



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Brasil

SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R.

DEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE AREIA
FENÓLICA

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 24, núm. 3, 2000, pp. 669-674

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180218342019>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

DEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE AREIA FENÓLICA⁽¹⁾

J. H. SILVA⁽²⁾ & R. T. R. MONTEIRO⁽³⁾

RESUMO

Microrganismos foram isolados de areia fenólica resultante de atividades metalúrgicas, utilizando meio mínimo para fungos e pentaclorofenol (PCF) como única fonte de carbono. Após quatro repiques sucessivos em intervalos de 15 dias de incubação, as culturas foram plaqueadas em meio de Martin. Três gêneros de fungos foram isolados e identificados como *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Penicillium* sp. Estes foram testados para degradar os corantes índigo e RBBR (Azul Brilhante de Remazol - R) e o organoclorado PCF. A descoloração do índigo foi de 99%, para *Paecilomyces* e *Penicillium*, e de 74%, para *Acremonium*, e a de RBBR foi de 16%, para *Penicillium*; 14%, para *Acremonium*, e 5%, para *Paecilomyces*. Usando azul de bromotimol como indicador de degradação de PCF, foram obtidos 24% de descoloração para *Acremonium*, 22%, para *Penicillium*, e 17%, para *Paecilomyces*. Utilizando cromatografia gasosa, detectou-se degradação de PCF de 69%, para *Penicillium*, 65%, para *Paecilomyces*, e 40% para *Acremonium*, respectivamente. Os resultados mostraram que foi possível isolar microrganismos de uma areia de fundição, altamente contaminada com fenóis, e os fungos isolados foram capazes de degradar PCF e outros xenobióticos testados.

Termos de indexação: biorremediação, seleção, pentaclorofenol, RBBR, índigo.

SUMMARY: *DEGRADATION OF XENOBIOTICS BY FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM PHENOLIC SANDS*

Microorganisms were isolated from phenolic sands resulting from metallurgic activities, using Minimal Medium for fungi containing pentachlorophenol (PCP) as the only carbon source. After four successive subcultures every 15 incubation days, the final culture was

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor. Projeto financiado pela FUNDUNESP/RHODIA. Recebido para publicação em abril de 1999 e aprovado em junho de 2000.

⁽²⁾ Mestre em Agronomia área Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ. Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 09, CEP: 13480-900 Piracicaba (SP). Bolsista da CAPES.

⁽³⁾ Pesquisadora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP. Av. Centenário 303, Caixa Postal 96, CEP: 13400-970 Piracicaba (SP). E-mail: monteiro@cena.usp.br

plated on Martin Medium Agar. Three different fungi were isolated and subsequently identified as Acremonium sp., Paecilomyces sp. and Penicillium sp.; which were tested for their ability to degrade: PCP, indigo dye and Remazol Brilliant Blue R (RBBR). The decolouration of indigo dye was 99% for Paecilomyces and Penicillium and 74% for Acremonium. The decolouration of RBBR was 16% for Penicillium, 14% for Acremonium and 5% for Paecilomyces. Using bromothymol blue as indicator of PCP degradation, 24% decolouration was obtained for Acremonium, 22% for Penicillium and 17% for Paecilomyces. Degradation of PCP measured by gas chromatography was 69% by Penicillium, 65% by Paecilomyces and 40% by Acremonium. The results indicated that filamentous fungi could be isolated from a highly phenol-contaminated area, and that these fungi were also able to degrade PCP and other xenobiotic compounds tested.

Index terms: bioremediation screening, RBBR, indigo, biodegradation, pentachlophenol.

INTRODUÇÃO

A descontaminação do ambiente, utilizando a habilidade natural dos organismos em mineralizar, transformar ou até mesmo combinar compostos poluentes com outras moléculas, é conhecida como biorremediação. Quando se utilizam microrganismos, seu isolamento e caracterização são pré-requisitos importantes para melhor conhecimento e otimização do processo.

Dentre os compostos poluentes, destacam-se os clorofenóis que foram, ao longo da história, um dos principais compostos químicos industrializados, sendo hoje detectados em solos, sedimentos, águas e alimentos, apresentando grande toxidez e poder de bioacumulação nos níveis tróficos superiores, além de serem recalcitrantes (Crosby, 1981; Paasavirta et al., 1985). Apesar de o pentaclorofenol (PCF) ser potente fungicida e bactericida, sua biodegradação pode ocorrer no ambiente ou em laboratório, sendo promovida por diversos grupos de microrganismos, aeróbios ou anaeróbios. Diversos fungos e bactérias que crescem com PCF como única fonte de carbono têm sido isolados (Silva, 1999).

A pré-exposição de solos a um composto químico poluente ou a composto quimicamente semelhante pode influenciar a velocidade de degradação deste composto, pela indução de enzimas específicas dos microrganismos presentes ou pelo aumento da população degradadora (Racke, 1990). Esse processo tem sido chamado de adaptação, o qual pode ser resultado de mudanças genéticas, fisiológicas ou ecológicas da comunidade microbiana. A adaptação microbiana a pesticidas é bastante evidente em solos que receberam repetidas aplicações de pesticidas (Racke, 1990). Tal adaptação foi também comprovada para compostos fenólicos em solos contaminados por produtos químicos industriais, onde uma linhagem de *Penicillium* foi isolada, podendo influir na velocidade de remoção desses contaminantes por meio da indução de enzimas específicas, do aumento

de certas comunidades ou mesmo pela mudança de populações microbianas ali presentes (Hofrichter et al., 1993).

Dentre os métodos de triagem para encontrar microrganismos com capacidade de degradar compostos de interesse, o método do enriquecimento é um dos mais recomendados (Cook et al., 1983; Melo & Azevedo, 1997), o qual, usualmente, utiliza o composto a ser degradado como fonte de um nutriente essencial em meio de cultura definido. Para isolamento de culturas degradadoras de organoclorados, podem-se utilizar também indicadores ácido-base, como azul de bromotímol, eosina ou azul de metíleno, os quais, quando incorporados ao meio, formam halo ou mudança de cor decorrente da liberação de íons cloreto.

A utilização de corantes poliméricos (por ex., Azul Brilhante de Remazol -R (RBBR)) como método de triagem, seja para identificar atividade lignolítica, seja para avaliar a capacidade em degradar xenobióticos, oferece uma série de vantagens, pois permite o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos simples, rápidos e quantitativos. Além disso, apresentam baixa toxidez para os microrganismos e sua natureza polimérica assegura que sua degradação, pelo menos nas etapas iniciais, ocorra extracelularmente (Glenn & Gold, 1983).

O presente estudo teve como objetivos isolar fungos filamentosos de uma área altamente contaminada com compostos fenólicos, por meio do método de enriquecimento, e testar a capacidade desses microrganismos em degradar um composto derivado do fenol (PCF) e outros altamente complexos e poliméricos, como os corantes RBBR e indigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de 3 kg de areia fenólica residiária de metalúrgicas que utilizam resinas fenólicas no

processo de fundição foram coletadas na região de Campinas (SP), próximo ao distrito de Souzas, em uma área de descarte de resíduos. Amostras foram secas ao ar, o suficiente para serem peneiradas em malha de 2 mm, sendo então homogeneizadas em sacos de polietileno. O teor de umidade foi determinado em 10 g, em três repetições, por secagem em estufa (105°C, 24 h). O número de microrganismos foi determinado pela técnica de diluição e plaqueamento em meios específicos a fungos (Martin, 1950), actinomicetos (peptona) e bactérias (Nutriente agar).

Nos diversos testes de degradação, foram utilizados: meio mínimo (MM), conforme Pontecorvo et al. (1953); MM modificado, acrescentando nutriente e reduzindo a glicose a 0,2%; MMB: acrescentaram-se 18 g de bagaço de cana triturado; MMC: acrescentou-se o corante têxtil índigo; MMR: acrescentou-se o corante RBBR (Sigma) a 0,02%; MMI: acrescentaram-se extrato de levedura a 0,05%, PCF a 4 mg L⁻¹ e azul de bromotimol a 0,02%; MMP: acrescentaram-se extrato de levedura a 0,05% e PCF em quantidades equivalentes à concentração final desejada no meio, conforme Stanlake & Finn (1982). Foram preparados 10 mL de uma solução estoque, utilizando 0,4 g de PCF; 2, 3, 4, 5, 6-pentaclorofenol (Merck - 98% de pureza) em NaOH (0,2 mol L⁻¹).

Para o isolamento de fungos, 100 g de areiafenólica seca foram colocados em frasco Erlenmeyer com capacidade de 2 L, contendo 900 mL de solução salina (0,89% v/v). Agitou-se mecanicamente por 10 min. Após repouso, durante 15 min, fez-se uma filtragem, desprezando-se os 200 mL iniciais (IBAMA, 1990). O filtrado foi centrifugado (centrífuga Bekman J2-HS) a 4.000 G e 8°C por 15 min, sendo o precipitado lavado com solução salina e ressuspensão em 11 mL da mesma solução e novamente centrifugado e ressuspensão. Desta suspensão, foi retirado 1 mL, para inocular frascos Erlenmeyer de 125 mL (tréplica) com 50 mL de meio MMP com PCF a 2 mg L⁻¹. Os frascos foram incubados em agitador (New Brunswick Sc. Co. Inc.) a 150 rpm, no escuro, a 29°C. Foram realizados quatro repiques sucessivos, em intervalo de 15 dias, de 1 mL para frascos novos que continham meio MMP com PCF (2 mg L⁻¹). A seguir, após cada 15 dias de incubação, a partir do último repique, aumentou-se a concentração de PCF até 80 mg L⁻¹, observando-se crescimento nas concentrações de 4, 20 e 40 mg L⁻¹. Transferiu-se 0,1 mL do último repique para placas de Petri com meio de Martin que continha 4 mg L⁻¹ de PCF, para o isolamento dos fungos, sendo as placas incubadas em estufa incubadora (BOD) a 29°C.

O inóculo para a manutenção das culturas e realização dos testes de degradação constituiu-se de discos contendo micélio, esporos e meio de cultura, retirados com um cortador de metal de 5 mm de diâmetro das bordas das colônias desenvolvidas em meio de Martin, durante 7 dias.

A biomassa fúngica formada foi determinada por meio da filtragem da cultura em sistema de vácuo, utilizando papel de filtro (Whatman nº 1) previamente pesado. O filtrado e o filtro foram secos por 2 h em estufa a 105°C.

Para o teste de degradação do corante índigo, frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio MMC foram inoculados em tréplica e incubados juntamente com os controles, não inoculados, em agitador com temperatura controlada a 150 rpm e 29°C, no escuro. Após sete dias de incubação, foram realizadas medidas de biomassa e descoloração por espectrofotometria a 580 nm, como recomendado por Balan (1998).

A degradação do corante polimérico RBBR foi testada, utilizando inóculos preparados em MMB que continham bagaço de cana como fonte de carbono (lignina e hemicelulose), para ativar o sistema lignolítico. Frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio MMR foram incubados, em tréplica, em agitador a 150 rpm e 29°C, no escuro. Após sete dias de incubação, foram efetuadas medidas de biomassa e de absorvância a 595 nm (Glenn & Gold, 1983).

A degradação do PCF foi avaliada por dois métodos: pelo método descrito por Saber & Crawford (1985), utilizando azul de bromotimol como indicador de pH, e por cromatografia gasosa, medindo sua dissipaçao. O primeiro baseia-se na mudança de coloração do meio de azul esverdeado para amarelo devido à liberação de íons cloreto do anel fenólico do PCF. Frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio MMI com 5 mg L⁻¹ de PCF foram inoculados e, em seguida, vedados com filme plástico, evitando-se, assim, a perda de compostos voláteis. O mesmo foi feito para os controles, sem inóculo. Após sete dias de incubação a 29°C, foram determinados a alteração da cor (visual); pH; absorvância por espectrofotometria (318 nm) e biomassa formada.

Para o outro método de degradação do PCF, utilizou-se 1 mL de cultura crescida em meio de Martin com 4 mg L⁻¹ de PCF como inóculo de frascos Erlenmeyer de 125 mL (tréplica), que continham 25 mL de meio MMP com 4 mg L⁻¹ de PCF. Estes foram incubados em agitador com temperatura controlada, a 150 rpm e 29°C, no escuro. Após 20 dias, adicionaram-se 40 µL de H₂SO₄ concentrado para estacionar o crescimento e lisar as células. A extração do PCF foi realizada pelo método em fase sólida (Liska et al., 1989), utilizando colunas C18 (Alltech, USA) de 6 mL preenchidas com 500 mg de adsorvente. O extrato foi previamente derivatizado por metilação (Aioldi, 1997). A determinação do PCF foi realizada no Instituto de Química de São Carlos/USP, em cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5890 série II, equipado com detector de captura de elétrons (ECD/⁶³Ni) e injetor "split". As condições de operação foram: coluna SP2330 (90% bis-cianopropil / 10% fenil cianopropil polissiloxano), com dimensões de

30 m x 0,25 mm x 0,20 µm; temperatura do injetor: 280°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: H₂, 1 mL min⁻¹; programação de temperatura: 160-230°C (1°C min⁻¹); razão de "split" 1:15; volume injetado: 1 µL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microrganismos do resíduo areia fenólica revelaram conter em termos de unidade formadora de colônia por grama de solo: 1,5 x 10⁸, para bactérias; 5 x 10², para actnomicetos, e 7 x 10², para fungos, sendo, portanto, um resíduo rico em microrganismos resistentes a compostos fenólicos.

Os quatro repiques sucessivos em meio MM contendo 4 mg L⁻¹ de PCF como única fonte de carbono permitiram o isolamento de três linhagens de fungos. Posteriormente, os isolados foram identificados, no Instituto de Botânica de São Paulo, como sendo: *Acremonium* sp, *Paecilomyces* sp e *Penicillium* sp.

Fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros *Mucor*, *Paecilomyces*, *Demamatium*, *Monila*, *Homodendrum*, *Geotrichum* e *Alternaria* com capacidade de degradar fenóis, foram também isolados de areia fenólica de fundição por Teixeira (1993).

Pesquisas com degradação de poluentes industriais indicaram que o crescimento dos microrganismos degradadores em condições limitantes de nutrientes orgânicos modula a resposta adaptativa (Racke, 1990). Dessa forma, os testes de degradação de compostos xenobióticos foram realizados com redução de 10% da fonte de carbono do meio.

Os fungos *Paecilomyces* sp. e *Penicillium* sp. conseguiram descolorir, significativamente, o corante índigo (99% com relação ao controle). *Acremonium* sp. também reduziu significativamente o corante (74%) (Quadro 1).

Apesar de RBBR apresentar uma estrutura molecular complexa, os fungos mostraram-se capazes de degradar (descolorir) este corante (Quadro 1). *Paecilomyces* foi o que apresentou a menor percentagem (4,75%) de descoloração, seguido por *Acremonium* (14%) e *Penicillium* (16%).

Comparando os resultados de biomassa formada para os três fungos, percebe-se que não há toxidez dos corantes índigo ou RBBR. Para que a degradação ocorra, além de apresentar uma quantidade de biomassa satisfatória, é necessário que o fungo apresente um sistema enzimático capaz de degradar o composto. O corante RBBR é também utilizado para quantificar enzimas ligninolíticas (Glenn & Gold; 1983) e poluentes orgânicos (Field et al., 1993). A degradação desses dois corantes, embora pertençam a classes diferentes (antraquinona e índigo), ocorre por meio das enzimas fenol-oxidases (peroxidases, tirosinases e lacases). Essas enzimas são, em sua maioria, extracelulares e produzidas durante o metabolismo secundário, sendo induzidas pelo substrato (Glenn & Gold, 1983). Hoje, sabe-se que as lacases são as principais enzimas responsáveis pela degradação do corante índigo (Wong & Yu, 1999).

Pasti-Grigsby et al. (1992) relataram que não só a variação na complexidade da estrutura de vários corantes e a sua concentração influenciam a capacidade de degradação, mas também que alguns corantes podem ser adsorvidos à massa micelial. Os resultados de estudos com basidiomicetos por Dietrich et al. (1995) mostraram que o primeiro passo para a biodegradação somente ocorre quando substrato e sítios reativos entram em contato, sendo o corante primeiramente adsorvido às hifas para depois ocorrer a degradação.

No presente estudo, parte dos corantes foi prontamente retirada do meio de cultura, ficando aderida ao micélio. Então, foi realizado um teste, utilizando o corante no meio não inoculado e com inóculo morto por esterilização em autoclave. Em

Quadro 1. Absorvância, percentagem de descoloração dos corantes índigo e RBBR em MMC e MMR, respectivamente, e biomassa (± desvio-padrão), após sete dias de incubação a 29°C sob agitação

| Fungo | Absorvância 580 nm | Descoloração (%) Índigo | Biomassa mg | Absorvância 595 nm | Descoloração (%) RBBR | Biomassa mg |
|------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|-----------------------|--------------------------|----------------|
| <i>Paecilomyces</i> sp | 0,031 a | 99,70 | 36,2 ± 0,9 | 1,751 b | 4,75 | 33,9 ± 0,4 |
| <i>Penicillium</i> sp | 0,048 a | 99,11 | 44,9 ± 0,5 | 1,539 a | 16,28 | 35,7 ± 0,6 |
| <i>Acremonium</i> sp | 0,750 b | 74,52 | 36,8 ± 0,2 | 1,583 a | 13,88 | 35,8 ± 0,7 |
| CT ⁽¹⁾ | 3,010 c | - | - | 2,060 c | - | - |

Os valores representam a média de três repetições. Valores de absorvância com mesmo expoente não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

⁽¹⁾ Meio sem inóculo, diluído 10x para leitura.

ambos os casos, o corante permaneceu no meio, mostrando que o desaparecimento não foi devido somente à adsorção ao micélio, mas também à ação metabólica dos fungos.

Por indicação do azul de bromotimol, os resultados evidenciaram a potencialidade dos três fungos isolados em degradar o PCF, uma vez que todos alteraram a cor do meio de azul esverdeado para amarelo, considerando a liberação de íons Cl^- no meio (Quadro 2).

Como estes fungos foram isolados em meio que continha PCF como única fonte de carbono, já eram esperados um bom crescimento e a presença de degradação, sendo, portanto, esta relacionada com a biomassa formada.

Utilizando a cromatografia gasosa (CG), calculou-se a concentração do controle, comparando as áreas do pico apresentadas no controle e no padrão. O padrão apresentou para 5 mg L⁻¹ um pico com área 667.823, equivalente a 100%. Os valores para os tratamentos foram calculados pela comparação das áreas obtidas em cada pico para cada tratamento, com a área 585.143 equivalente a 4,38 mg L⁻¹ do controle correspondendo a 100% (Quadro 3).

Penicillium apresentou percentagem de degradação do PCF por volta de 70%, seguido por *Paecilomyces* (64%), não diferindo estas taxas estatisticamente. Já o fungo *Acremonium* apresentou a menor percentagem (40%) de degradação (Quadro 3), tendo sido todos os tratamentos significativamente diferentes em relação ao controle. Uma vez que PCF foi utilizado como fonte de carbono para obtenção de energia e biomassa, a capacidade dos fungos de degradá-lo foi demonstrada. Os dois testes de degradação de PCF não foram comparáveis, visto ser o azul de bromotimol qualitativo e CG quantitativo. Houve também diferença entre a composição do meio de cultura e tempo de incubação.

CONCLUSÃO

1. É possível isolar fungos filamentosos de areias fenólicas, com potencial em degradar compostos xenobióticos, como PCF e os corantes índigo e RBBR.

Quadro 2. Descoloração do PCF por indicação do azul de bromotimol e biomassa (\pm desvio-padrão), após sete dias de incubação a 30°C

| Fungo | Cor | pH | Absorvância | Descoloração | Biomassa |
|-------------------------|-----|-----|-------------|--------------|---------------------|
| | | | 318 nm | % | mg |
| <i>Paecilomyces</i> sp. | + | 6,8 | 1,226 | 16,72 | 35,76 (\pm 0,66) |
| <i>Penicillium</i> sp. | + | 6,7 | 1,145 | 22,06 | 43,50 (\pm 0,4) |
| <i>Acremonium</i> sp. | + | 6,8 | 1,113 | 24,32 | 54,98 (\pm 0,86) |
| CT ⁽¹⁾ | - | 7,0 | 1,430 | - | |

⁽¹⁾ meio sem inóculo, diluído 10x para leitura. Os valores representam a média de três repetições; (+) amarelo; (-) azul.

Quadro 3. Média das áreas dos picos formados; percentagem de degradação do PCF e concentração de PCF restante no meio, após 20 dias de incubação sob agitação, no escuro a 30°C

| Fungo | Área | Degradação | PCF |
|-------------------------|-----------|------------|--------------------|
| | | % | mg L ⁻¹ |
| <i>Paecilomyces</i> sp. | 202.932 a | 64,4 | 1,56 |
| <i>Penicillium</i> sp. | 179.895 a | 69,2 | 1,35 |
| <i>Acremonium</i> sp. | 349.188 b | 40,4 | 2,61 |
| CT ⁽¹⁾ | 585.143 c | - | 4,38 |
| Padrão PCF | 667.823 | - | 5,00 |

⁽¹⁾ Meio sem inóculo. Áreas com mesmo expoente não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste t.

LITERATURA CITADA

- AIROLDI, F.P.S. Determinação de pentachlorofenol e hexaclorobenzeno em solo contaminado por resíduos industriais. São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997. 70p. (Tese de Mestrado)
- BALAN, D.S.L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis: corante índigo. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 1998. 130p. (Tese de Doutorado)
- COOK, A.M.; GRORSEN BACHER, H. & HUTTER, R. Isolation and cultivation of microbes with biodegradative potential. *Experientia*, 39:1191-1198, 1983.
- CROSBY, D.G. Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl. Chem.*, 53:1051-1080, 1981.

- DIETRICH, D.; HICKEY, W.J. & LAMAR, R. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.*, 61:3904-3909, 1995.
- FIELD, J.A.; DEJONG, E.; FEIJOOCOSTA, G. & DEBONT, J.A.M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.*, 11:44-49, 1993.
- GLENN, J.K. & GOLD, M.H. Decolorization of several dyes by a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.*, 45:1741-1747, 1983.
- HOFRICHTER, M.; GUNTHER, T. & FRITSCHE, W. Metabolism of phenol, choro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 712 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation*, 3:415-421, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. 2.ed. Brasília, 1990. 351p.
- LISKA, I.; KRUPICK, J. & LECLERQ, P.A. The use of solid sorbents for direct accumulation of organic-compounds from water matrices - A review of solid-phase extraction techniques. *J. High Resol. Chromatog.*, 12:577-590, 1989.
- MARTIN, J.P. Use of acids rose-bengall and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 134:215-232, 1950.
- MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L., eds. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. p.167-183.
- PAASIVIRTA, J.; HEINOLA, K. & HUMPPPI, T. Polychlorinated phenols, guaiacols, and catechols in environment. *Chemosphere*, 14:469-491, 1985.
- PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L. & CRAWFORD, R.L. Influence of aromatic substitution patterns an azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.*, 58:3605-3613, 1992.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HERMONS, L.M.; McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953.
- RACKE, D.K.. Implications of enhanced biodegradation for the use and study of pesticides in the soil environment. In: RACKE, D. K. & COATS, J.R., eds. *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington, DC, ACS, 1990. p.269-282. (ACS Symposium Series, 426)
- SABER, D.L. & CRAWFORD, R.L. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strains that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:1512-1518, 1985.
- SILVA, J.H. Isolamento e caracterização de fungos filamentosos capazes de degradar pentaclorofenol (PCF). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 1999. 70p. (Tese de Mestrado)
- STANLAKE, G.J. & FINN, R.K. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:1421-1427, 1982.
- TEIXEIRA, C.E. Ensaios de tratabilidade de resíduo sólido industrial - areia fenólica: isolamento, identificação e seleção de fungos filamentosos. Campinas, Universidade de Campinas, 1993. 108p. (Tese de Mestrado)
- WONG, Y. & YU, J. Laccase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.*, 33:3512-3520, 1999.