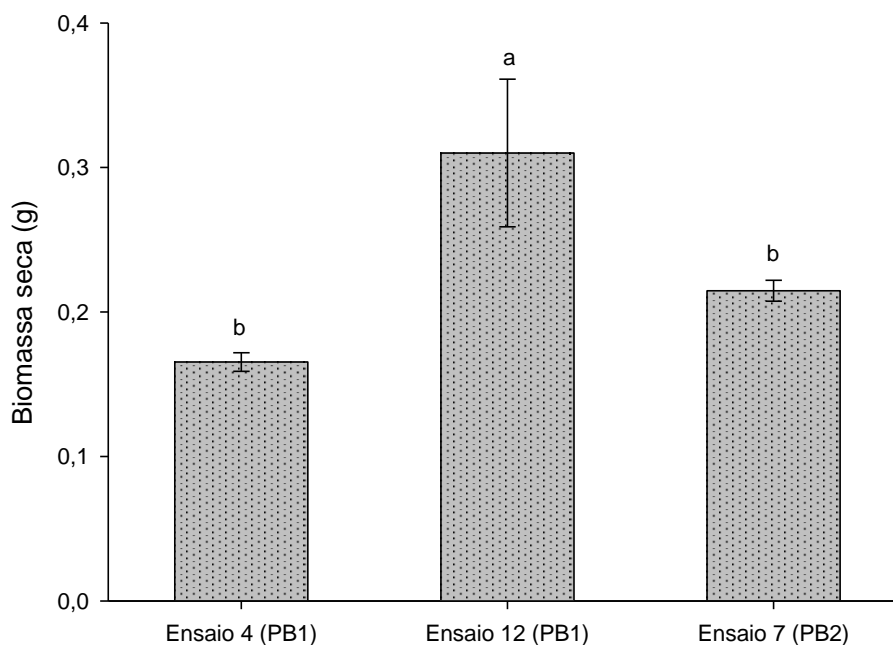
Considerando a possibilidade da influência do cloreto de cálcio nas sementes de *C. sativus*, o que pode ter mascarado os reais resultados de destoxificação, outros ensaios foram selecionados e submetidos à validação (segunda validação).

5.6.2. Segunda validação

Na segunda validação foram considerados os resultados da destoxificação apenas dos ensaios que não continham o cloreto de cálcio os quais estão destacados em cinza nas Tabelas 10 (PB1) e 11 (PB2). Os resultados do DCCR não foram considerados para a destoxificação, já que em todos os ensaios foi utilizado o cloreto de cálcio. Desta forma, foram selecionados os ensaios 4 (PB1, Tabela 10) e 7 (PB2, Tabela 11) como os melhores quanto à descoloração e destoxificação e o ensaio 12 (PB1, Tabela 10) por ter apresentado alta taxa de descoloração (92,10%), apesar de ter o cloreto de cálcio em sua composição.

Os resultados da biomassa seca dos três ensaios podem ser vistos na Figura 23. O ensaio 12 (PB1) foi o que apresentou a maior quantidade de biomassa seca (0,31g), a qual foi significativamente diferente dos outros ensaios. Isso pode ter ocorrido devido à maior quantidade de carbono utilizada neste ensaio (extrato de malte 6 g L⁻¹ e sacarose 6 g L⁻¹) e também pela alta concentração de corante (300 mg L⁻¹ de cada corante) que pode ter servido como fonte de carbono para o crescimento microbiano.

Figura 23. Medidas de biomassa seca após bioensaios em diferentes condições utilizando as bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

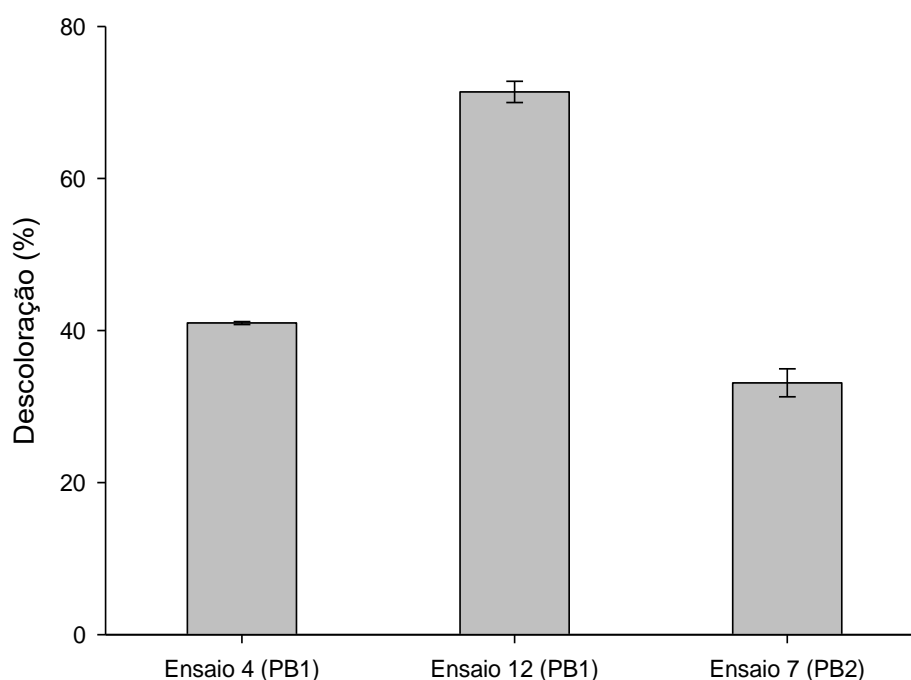


Os resultados da descoloração estão apresentados na Figura 24. A descoloração dos três ensaios foi menor do que a obtida nos planejamentos experimentais. Enquanto no PB1 os ensaios 4 e 12 tiveram 55,31% e 92,10% de descoloração, neste experimento de validação foi possível obter 40,98% e 71,39%, respectivamente. O mesmo ocorreu para o ensaio 7, onde no PB2 foi observada 51,66% de descoloração e na validação 33,12%. A redução das taxas de descoloração dos PB para a validação foi da magnitude de 22 a 42%. Isso pode ter sido ocasionado pela mesma razão que foi suposta na primeira validação experimental, ou seja, pela grande quantidade de repiques dos micro-organismos, as enzimas necessárias para o bioprocessamento de descoloração podem ter diminuído. Um outro fator importante a ser considerado é a padronização do inóculo fúngico. Ainda que, se utilizem os cilindros com o mesmo diâmetro, possivelmente a quantidade de hifas podem variar consideravelmente. Como o fungo *Marasmiellus* sp. não produz esporos nas condições laboratoriais, o método alternativo é padronizar a área com crescimento de hifas.

Por se tratar de metabolismo microbiano, muitas vezes ocorrem situações que são inerentes aos sistemas biológicos e fogem ao nosso controle. Resultados similares de redução em validações experimentais foram encontrados em outros trabalhos reportados em literatura

(VASCONCELOS, 2015; DUARTE, 2016; VIEIRA, 2016). Apesar dos resultados para a descoloração terem sido menores na validação, 71,39% de descoloração obtida no ensaio 12 (PB1) pode ser considerada relevante, tendo em vista que, este ensaio continha alta concentração de corantes (300 mg L^{-1} de cada corante). Além disso, foi visualmente observado que o ETS tornou-se roxo, como reportado anteriormente no item 4.5.1 (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Andleeb et al. (2010) reportaram a remoção de cor em 84,53% de Preto Sulfuroso (50 mg L^{-1}) de efluente têxtil sintético (24h), em reator, utilizando *Aspergillus terreus* SA3 (isolado de efluente têxtil). Apesar de terem conseguido alta porcentagem de descoloração (em apenas um dia), a concentração de Preto Sulfuroso foi bem mais baixa do que a utilizada no presente trabalho, além do fato de terem sido utilizados outros corantes no ETS e compostos que aumentam a toxicidade do mesmo.

Figura 24. Porcentagem de descoloração após bioensaios com ETS em diferentes condições utilizando as bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.



O pH registrado ao término dos experimentos de validação foi semelhante ao encontrado nos planejamentos PB. No ensaio 4 do PB1 foi registrado pH 7,14 e na validação obteve-se a média de 7,61. Houve grande diminuição do pH no ensaio 12 que no PB1 foi de 2,33 e na validação de 3,64. A acidez pode ter sido decorrente dos metabólitos do fungo e das

bactérias e como na validação se obteve uma taxa de descoloração menor e o pH menos ácido do que no mesmo ensaio do PB1, supõe-se que os micro-organismos podem ter produzido menos metabólitos neste ensaio de validação e conseqüentemente, houve uma menor descoloração. No PB2, o ensaio 7 permaneceu com o pH de 6,49 e no experimento de validação foi registrado pH 6,96.

A atividade das enzimas ligninolíticas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase foi avaliada, não sendo detectada nenhuma atividade nos ensaios realizados. No estudo de Bonugli-Santos et al. (2016) com o fungo derivado de ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, a descoloração do corante têxtil Preto Reativo 5 possivelmente envolveu a ação da enzima MnP. Isso por que nos dias onde houve a evidente ação desta enzima, ocorreu também descoloração. No presente estudo é provável que outras enzimas estejam sendo responsáveis pelo processo de biodegradação, como as mono e dioxigenases, as enzimas do sistema citocromo P-450 e epóxido hidrolases, como citado anteriormente. Cha, Doerge e Cerniglia (2001) reportaram a presença da enzima P-450 mono-oxigenase na degradação do corante *Malachite green* utilizando o fungo *Cunninghamella elegans* ATCC 36112.

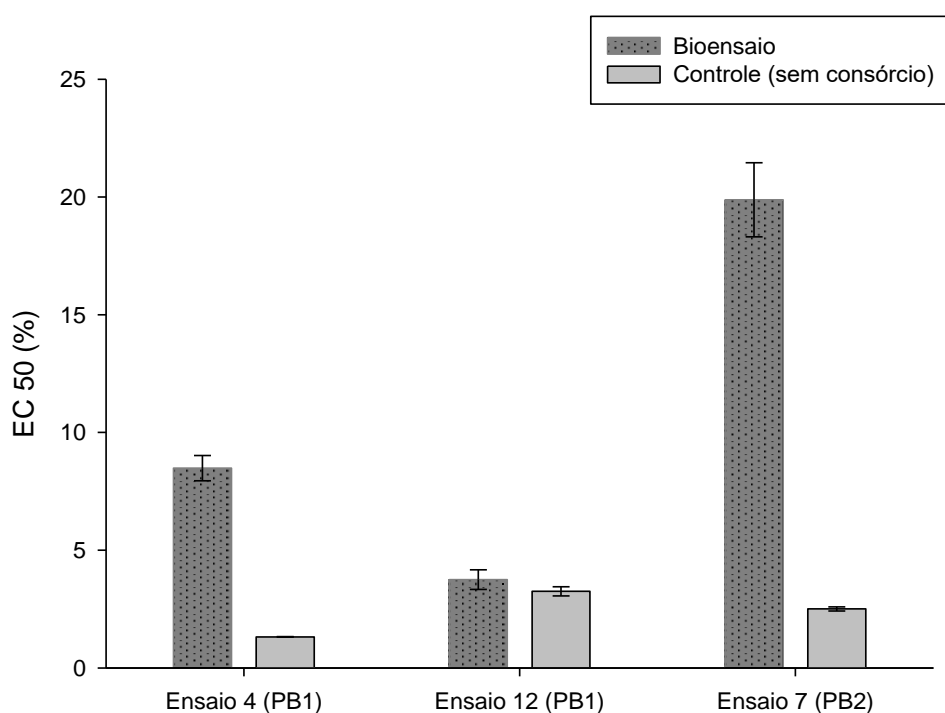
Quanto à destoxificação utilizando o bioindicador *C. sativus* (Tabela 13), é possível notar que não houve destoxificação pelo consórcio microbiano, já que os resultados dos bioensaios e dos controles foram muito semelhantes. Isso vai de encontro ao que foi observado nos resultados de destoxificação anteriores, onde houve 56,63% (ensaio 4 – PB1) e 75,45% (ensaio 7 – PB2) de inibição de crescimento comparado a 100% do controle (dados normalizados). O ensaio 12 (PB1) não foi testado, pois continha cloreto de cálcio no experimento e assim o resultado não seria fidedigno.

Tabela 13. Medidas de inibição de crescimento radicular de *C. sativus* após ensaios 4 (PB1) e 7 (PB2) utilizando as bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle contendo as mesmas condições de cultivo, porém sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.

	Ensaio 4 (PB1)	Controle Ensaio 4 (PB1)	Ensaio 7 (PB2)	Controle Ensaio 7 (PB2)
Inibição de crescimento (%)	86,87	83,00	89,18	88,87
Desvio padrão	±0,92	±2,44	±0,77	±2,08

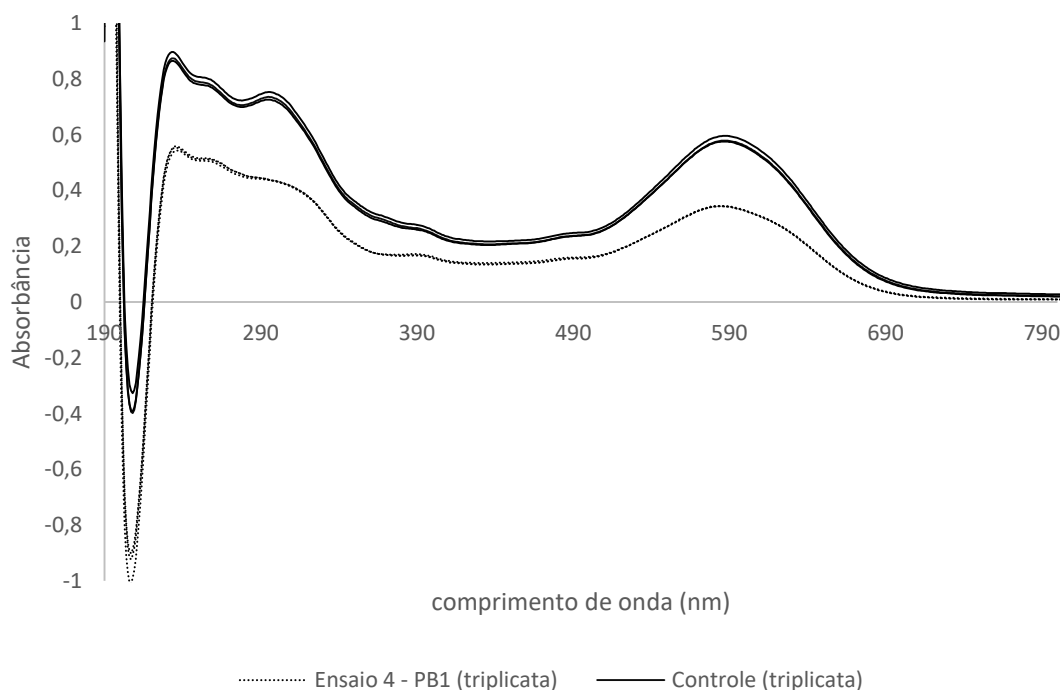
Os experimentos de destoxificação desta validação foram realizados também com a bactéria *A. fischeri*. Para este bioindicador o cloreto de cálcio não apresenta interferência e todos os três ensaios selecionados foram avaliados. Os resultados estão apresentados na Figura 25. A EC_{50} obtida no ensaio 4 (PB1) foi de 8,49, o que significa que houve destoxificação, pois no controle a EC_{50} foi de 1,32. O ensaio 7 (PB2) apresentou maior taxa de destoxificação, onde foi observada a EC_{50} de 2,51 no controle e de 19,88 após o bioensaio. Para o ensaio 12 (PB1), a EC_{50} do controle e após o bioensaio foram muito semelhantes, sendo 3,26 e 3,75, respectivamente, indicando que não houve alteração da toxicidade do ETS apesar da relevante descoloração.

Figura 25. Concentração efetiva (EC_{50}), após 15 minutos de exposição das amostras contendo ETS antes e após bioensaios em diferentes condições utilizando as bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) durante dois dias, seguido pelo fungo (*Marasmiellus* sp.) por mais 7 dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Fonte: Elaborado pela autora.



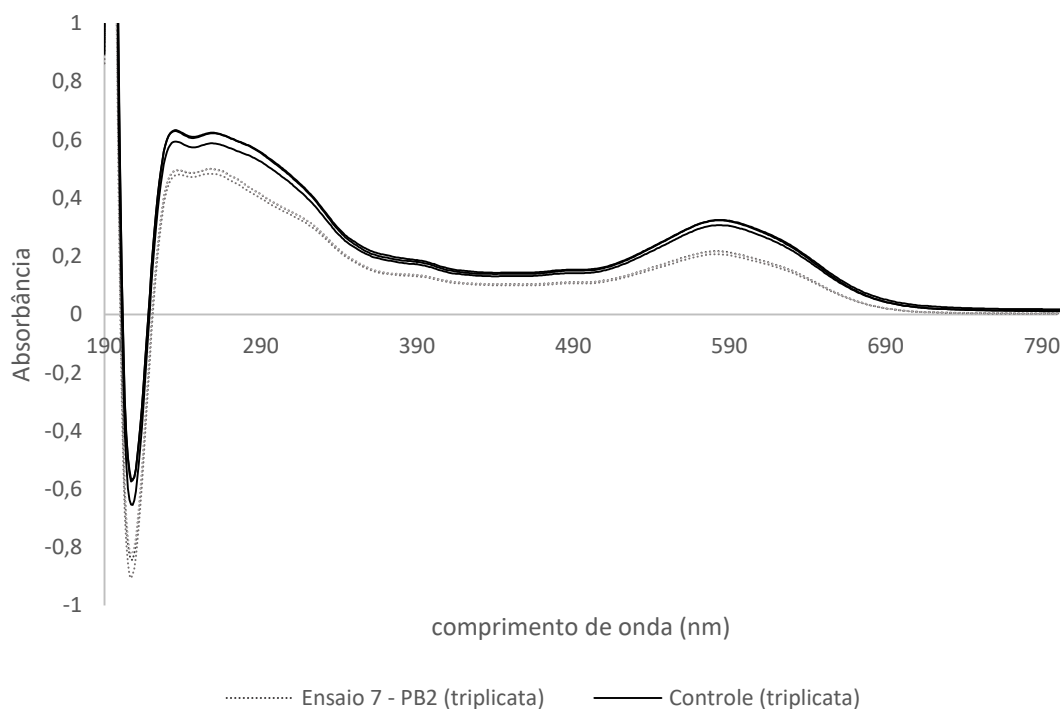
Ao analisar os espectros de UV-Vis das amostras do Ensaio 4 (PB1), verifica-se que os mesmos apresentaram semelhança com os espectros do controle (Figura 26). Embora a absorvância após os bioensaios tenha diminuído, os picos na região UV (234 nm e 298 nm) e o pico na região visível (589 nm) permaneceram presentes.

Figura 26. Espectro UV-Vis após Ensaio 4 (PB1) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.



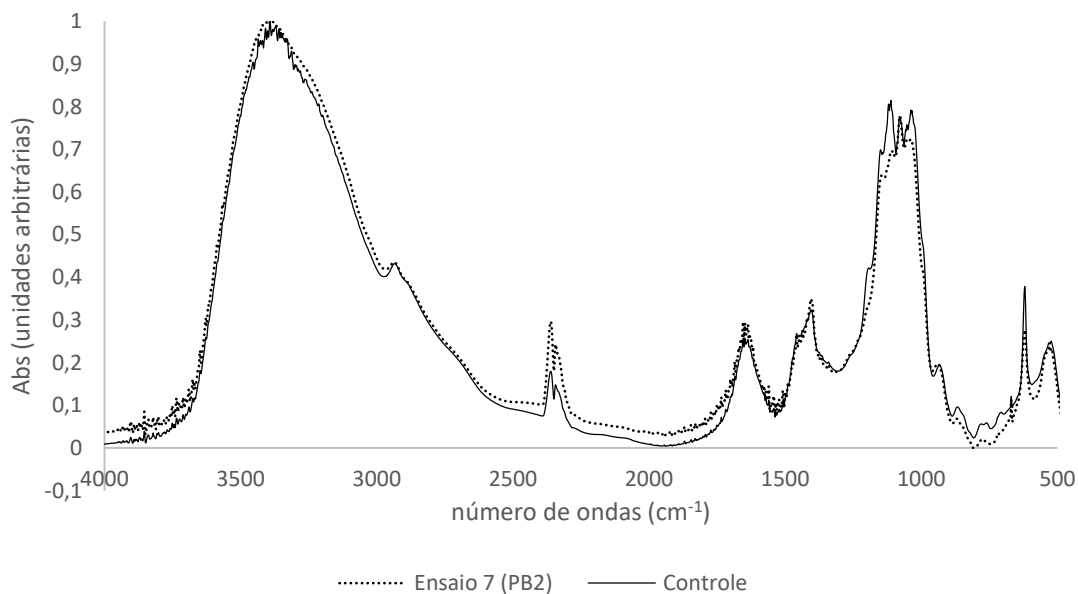
Os resultados do espectro do Ensaio 7 (PB2), foram semelhantes aos observados no Ensaio 4 (PB1) (Figura 27). Os espectros dos corantes após o bioensaio mantiveram semelhanças quanto à presença dos picos na região UV (234 nm e 261nm) e o pico na região visível (589 nm), embora tenha sido verificada a diminuição na absorbância após o bioensaio.

Figura 27. Espectro UV-Vis após Ensaio 7 (PB2) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.



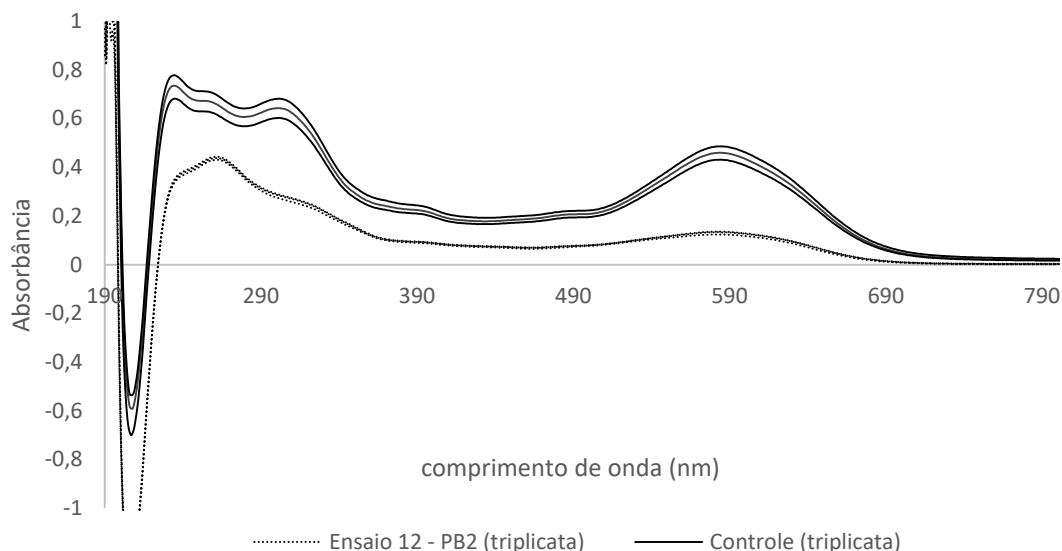
A semelhança entre os espectros antes e após o biotratamento também pôde ser verificada ao analisar os espectros de FTIR referentes ao ensaio 7 (PB2), no qual são observadas semelhanças na presença de bandas, indicando que os mesmos grupos funcionais estão presentes nas moléculas dos corantes antes e após os bioensaios, assim como na intensidade das absorbâncias (Figura 28). Esses dados sugerem que a descoloração de 33,12% atingida no Ensaio 7 (PB2) foi, possivelmente, devido à adsorção dos corantes pelo micélio do fungo. Fato que pode ser corroborado com os resultados da destoxificação, analisada com o bioindicador *A. fischeri*, onde a EC_{50} foi de 19,88% após o bioensaio (Figura 25). Como na adsorção os corantes não sofrem alterações em sua estrutura molecular, o micélio do fungo provavelmente adsorveu os corantes do meio, diminuindo sua concentração e conseqüentemente, diminuindo a toxicidade do meio (ALMEIDA; CORSO, 2014).

Figura 28. Espectro de FTIR após Ensaio 7 (PB2) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.



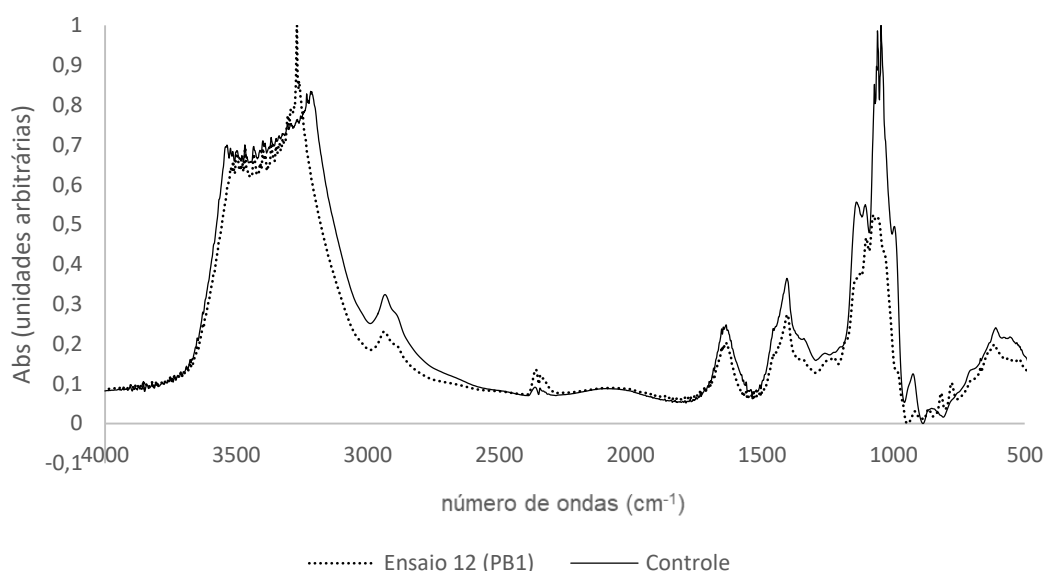
Nos espectros de UV-Vis do Ensaio 12 (PB1) houve diminuição na intensidade de três picos (237 nm, 303 nm e 589 nm) (Figura 29). Além disso, houve mudança na topografia do espectro após o bioensaio, quando comparado com o controle sem o consórcio. Esses resultados indicam que houve transformações nas estruturas das moléculas de corantes.

Figura 29. Espectro UV-Vis após Ensaio 12 (PB1) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.



No FTIR do mesmo ensaio (Figura 30) foi possível observar a diminuição de várias bandas, principalmente entre 1000 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} , o que sugere consumo, transformação ou remoção de determinados grupos funcionais orgânicos. Além disso, houve diminuição das bandas em 1633 cm^{-1} , indicativas de C=C de anéis aromáticos (ARAVIND et al., 2016; MANAI et al., 2016), 1448 cm^{-1} e 1408 cm^{-1} , características de C-H e 1132 cm^{-1} indicando a diminuição do grupo S=O (PRASAD; RAO, 2012; BALAPURE et al., 2016) presentes em corantes reativos e corantes sulfurosos e em 1055 cm^{-1} , 1047 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} . Aravind et al. (2016) reportaram a presença da banda 1047 cm^{-1} (C-Cl) encontrada no corante reativo vermelho. Essa mesma banda poderia ser um indicativo do corante marinho reativo presente no ETS, o qual também possui ligações C-Cl. Essas bandas podem também, indicar vibrações de ligações C-O (DEVEOGLU et al., 2012; ARAVIND et al., 2016). A redução na intensidade das bandas indica uma possível quebra das ligações durante a biotransformação das moléculas de corantes.

Figura 30. Espectro de FTIR após Ensaio 12 (PB1) utilizando o fungo (*Marasmiellus* sp.) durante 7 dias, seguido pelas bactérias (*B. subtilis* e *D. maris*) por mais dois dias de cultivo a 28°C e 140 rpm. Além do controle sob as mesmas condições, mas sem o consórcio. Fonte: Elaborado pela autora.



A análise conjunta dos espectros de UV-Vis e FTIR do ensaio 12 (PB1) sugere a adsorção e degradação das moléculas dos corantes presentes no ETS. O ensaio 12 (PB1) continha extrato de malte 6 g L⁻¹, sacarose 6 g L⁻¹, sulfato de amônio 1 g L⁻¹, cloreto de cálcio 2 mM, carbonato de sódio 2 mM, cloreto de sódio 30 g L⁻¹ e os corantes (300 mg L⁻¹ de cada corante). Nessas mesmas condições de cultivo, foi observada uma considerável descoloração (71,39%) e biomassa seca (0,31g) após o tratamento com o consórcio.

De acordo com as análises de destoxificação com *A. fischeri* a toxicidade do Ensaio 12 (PB1) não diminuiu, o que pode ocorrer em processos de biotransformação, já que há quebra de ligações e formação de novas moléculas. Isso mostra que a diminuição da cor do corante não necessariamente significa a diminuição da toxicidade, tendo em vista que a degradação incompleta pode levar a formação de metabólicos tão tóxicos ou mais do que os compostos parentais, neste caso os corantes intactos (ALMEIDA; CORSO, 2014). Portanto, é evidente a necessidade de aplicação de análises de toxicidade utilizando diferentes bioindicadores nos estudos de biorremediação de corantes têxteis.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, o consórcio formado pelo fungo de origem marinha *Marasmiellus* sp. e pelas bactérias de reservatório de petróleo *B. subtilis* e *D. maris* tem potencial aplicação na descoloração e destoxificação de efluentes têxteis. Os micro-organismos do consórcio foram capazes de suportar as condições de um efluente têxtil sintético composto por 30 g L⁻¹ de NaCl, 300 mg L⁻¹ de cada corante e pH 8,0.

A estratégia utilizada no desenho experimental permitiu o aumento da porcentagem de descoloração de 41,22% (200 mg L⁻¹ de cada corante) no experimento com o consórcio microbiano (Estratégia 1) a 71,39% (300 mg L⁻¹ de cada corante), atingido na segunda validação experimental com o Ensaio 12 (PB1). Além disso, a destoxificação também foi otimizada, visto que no experimento com o fungo *Marasmiellus* sp. a EC₅₀ foi de 12,16% (Tabela 7) e no Ensaio 2 (PB2) da primeira validação experimental a EC₅₀ chegou a 27,56% (Figura 22), nas mesmas concentrações de corante (200 mg L⁻¹ de cada corante).

Os resultados obtidos demonstram a relevância dos testes de toxicidade na biorremediação de corantes têxteis e a importância de se trabalhar com bioindicadores de níveis tróficos distintos. Além disso, os compostos utilizados nos meios de cultivo devem ser previamente testados com o bioindicador escolhido para que se verifique a interferência que pode ser gerada nos resultados de toxicidade.

Os experimentos de validação confirmaram os resultados que poderiam ser considerados válidos nos planejamentos experimentais. Entretanto, visando detectar possíveis interferências nos bioprocessos, esta validação deve ser realizada após cada experimento envolvendo muitas variáveis. As análises de UV-Vis e FTIR permitiram a inferência de processos de adsorção e a biotransformação dos corantes têxteis estudados.

Foi possível observar que nem sempre há relação direta entre a descoloração e a destoxificação.

Os resultados do presente trabalho evidenciam a relevância de micro-organismos derivados de ambientes marinhos para biorremediação de efluentes têxteis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL – ABDI. Estudo prospectivo setorial têxtil e confecção. Brasília: ABDI, 2009.
- ALMEIDA, E. J. R. Estudo da biorremediação dos azos corantes têxteis Acid Blue 161 e Procion Red MX-5B por fungos filamentosos em solução simples e solução binária associado a testes de toxicidade com *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. Rio Claro, 2013. Dissertação de Mestrado, 163f. Universidade Estadual Paulista, 2013.
- ALMEIDA, E. J. R.; CORSO, C. R. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, v. 112, p. 317–322, out. 2014.
- AL-PROL, A. E.; KHALID M. EL-MOSELHY, MAGDI ABDEL AZZEM KAMEL, ADEL AMER AND MAHMOUD ABDEL-MONEIM. Bioremediation of Reactive Blue 19 and Reactive Black 5 from Aqueous Solution by using Fungi *Aspergillus niger*. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.** 6(3): 1676-1686, 2017.
- ANDLEEB, S.; ATIQ, N.; ALI, M. I.; RAZI-UL-HUSSNAIN, R.; SHAFIQUE, M.; AHMAD, B.; GHUMRO, P. B.; HUSSAIN, M.; HAMEED, A.; AHMAD, S. Biological treatment of textile effluent in stirred tank bioreactor. **International journal of agriculture and biology**, n. 12, p. 256–260, 2010.
- ARAVIND, P.; SELVARAJ, H.; FERRO, S.; SUNDARAM, M. (2016). An integrated (electro- and bio-oxidation) approach for remediation of industrial wastewater containing azo dyes: Understanding the degradation mechanism and toxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, n. 318, p. 203–215, 2016.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7–8, p. 602–605, 2001.
- ARSLAN-ALATON, I.; GURSOY, B. H.; SCHMIDT, J. E. Advanced oxidation of acid and reactive dyes: Effect of Fenton treatment on aerobic, anoxic and anaerobic processes. **Dyes and Pigments**, v. 78, p. 117-130, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E CONFECÇÃO. Quem somos: muito mais força para o setor e para o brasil. Disponível em: <<http://www.abit.org.br/>>. Acesso em: 07 jan. 2019.
- BABU, S. S; MOHANDASS, C; VIJAYARAJ, A. S; DHALE, M. A. Detoxification and color removal of Congo Red by a novel *Dietzia* sp.(DTS26)–a microcosm approach. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 114, p. 52-60, 2015.
- BALAPURE, K.; JAIN, K.; BHATT, N.; MADAMWAR, D. Exploring bioremediation strategies to enhance the mineralization of textile industrial wastewater through sequential anaerobic-microaerophilic process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 106, 97–105, 2016.

- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723–736, 2005.
- BAZANELLA, G. C. S.; ARAÚJO, C. A. V. A.; CASTOLDI, R.; MACIEL, G. M.; INÁCIO, F. D.; SOUZA, C. G. M.; ADELAR BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Ligninolytic Enzymes from White-rot Fungi and 258 Application in the Removal of Synthetic Dyes. In **Fungal enzymes: progress and prospects**. Boca Raton, FL. CRC Press Taylor & Francis Group, p. 258-265, 2014.
- BEDOUI, A; TIGINI, V; GHEDIRA, K; VARESE, G. C; GHEDIRA, L. C. Evaluation of an eventual ecotoxicity induced by textile effluents using a battery of biotests. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(21), 16700–16708. 2015.
- BIROLLI, W. G; Alvarenga N; Selegim, M. H; Porto, A. L. Biodegradation of the Pyrethroid Pesticide Esfenvalerate by Marine-Derived Fungi. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 511–520, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C., VIEIRA, G. A. L., COLLINS, C., FERNANDES, T. C. C., MARIN-MORALES, M. A., MURRAY, P., SETTE, L. D. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659–8668, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DOS SANTOS VASCONCELOS, M. R.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal biology**, v. 114 n. 10, p. 863-872, 2010.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333–2345, 2012.
- BONUGLI-SANTOS, R. C; DURRANT, L. R.; DA SILVA, M; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32–37, 7 jan. 2010.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA**. Resolução do CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

- BUGG, T. D. H; AHMAD, M; HARDIMAN, E. M; RAHMANPOUR, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural product reports**, v. 28 n. 12, p. 1883-1896, 2011.
- BUSTOS-OBREGON, E.; VARGAS, Á. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. **Biological Research**, v. 43, p. 357–362, 2010.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus)* edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 15 abr. 1995.
- CAPOTORTI, G; DIGIANVINCENZO, P; CESTI, P; BERNARDI, A; GUGLIELMETTI, G. Pyrene and benzo (a) pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. **Biodegradation**, v. 15, n. 2, p. 79–85, 2004.
- CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 324–333, 1997.
- CHA; CH-J.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of Malachite Green by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Appl Environ Microbiol**, n. 67, p. 4358 4360, 2001
- CHAKRABORTY, J. N. Sulphur dyes. In **Handbook of textile and industrial dyeing, Volume 1: Principles, processes and types of dyes**. Woodhead Publishing Series in Textiles, n. 116, cap. 14, p. 469, 2011.
- CHRISTIE, R. M. Why is indigo blue? **Biotechnic & Histochemistry**, v. 82 n. 2, p. 51 56, 2007.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA (CNI). Estatísticas: A Indústria em Números. Disponível em: <<http://www.portaldaindustria.com.br>>. Acesso em: 1 maio 2017.
- DAS, P; BANERJEE, P; ZAMAN, A; BHATTACHARYA, P. Biodegradation of two azo dyes using *Dietzia* sp. PD1: process optimization using response surface methodology and artificial neural network. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n.16, p. 7293-7301, 2015.
- DAS, S.; DASH, H. R. Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, **Elsevier**, p. 15, 2014.
- DASH, H. R; MANGWANI, N; CHAKRABORTY, J; KUMARI, S; DAS, S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 561–571, 2013.

- DAVE, S. R.; PATEL, T. L.; TIPRE, D. R. Bacterial Degradation of Azo Dye Containing Wastes In Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters. **Springer, Switzerland**, p. 61, 2015.
- DAWKAR, V. V.; JADHAV, U. U.; GHODAKE, G. S.; GOVINDWAR, S. P. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy Blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. **Biodegradation**, n. 20, p. 777-787, 2009.
- DELLAGNEZZE, B. M.; VASCONCELLOS, S. P.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; SANTISI, S.; CAPPELLO, S.; & OLIVEIRA, V. M. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 1, p. 107–117, 15 jun. 2016.
- DELLAGNEZZE, B. M.; DE SOUSA, G. V.; MARTINS, L. L.; DOMINGOS, D. F.; LIMACHE, E. E. G.; DE VASCONCELLOS, S. P.; DA CRUZ, G. F.; DE OLIVEIRA, V. M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1–2, p. 191–200, 15 dez. 2014.
- DENIZ, F. Optimization of Biosorptive Removal of Dye from Aqueous System by Cone Shell of Calabrian Pine. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- DEVEOGLU, O.; CAKMAKCI, E.; TASKOPRU, T.; TORGAN, E.; KARADAG, R. Identification by RP-HPLC–DAD, FTIR, TGA and FESEM–EDAX of natural pigments prepared from *Datisca cagnabina* L. **Dyes Pigm.** n. 94, p. 437–442, 2012.
- DHARAJIYA, D.; SHAH, M.; B. BAJPAI, B. Decolorization of simulated textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium* and *Aspergillus fumigatus* A23. **Nature Env. Pollut. Technol.** n. 15 (3), p. 825–832, 2016.
- DUARTE, L. A. Destoxificação de petróleo e óleo diesel por consórcios microbianos de origem marinha. Rio Claro, 2016. Dissertação de mestrado, 96f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.
- DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D’ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 31, s.n, p. 907–931, 2002.
- EL MAHDI, A.; AZIZ, H. A. Hydrocarbon Biodegradation Using Agro-Industrial Wastes as Co-Substrates. **In Handbook of Research on Inventive Bioremediation Techniques**, IGI Global, p.155 – 185, 2017.
- ESTEVEES, M. F. Corantes sulfurosos: análise e tingimento por técnicas electroquímicas. Portugal, 2000. Tese de doutorado, 259f. Universidade do Minho, 2000.
- FERREIRA, P. C. Estudos sobre a adsorção do corante reativo preto 5 de solução aquosa usando zeólita de cinzas de carvão. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

- FORGACS, E.; CSERHATI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment international**, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.
- FUENTES, S; MÉNDEZ, V; AGUILA, P; SEEGER, M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781–4794, 2014.
- GIOIA, L; OVSEJEVI, K; MANTA, C.; MÍGUEZ, D.; MENENDEZ, P.V. Biodegradation of acid dyes by an immobilized laccase: an ecotoxicological approach. **Environmental Science: Water Research & Technology**, 4, 2125. 2018
- GIROTTI, S.; FERRI, E. N.; FUMO, M. G.; MAIOLINI, E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, n. 1, p. 2–29, 4 fev. 2008.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M. V. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23(1), p. 71-78, 2000.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, **J. Hazard. Mater.** 169 (2009) 1–15.
- HASHEM, R.A., SAMIR, R., ESSAM, T.M., ALI, A.E., AND AMIN, M.A., 2018, Optimization and enhancement of textile reactive remazol black B decolorization and detoxification by environmentally isolated pH tolerant *Pseudomonas aeruginosa* KY284155. **AMB Express** 8(1), 83.
- HUBBE, M. A.; BECK, K. R.; O'NEAL, W. G.; SHARMA, Y. C. Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: A review. 2. Dyes. **BioResources**, v.7, n. 2, p. 2592-2687, 2012.
- IBRAHIM, N. A. Dyeing of textile fibre blends. In **Handbook of textile and industrial dyeing, Volume 2: Applications of dyes**. Woodhead Publishing Series in Textiles, n.117, cap. 4, p. 152, 2011.
- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.
- KESTER, D. R.; DUEDALL, I. W.; CONNORS, D. N.; PYTKOWICZ, R. M. Preparation of artificial seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 12, n. 1, p. 176–179, 1967.
- KHAN, R.; KHAN, Z.; NIKHIL, B.; JYOTI, D.; DATTA, M. Azo Dye Decolorization under Microaerophilic Conditions by a Bacterial Mixture Isolated from Anthropogenic Dye-Contaminated Soil. **Bioremediation Journal**, 18:2, 147-157, 2014.
- KHANDEGAR, V.; SAROHA, A. K. Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent—A review. **Journal of environmental management**, v. 128, p. 949, 963, 2013.
- KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. Marine Micology: The Higher Fungi. **Academic Press, New York**, 1979.

- KURADE, M. B.; WAGHMODE, T. R.; PATIL, S. M.; JEON, B.-H.; GOVINDWAR, S. P. Monitoring the gradual biodegradation of dyes in a simulated textile effluent and development of a novel triple layered fixed bed reactor using a bacterium-yeast consortium. **Chemical Engineering Journal**, n. 307, p. 1026-1036, 2017.
- LEELAKRIANGSAK, M.; BORISUT, S. Characterization of the decolorizing activity of azo dyes by *Bacillus subtilis* azoreductase Azo R1. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v.34, n. 5, p. 509-516, 2012.
- LEME, D. M.; DE LAPUENTE, J.; BRITO, L. B.; PORREDÓN, C.; RODRIGUES, L. B.; BRULL, N.; SERRET, J. T.; BORRÀS, M.; DISNER, G. R.; CESTARI, M. M.; OLIVEIRA, D. P. A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. **Chemico-Biological Interactions**, 291, 171–179, 2018.
- LEME, D. M.; OLIVEIRA, G. A. R.; DE MEIRELES, G.; BRITO, L. B.; RODRIGUES, L.; DE B.; DE OLIVEIRA, D. P. Eco- and Genotoxicological Assessments of Two Reactive Textile Dyes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 78(5), 287–300, 2015.
- LEONOWICZ, A.; CHO, N. S.; JOLANTA LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, Nova Iorque, v. 41, [s.n], p.185-227, 2001.
- MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian journal of microbiology**, v. 37, n. 4, p. 481-487, 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock biology of microorganisms, 10th ed. **Prentice-Hall Inc.**, Simon & Schuster/A Viacom Company, Upper Saddle River, New Jersey, 2003.
- MAGRINI, M.J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. Campinas, 2012. Dissertação de mestrado, 91f. Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- MAHAPATRA, N. N. Textile Dyes. Woodhead Publishing India PVT LTD - **India: CRC Press**; Reactive dyes, p. 175, 2016.
- MANAI, I.; MILADI, B.; EL MSELMI, A.; SMAALI, I.; BEN HASSEN, A.; HAMDY, M.; BOUALLAGUI, H. Industrial textile effluent decolourization in stirred and static batch cultures of a new fungal strain *Chaetomium globosum* IMA1 KJ472923. **Journal of Environmental Management**, n. 170, p. 8–14, 2016.
- MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R. & SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological research**, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

- MOLNÁR, M.; GRUIZ, K.; HALÁSZ, M. Integrated methodology to evaluate bioremediation potential of creosote-contaminated soils. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 51, n. 1, p.23, 2007.
- MORAES, J.R.; BIDOIA, E.D. Colour Degradation of Simulated Textile Effluent by Electrolytic Treatment and Ecotoxicological Evaluation. **Water, Air, & Soil Pollution**, 226 (12), 2015
- MOREIRA-NETO, S. L.; MUSSATTO, S. I.; MACHADO, K. M. G.; MILAGRES, A. M. F. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase producing basidiomycete's strains. **Letters in Applied Microbiology**, n. 56(4), p. 283-290, 2013.
- OSTERHAGE C. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi. Tese de Doutorado. Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha, 2001.
- OTERO, I. V. R.; FERRO, M.; BACCI, MAURÍCIO; FERREIRA, H.; SETTE, L. D. De novo transcriptome assembly: a new laccase multigene family from the marine derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **AMB Express**, v. 7, p. 222, 2017.
- PAIVA, C. K. C. Produção de lacase por fungo isolado de sedimento marinho. Rio Claro, 2016. Trabalho de formatura, 37f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.
- PAIVA, H.; A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SQUINA, F. M.; ADALBERTO; SETTE, L.D. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal Biology**, v. 122, p. 302-309, 2018.
- PAŹDZIOR, K., WRĘBIAK, J., KLEPACZ-SMÓŁKA, A., GMUREK, M., BILIŃSKA, L., KOS, L., LEDAKOWICZ, S. (2017). Influence of ozonation and biodegradation on toxicity of industrial textile wastewater. **Journal of Environmental Management**, 195, 166–173.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.
- PRASAD, A. S. A.; RAO, K. V. B. Aerobic biodegradation of Azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616; an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 97(16), p. 7469–7481, 2012.
- PRZYSTAŚ, W.; ZABŁOCKA-GODLEWSKA, E.; GRABIŃSKA-SOTA, E. Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 4, p.1581-1592, 2012.
- REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. Synthetic dye decolorization by *Ganoderma* sp. WR 1. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 775-780, 2007.

- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2a. Campinas, SP, 2009.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, 27(2), 185–194, 2009.
- SARATALE, R.G.; SARATALE, G. D.; KALYANI, D. C.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. **Bioresour Technol** 100:2493–2500, 2009.
- SAROJ, S.; DUBEY, S.; AGARWAL, P.; PRASAD, R. & SINGH, R. P. Evaluation of the efficacy of a fungal consortium for degradation of azo dyes and simulated textile dye effluents. **Sustainable Water Resources Management**, v. 1, n. 3, p. 233-243, 2015.
- SETTE, L. D.; BUNUGLI-SANTOS. Ligninolytic enzymes from marine- derived fungi: production and applications. In TRINCONI, A. **Marine enzymes for biocatalysis: sources, biocatalytic characteristics and bioprocesses of marine enzymes**. Elsevier, cap. 15, p. 410-411, 2013.
- SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823-832, 2007.
- SHUIB, F. N. S.; HUSAINI, A.; ZULKHARNAIN, A.; ROSLAN, H. A.; GUAN, T. M. Optimization of Physiochemical Parameters during Bioremediation of Synthetic Dye by *Marasmius cladophyllus* UMAS MS8 Using Statistical Approach. **The Scientific World Journal**, 1–7, 2016.
- SIGMA ALDRICH. **Reactive blue 4: dye content 35 %**. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/244813?lang=pt@ion=br>. Acesso em: 14 jun. 2017.
- SOUSA, M. M.; MIGUEL, C.; RODRIGUES, I.; PAROLA, A. J.; PINA, F.; SEIXAS DE MELO, J. S.; MELO, M. J. A photochemical study on the blue dye indigo: from solution to ancient Andean textiles. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 11, p. 1353-1359, 2008.
- SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. **J Environ Manage** 91:1915–1929, 2010.
- TEERII, T.; HENRIKSSON, G. Enzymes degrading wood components. In: **Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1**, Wood Chemistry and Wood Biotechnology, cap. 11, pp. 245-270, 2009.
- THE TEXTILE INSTITUTE. **Environmental aspects of textile dyeing: Environmentally responsible dye application**. Cambridge, United Kingdom: **Woodhead Publishing Limited**, 256 p, 2007.
- TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000.

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. Toxic substances control act test guidelines: **Environmental effects testing guidelines**. Code of Federal Regulations 40. Part 797. Fed. Regist. 50 (188), 1985.
- VASCONCELLOS, S. P., DELLAGNEZZE, B. M., WIELAND, A., KLOCK, J.-H., SANTOS NETO, E. V., MARSAIOLI, A. J. & MICHAELIS, W. The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1513–1518, 2011.
- VASCONCELOS, M. R. S. Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais. São Paulo, 2015. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2015.
- VIEIRA, G. A. L. Destoxificação e descoloração de poluentes ambientais por consórcios microbianos marinhos. Rio Claro, 2016. Tese de doutorado, 138f. Universidade Estadual Paulista, 2016.
- VIEIRA, GABRIELA A.L; MAGRINI, MARIANA JUVENTINA; BONUGLI-SANTOS, RAFAELLA C; RODRIGUES, MARILI V.N; SETTE, LARA D. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes: optimization of the degradation process. **Brazilian journal of microbiology**, JCR v. 49, p. 749-756, 2018.
- WANG B. E; HU Y. Y. Bioaccumulation versus adsorption of reactive dye by immobilized growing *Aspergillus fumigatus* beads. **J Hazard Mater** 157:1–7, 2008.
- WANG G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33 n. 7, p. 545–551, 2006.
- WANG, J; GAO, F; LIU, Z; QIAO, M; NIU, X; ZHANG K. Q; HUANG, X. Pathway and molecular mechanisms for malachite green biodegradation in *Exiguobacterium* sp. MG2. **Plos one** 7: e51808, 2012.
- WANG, X. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, n. 44, p. 1711-1721, 2001.
- ZERO DISCHARGE OF HAZARDOUS CHEMICALS - ZDHC. Textile Industry Wastewater Discharge Quality Standards: Literature Review. **Leaders in advancing Environmental Responsibility**, 2016.

APÊNDICE A - Plackett & Burman de 16 ensaios (PB 16) e 11 fatores. Os ensaios 17 a 19 correspondem aos pontos centrais. Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio	1. Inóculo <i>Marasmiellus</i> sp. (cilindros)	2. Inóculo <i>B. subtilis</i> (UFC mL ⁻¹)	3. Inóculo <i>D. maris</i> (UFC mL ⁻¹)	4. Extrato de malte (g L ⁻¹)	5. Sacarose (g L ⁻¹)	6. Extrato de levedura (g L ⁻¹)	7. (NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	8. KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	9. CaCl ₂ (mM)	10. NaCO ₃ (mM)	11. Efluente (mg L ⁻¹)
1	5	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	0	6	0	0	2	2	0	900
2	5	1,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	0	0	1	0	0	2	2	300
3	5	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	0	0	0	1	0	0	2	900
4	5	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	6	0	0	0	2	0	0	900
5	1	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	6	6	0	0	0	2	0	300
6	5	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	6	6	1	0	0	0	2	300
7	1	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	6	6	1	1	0	0	0	900
8	5	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	0	6	1	1	2	0	0	300
9	5	1,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	6	0	1	1	2	2	0	300
10	1	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	0	6	0	1	2	2	2	300
11	1	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	6	0	1	0	2	2	2	900
12	5	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	6	6	0	1	0	2	2	900
13	1	1,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	0	6	1	0	2	0	2	900
14	1	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	0	0	1	1	0	2	0	900
15	1	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	6	0	0	1	2	0	2	300
16	1	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	300
17	3	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	3	3	0,5	0,5	1	1	1	600
18	3	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	3	3	0,5	0,5	1	1	1	600
19	3	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	3	3	0,5	0,5	1	1	1	600

APÊNDICE B - Plackett & Burman de 12 ensaios (PB 16) e 8 fatores. Os ensaios 13 a 15 correspondem aos pontos centrais. Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio	1. Inóculo <i>Marasmiellus</i> sp. (cilindros)	2. Inóculo <i>B. subtilis</i> (UFC mL ⁻¹)	3. Inóculo <i>D. maris</i> (UFC mL ⁻¹)	4. Extrato de malte (g L ⁻¹)	5. Sacarose (g L ⁻¹)	6. (NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	7. KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	8. CaCl ₂ (mM)
1	5	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	3	0	0	3	3
2	5	1,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	9	0	0	0	3
3	1	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	3	6	0	0	0
4	5	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	9	0	2	0	0
5	5	1,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	9	6	0	3	0
6	5	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	3	6	2	0	3
7	1	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	9	0	2	3	0
8	1	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	9	6	0	3	3
9	1	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	9	6	2	0	3
10	5	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	3	6	2	3	0
11	1	1,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	3	0	2	3	3
12	1	0,5 x 10 ⁷	0,5 x 10 ⁷	3	0	0	0	0
13	3	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	6	3	1	1,5	1,5
14	3	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	6	3	1	1,5	1,5
15	3	1,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	6	3	1	1,5	1,5

APÊNDICE C – DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com 8 ensaios. Os ensaios de 9 a 11 correspondem aos pontos centrais. Fonte: Elaborado pela autora.

Ensaio	1. Extrato de malte (g L ⁻¹)	2. CaCl ₂ (mM)
1	5,67	1,58
2	12,33	1,58
3	5,67	4,42
4	12,33	4,42
5	4,50	3,00
6	13,50	3,00
7	9,00	1,00
8	9,00	5,00
9	9,00	3,00
10	9,00	3,00
11	9,00	3,00