

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**DIANNY CAROLYNE VASCONCELOS DA SILVA LISBOA**

**BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LAVANDERIAS TÊXTEIS POR  
ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* DA MICOTECA URM PRODUTORAS  
DE ENZIMAS OXIDATIVAS**

**Recife  
2017**

**DIANNY CAROLYNE VASCONCELOS DA SILVA LISBOA**

**BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LAVANDERIAS TÊXTEIS POR  
ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* DA MICOTECA URM PRODUTORAS  
DE ENZIMAS OXIDATIVAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração MICOLOGIA APLICADA, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta

Co-orientadores:

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira  
Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos

**Recife  
2017**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

Lisboa, Dianny Carolyne Vasconcelos da Silva

Biorremediação de efluentes de lavanderias têxteis por espécies de Trichoderma da micoteca URM produtoras de enzimas oxidativas/ Dianny Carolyne Vasconcelos da Silva Lisboa- 2017.

97 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientadores: Keila Aparecida Moreira e Cledir Rodrigues Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Biorremediação 2. Trichoderma 3. Lignina I. Motta, Cristina Maria de Souza (orient.) II. Moreira, Keila Aparecida (coorient.) III. Santos, Cledir Rodrigues (coorient.) IV. Título

62011223

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-060

**DIANNY CAROLYNE VASCONCELOS DA SILVA LISBOA**

**BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE LAVANDERIAS TÊXTEIS POR  
ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* DA MICOTECA URM PRODUTORAS  
DE ENZIMAS OXIDATIVAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração MICOLOGIA APLICADA, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 03/03/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Norma Buarque de Gusmão – Examinador Interno  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Patrícia Vieira Tiago – Examinador Interno  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Laura Mesquita Paiva – Examinador Externo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Virginia Michelle Svedese – Examinador Externo  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Aos meus pais Robson Henrique e Edneusa Conceição pelo amor, apoio e dedicação que sempre têm comigo.

Aos meus avós Eivaldo Araújo, Ivonete Freitas, Iracema Azevedo (*in memoriam*) e Augusto Henrique pela carinhosa presença em minha vida e por seus ensinamentos.

Ao meu marido Kleyton pelo amor e companheirismo em todos os momentos,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida, me concedendo a oportunidade de aprender com meus erros, me ajudando a levantar nas quedas, iluminando meu caminho e dando-me força e coragem para conquistar meus objetivos.

Aos meus queridos avós Eivaldo Araújo de Vasconcelos, Ivonete Freitas de Vasconcelos e Iracema Rodrigues (*in memoriam*) e Augusto Henrique pelo carinho e amor com que acompanharam todo meu desenvolvimento, contribuindo para minha formação pessoal e intelectual.

Aos meus pais Robson Henrique da Silva e Edneusa Conceição Freitas de Vasconcelos Silva, que sempre estiveram presentes em todos os momentos, acreditando em mim e concedendo-me a oportunidade de estar realizando um sonho.

Ao meu marido Kleyton Lisboa que sempre me dá todo apoio que preciso e me ampara nas horas difíceis com todo amor, carinho e atenção.

À minha irmã Juliana Lenice, meu cunhado Bruno Rafael e meu primo Sócrates Tagore que torcem por mim, estando sempre ao meu lado, e me dando a mão sempre que preciso de ajuda.

À minha família pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade oferecida na realização do Doutorado em Biologia de Fungos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de doutorado concedida para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e a Chefe do departamento Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, pela disponibilização de materiais e das instalações do Laboratório da Micoteca URM e do Laboratório de Citologia e Genética para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira e Prof. Dr. Cledir Santos pelo estímulo, críticas e sugestões, sobretudo pela confiança depositada em meu trabalho.

À Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva pela amizade, carinho, confiança e acolhimento no Laboratório de Micologia Ambiental e apoio na realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

A todos os amigos da turma 2012 do Doutorado em Biologia de Fungos, do Laboratório da Micoteca URM, Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e Laboratório de Micologia Ambiental, Renan Barbosa, Ana Caroline Lima, Jadson Bezerra, Leticia Silva, Diogo Lopes, Aline Barbosa, Ivana Galvão, Greicilene Albuquerque, Ana Luiza Costa, Ana Luiza Maia, Geovana Batista e Jefferson Lima pelos bons momentos e pela amizade.

Em especial à Mona Lisa Venâncio, Gianne Rizzuto e Karla Freire pela amizade e parceria na realização deste trabalho e na vida.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

Os efluentes têxteis são considerados um dos mais poluentes do setor industrial e estudos relacionados aos métodos biológicos de tratamento de efluentes têxteis têm utilizado micro-organismos, principalmente os fungos, nesse processo. Pesquisas recentes têm comprovado a eficiência de espécies de *Trichoderma* em produzir enzimas oxidativas, que tem aplicações na descoloração de corantes industriais e na degradação de poluentes orgânicos. O presente estudo objetivou reidentificar espécimes de *Trichoderma* da Micoteca URM, e selecionar isolados produtores de enzimas oxidativas, para biorremediação de efluentes têxteis. Para os estudos taxonômicos, foram realizadas as análises molecular (região ITS1-5.8S-ITS2 e gene *tef1* do rDNA) e morfofisiológica (crescimento, tipos de conídios e fiálides, presença de clamidósporo, etc.) de isolados de *Trichoderma* preservados na Micoteca URM. Nos estudos biotecnológicos, foram realizadas as análises de 50 isolados de *Trichoderma* quanto à descoloração do corante têxtil Índigo Carmine e do efluente têxtil (coletado em uma lavanderia de jeans em Toritama - PE), e para produção de enzimas oxidativas. Em seguida, dois isolados foram selecionados para avaliar as melhores condições de descoloração do efluente têxtil. Por meio do estudo taxonômico foi possível identificar isolados de 11 espécies do gênero *Trichoderma*. Nos estudos biotecnológicos, *Trichoderma atroviride* (URM 6625, 3735 e 3270) apresentaram percentual de descoloração do Índigo Carmine de 93,57%, 94,61% e 96,86%, respectivamente. As melhores atividades oxidativas foram de *Trichoderma virens* URM 4996 para lacase ( $15,7 \text{ U.L}^{-1}$ ), *Trichoderma atroviride* URM 3735 para lignina peroxidase ( $1307 \text{ U.L}^{-1}$ ) e *Trichoderma erinaceum* URM 3881 para manganês peroxidase ( $875,3 \text{ U.L}^{-1}$ ). Entre os fungos testados para o tratamento de efluentes têxteis, *T. atroviride* URM 4950 foi o melhor isolado, apresentando resultados satisfatórios com a adição de extrato de levedura e com efluente têxtil puro, com 70,64% e 75,30% de descoloração, respectivamente. Após a conclusão do delineamento experimental, verificou-se que, entre os 26 experimentos, apenas três apresentaram acima de 70% de descoloração no final do oitavo dia de experimento, concluindo que as melhores condições para atingir o nível máximo de descoloração do efluente têxtil pelos isolados testados foram, as temperaturas 25°C e 35°C, concentração do extrato de levedura  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  e o pH 7. Ferramentas moleculares e morfofisiológicas são importantes para a diferenciação das espécies de *Trichoderma*.

E os isolados *T. atroviride* URM 3735 e URM 4950 são indicadas para estudos relacionados a biorremediação de ambientes contaminados com efluentes têxteis e no tratamento destes efluentes em lavanderias têxteis.

**Palavras-chave:** Fungos filamentosos. Descoloração de efluentes têxteis. Lacase. Lignina Peroxidase. Manganês Peroxidase.

## ABSTRACT

Textile effluents are considered the most polluting in the industrial sector. Studies related to biological methods of treatment of textile effluents have used microorganisms, mainly fungi, in this process. Recent research has proven efficiency of *Trichoderma* species in producing oxidative enzymes, which has applications in decolorization of industrial dyes and degradation of organic pollutants. Present study aimed to reidentify specimens of *Trichoderma* from the Micoteca URM, and to select isolates producing oxidative enzymes, for bioremediation of textile effluents. For taxonomic studies, the molecular analyzes (ITS1-5.8S-ITS2 region and *tef1* gene of rDNA) and morphophysiological (growth, conidia and phalid types, presence of chlamyospore, etc.) were realized on *Trichoderma* strains preserved in Micoteca URM. In the biotechnological studies, 50 strains of *Trichoderma* were analyzed for decolorization of the Indigo Carmine textile dye and textile effluent (collected in a jeans laundry in Toritama - PE), and for production of oxidative enzymes. Then, two strains were selected to evaluate the best decolorization conditions of textile effluent. By means of taxonomic study was possible identify strains of 11 species of *Trichoderma* genus. In biotechnological studies, *Trichoderma atroviride* (URM 6625, 3735 and 3270) showed a decolorization percentage of Indigo Carmine of 93.57%, 94.61% and 96.86%, respectively. The best oxidative activities were *Trichoderma virens* URM 4996 for laccase (15.7 UL-1), *Trichoderma atroviride* URM 3735 for lignin peroxidase (1307 UL-1) and *Trichoderma erinaceum* URM 3881 for manganese peroxidase (875.3 UL-1). Among fungi tested for treatment of textile effluents, *T. atroviride* URM 4950 was the best strain, presenting satisfactory results in addition of yeast extract and with pure textile effluent, with 70.64% and 75.30% decolorization, respectively. After completion of experimental design, it was found that among 26 experiments, only three had above 70% decolorization at the end of eighth experiment day. Was concluded that the best conditions to reach maximum decolorization level of the textile effluent by strains were 25°C and 35°C, yeast extract concentration 0.5g.L-1 and pH 7. Molecular and morphophysiological tools are important for differentiation of species of *Trichoderma* and strains *T. atroviride* URM 3735 and URM 4950 are indicated for studies related to bioremediation of environments contaminated with textile effluents and in the treatment of these effluents in textile laundries.

**Key-words:** Filamentous fungi. Decolorization of textile effluents. Laccase. Lignin peroxidase. Manganese peroxidase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Representação esquemática do efeito do efluente têxtil para o ambiente..... 19
- Quadro 1 – Distribuição filogenética de espécies de *Trichoderma* em seções e clados..... 27
- Figura 2 – Características macroscópicas e microscópica de *Trichoderma* sp. A – Cultura em BDA após 96h; B – Conidióforo com fiálides e conídios..... 29
- Figura 3 – Dendrograma utilizando a análise de agrupamento hierárquico (ligação média entre grupos) de parentesco entre os isolados de *Trichoderma* com base nos dados da análise morfológica..... 50
- Figura 4 – Espécies de *Trichoderma* utilizadas neste estudo. A-E Estruturas microscópicas. A- *T. asperellum* URM 3343; B- *T. asperelloides* URM 3086; C- *T. atroviride* URM 3601; D- *T. ghanense* URM 3732; E- *T. longibrachiatum* URM 5158; F- *T. virens* URM 4466. G-P Culturas em BDA (30, 35 e 40°C) e SNA (35°C). G e J –URM 3343 em BDA a 30°C e SNA 35°C após 96h; H e K - URM 3086 em BDA a 30°C e SNA 35°C após 96h; I e L - URM 3601 e URM 4466 em BDA a 30°C após 96h; M e N - URM 3732 e URM 5158 em BDA a 35°C após 96h; O e P- URM 3732 e URM 5158 em BDA a 40°C após 96h..... 51
- Figura 5 – Reconstrução filogenética das sequencias obtidas de linhagens de *Trichoderma* da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos ITS I + 5.8S + ITSII (rDNA). *Hyphomyces subiculosus* foi o grupo externo. Valores de bootstrap (em %) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança e do método de Máxima Parcimônia com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 55

bootstraps), respectivamente. Somente valores acima de 50% são apresentados.....

- Figura 6 – Reconstrução filogenética de linhagens de *Trichoderma* da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos *tef1*. foi o grupo externo. Valores de bootstrap (em %) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança e do método de Máxima Parcimônia com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 bootstraps), respectivamente. Somente valores acima de 50% são apresentados..... 56**
- Figura 7 – Descoloração (%) do efluente têxtil de lavanderias de jeans por espécies de *Trichoderma* da Micoteca URM..... 61**
- Figura 8 – Diagrama de Pareto no processo de descoloração do efluente têxtil pelo fungo *Trichoderma atroviride* URM 4950; (1) temperatura, (2) Concentração de extrato de levedura e (3) pH; MS Pure Error=,0086491..... 63**
- Figura 9 – Figura 13 – Diagrama de Pareto no processo de descoloração do efluente têxtil pelo *fungo Trichoderma atroviride* URM 3735; MS Pure Error =,0081218..... 64**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise físico-química do efluente têxtil coletado em uma Indústria de beneficiamento de jeans em Toritama – PE, Brasil.....	43
Tabela 2 – Níveis e variáveis independentes que foram escolhidas para o estudo de melhores condições de descoloração do efluente têxtil.....	46
Tabela 3 – Caracteres morfofisiológicos utilizados para a revisão taxonômica de espécimes de <i>Trichoderma</i> depositadas na Micoteca URM.....	47
Tabela 4 – Re-identificação de linhagens de <i>Trichoderma</i> da Micoteca URM após caracterização morfofisiológica e molecular.....	53
Tabela 5 – Percentual de descoloração (D%) do corante têxtil Índigo Carmine por espécies de <i>Trichoderma</i> da Micoteca URM.....	58
Tabela 6 – Produção de enzimas oxidativas (U.L <sup>-1</sup> ) por espécies de <i>Trichoderma</i> da Micoteca URM.....	59
Tabela 7 – Delineamento experimental e de resposta para descoloração do efluente têxtil por <i>Trichoderma atroviride</i> URM 4950 e URM 3735.....	62

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 EFLUENTES TÊXTEIS.....	18
<b>2.1.1 Tratamento de efluentes têxteis.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Potencial de <i>Trichoderma</i> sp. no tratamento de efluentes têxteis.....</b>	<b>24</b>
2.2 O GÊNERO <i>TRICHODERMA</i> .....	25
<b>2.2.1 Nomenclatura do gênero <i>Hypocrea/Trichoderma</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2 História taxonômica.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3 Características Gerais.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.4 Importância do gênero.....</b>	<b>30</b>
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>TRICHODERMA</i> .....	31
<b>2.3.1 Caracterização morfofisiológica.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2 Caracterização molecular.....</b>	<b>32</b>
2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE <i>TRICHODERMA</i> .....	33
<b>2.4.1 Produção de enzimas por <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>35</b>
2.4.1.1 Enzimas oxidativas.....	36
2.4.1.1.1 <i>Lignina peroxidase</i> .....	36
2.4.1.1.2 <i>Manganês peroxidase</i> .....	37
2.4.1.1.3 <i>Lacase</i> .....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 MICRO-ORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	41
3.2 ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA.....	41
<b>3.2.1 Análise dos dados fenotípicos.....</b>	<b>41</b>
3.3 ANÁLISE MOLECULAR.....	42
<b>3.3.1 Extração do DNA e amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 e do gene <i>tef1</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3.2 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas.....</b>	<b>42</b>
3.4 EFLUENTE TÊXTIL E CORANTE.....	43
3.5 ENSAIO DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL.....	43
<b>3.5.1 Avaliação da descoloração do corante têxtil.....</b>	<b>44</b>
3.6 ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM MEIO LÍQUIDO.....	44

<b>3.6.1 Ensaio enzimáticos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.7 BIOTRATAMENTO DO EFLUENTE TÊXTIL.....</b>	<b>45</b>
<b>3.7.1 Ensaio de descoloração do efluente têxtil.....</b>	<b>45</b>
<b>3.7.2 Delineamento experimental e otimização da descoloração do efluente têxtil.....</b>	<b>46</b>
<b>3.7.3 Avaliação da descoloração do efluente.....</b>	<b>46</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE CORANTE E EFLUENTE TÊXTIL.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.1 Descoloração de Índigo Carmine .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.2 Atividade das enzimas oxidativas.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.3 Tratamento do efluente têxtil.....</b>	<b>60</b>
4.2.3.1 Otimização da descoloração do efluente têxtil usando delineamento experimental.....	61
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO PARA SUBMISSÃO.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os efluentes gerados pelas indústrias têxteis são considerados os mais poluentes do setor industrial e o lançamento desses efluentes coloridos em ambientes aquáticos pode causar além de poluição visual, diminuição da capacidade fotossintética dos vegetais desses ambientes e eutrofização dos rios, como também a contaminação dos solos e de lençóis freáticos (GAJERA et al., 2015). Outra preocupação existente é com os corantes encontrados nestes efluentes, que podem conter substâncias cancerígenas e tóxicas ao homem e outros animais (KARIM et al., 2017).

Existem três tipos de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos. Entre estes, os métodos de tratamento biológico vêm ganhando importância no cenário atual, por serem considerados alternativas ecologicamente corretas na degradação de efluentes com corantes, devido aos menores custos na aplicação, à sua elevada eficiência e por apresentarem uma menor poluição secundária (TAN et al., 2016; SHANMUGAM et al., 2017).

Estudos relacionados aos métodos biológicos de tratamento de efluentes têxteis têm utilizado micro-organismos, principalmente os fungos, pois estes são capazes de degradar ou acumular corantes e outras substâncias contidas nos efluentes têxteis, isto ocorre devido a infinidade de enzimas que estes micro-organismos podem sintetizar e entre essas algumas que trazem mais benefícios para a biorremediação como a lacase, tirosinase e as peroxidases (PEROVANO FILHO et al., 2011; CHANDA et al., 2016).

Pesquisas recentes têm comprovado a eficiência de espécies de *Trichoderma* em produzir enzimas oxidativas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) que tem aplicações na descoloração de corantes industriais e na degradação de uma vasta gama de poluentes orgânicos (KHAMBHATY et al., 2015; MAJI et al., 2015; ANDREOLLI et al., 2016; INGLE; MISHRA, 2016; SHANMUGAM et al., 2017).

O gênero *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) possui grande variedade de espécies, que são cosmopolitas, podendo ser encontradas em diferentes habitats, principalmente em locais com grande disponibilidade de matéria orgânica (ZAFRA; CORTÉS-ESPINOSA, 2015). O mais recente inventário de espécies de *Trichoderma* listou cerca de 200 espécies, todas caracterizadas em nível

molecular (ATANASOVA et al., 2013), no entanto, uma lista incluindo mais de 250 nomes de espécies de *Trichoderma* foi apresentada para consideração pela Comissão Geral estabelecida pelo XX Congresso Internacional de Botânica em Melbourne (BISSETT et al., 2015).

Muitos membros deste gênero têm sido estudados em relação às diversas características fisiológicas e aplicações biotecnológicas, pois apresentam mecanismos enzimáticos potentes que consistem em celulasas, quitinases, glucanases e proteases, entre outros, para a decomposição e a utilização de substratos presentes nos solos, mas em especial, para a degradação de material lignocelulósico, apresentando características desejáveis para utilização comercial e industrial (ZAFRA; CORTÉS-ESPINOSA, 2015).

Devido à importância econômica e ambiental de *Trichoderma*, a taxonomia do gênero e a correta identificação das espécies são necessárias (YU et al., 2007). Em geral, identificação e descrição de espécies de *Trichoderma* são baseadas na análise de um número limitado de isolados, que apresentam alta similaridade, assim, muitas vezes as análises de características morfofisiológicas são insuficientes para a caracterização das espécies, necessitando de outras ferramentas para a identificação correta destes fungos (LARRALDE-CORONA et al., 2008; MENEZES et al., 2010).

Com o advento da biologia molecular e o surgimento de novas ferramentas de identificação, que são baseados em análise da seqüência de múltiplos genes (como ITS1, ITS2 e *tef1*), tem se tornado possível a identificação de um grande número de espécies do gênero (JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2015). Neste contexto, o presente estudo objetivou reidentificar espécimes de *Trichoderma* da Micoteca URM, e selecionar isolados produtores de enzimas oxidativas, para biorremediação de efluentes têxteis.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 EFLUENTES TÊXTEIS

Nas lavanderias e tinturarias, a água é utilizada como veículo para os produtos químicos que participam do processo de lavagem, tingimento e acabamento dos tecidos e também para remover o excesso de produtos utilizados. Para o processo de tingimento de tecidos de algodão utiliza-se uma elevada quantidade de água, como consequência são gerados grandes volumes de efluentes contaminados (KANT, 2012; DEVECI et al., 2016).

Os efluentes têxteis são altamente coloridos, devido à presença de corantes que não se fixaram a fibra durante o processo de tingimento. Além dos corantes, os efluentes têxteis apresentam grandes quantidades de sólidos suspensos, altos valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), elevadas temperaturas, acidez ou alcalinidade e outras substâncias que estão presentes como os metais, amido, surfactantes, dispersantes, óleos, emulsificantes, soda cáustica, solventes, sais orgânicos e inorgânicos (GHALY et al., 2014).

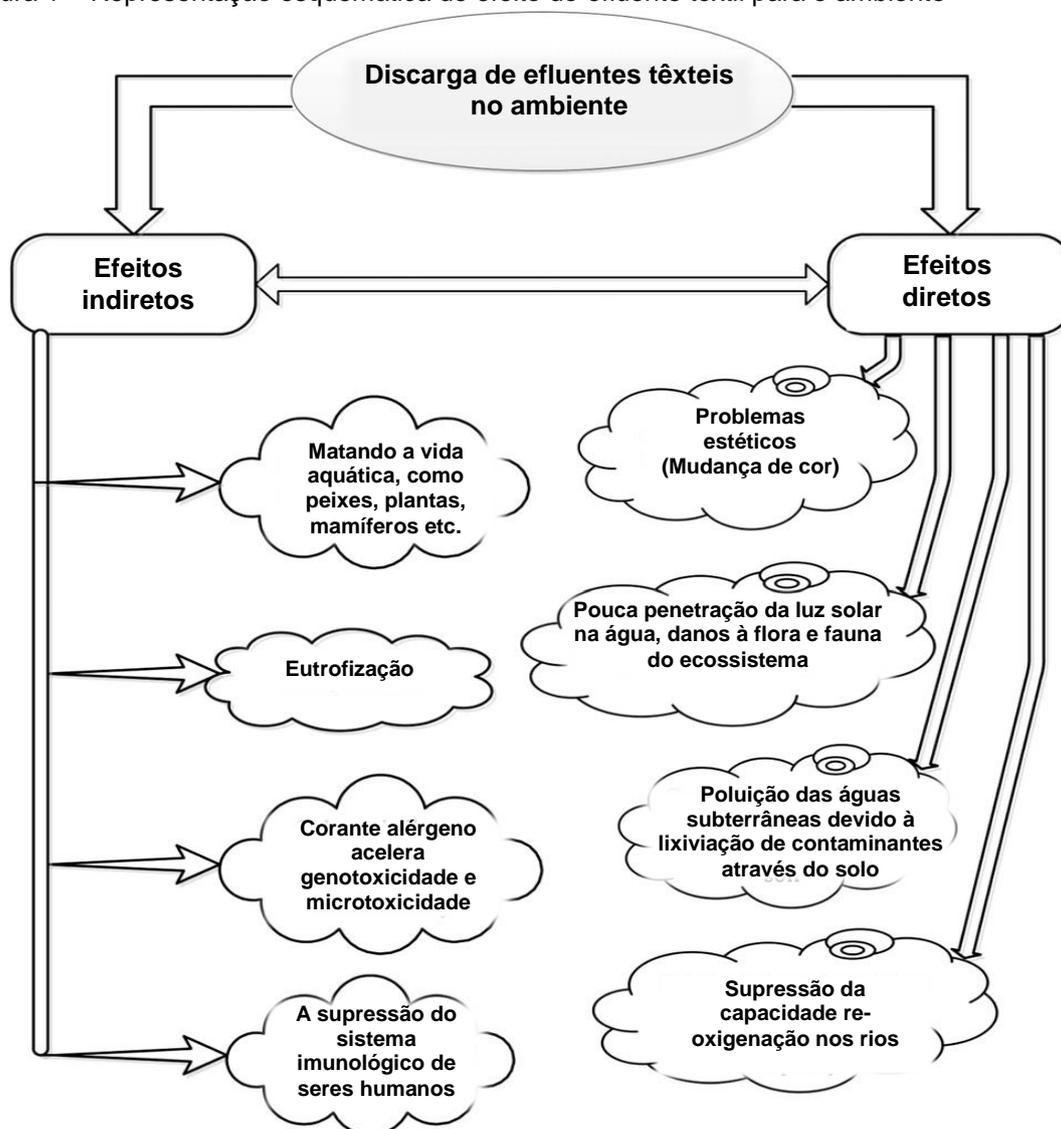
As indústrias têxteis apresentam grande dificuldade em tratar eficientemente as águas residuárias geradas em seus processos de produção, principalmente, em relação à remoção de corantes desses efluentes que, mesmo em pequenas quantidades, conferem cor intensa, constituindo um dos efluentes mais complexos e problemáticos a serem tratados (VASQUES et al., 2011).

Estes efluentes quando são lançados no ambiente, sem tratamento adequado causam efeitos diretos e indiretos (Figura 1). Entre os efeitos diretos podemos citar os problemas estéticos e ambientais ao absorver luz, interferindo significativamente na atividade de fotossíntese e nos processos biológicos próprios do corpo hídrico, causando desequilíbrio no ambiente (PEREIRA et al., 2010; GHALY et al., 2014). Além dos danos ambientais, os efluentes têxteis são considerados substâncias potencialmente tóxicas por conterem corantes sintéticos da família dos azocorantes, os quais possuem caráter carcinogênico e mutagênico, além de elevada resistência à degradação natural (DASGUPTA et al., 2015; TAN et al., 2016).

Além disso, a exposição esporádica ou excessiva aos efluentes têxteis pode causar, em humanos, quadros de imunossupressão respiratória, circulatória, distúrbios do sistema nervoso e neurocomportamentais centrais, doenças

autoimunes, mieloma múltiplo, leucemia, vômitos, hiperventilação, insônia, diarreia, salivação, icterícia, necrose dos tecidos, infecções oculares ou de pele, irritação e até mesmo edema pulmonar (VERMA; DASH; BHUNIA, 2012; PANG; ABDULLAH, 2013).

Figura 1 – Representação esquemática do efeito do efluente têxtil para o ambiente



Fonte: Verma; Dash; Bhunia (2012, p.157 - adaptado).

### 2.1.1 Tratamento de efluentes têxteis

Segundo a Resolução nº 430 de maio/2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor se obedecerem às condições e padrões

previstos na resolução, como por exemplo, pH entre 5 e 9, temperatura acima de 3°C e abaixo de 40°C, ausência de material flutuante e remover no mínimo 60% da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).

Para cumprir as normas exigidas pela Resolução do CONAMA, existem diversos tipos de tratamentos para os efluentes têxteis, que têm levado à realização de pesquisas para desenvolver novas tecnologias capazes de degradar ou imobilizar estes compostos, minimizando o volume e toxicidade dos efluentes industriais têxteis (TAN et al., 2016).

Existem vários tipos de tratamentos para os efluentes têxteis, que variam em físicos, químicos e biológicos ou combinações adequadas dos mesmos, para que os efluentes possam ser descarregados de forma segura no ambiente (KURADE et al., 2017). De um modo geral, o tratamento de efluentes contendo corantes pode ser fundamentado em dois processos: remoção por técnicas que permitam eliminar os compostos por transferência, sem degradar os componentes, ou por utilização de métodos que permitam a degradação parcial ou total (mineralização) dos componentes do efluente têxtil (KAMIDA et al., 2005).

Os tratamentos físicos são baseados em processos de separação de fases (sedimentação, flotação, centrifugação), transição (destilação, evaporação e cristalização), transferência (adsorção) e de separação molecular utilizando membranas seletivas (microfiltração, ultrafiltração, osmose reversa e diálise) (KHANDEGAR; SAROHA, 2013).

O processo de adsorção é considerado uma das melhores tecnologias no tratamento físico de efluentes têxteis, apresentando grande aplicabilidade (FORGACS et al., 2004). O carvão ativado é considerado como um adsorvente universal para a remoção de poluentes, tais como, corantes e metais pesados de águas residuárias, devido às suas áreas de superfície, elevada capacidade de adsorção, rápida adsorção e relativa facilidade de regeneração. No entanto, outros materiais podem ser utilizados como adsorventes alternativos, como o carvão ativado de casca de coco, bambu, casca de eucalipto, quitosana, farelo de trigo, farelo de arroz (SUZUKI et al., 2007; HASAN et al., 2010; SATHISHKUMAR et al., 2012; ALJEBOREE et al., 2014).

Em geral, a técnica de adsorção é eficiente na remoção do material particulado, no entanto, as substâncias como os corantes e compostos orgânicos não são eliminadas, persistindo o problema, pois os poluentes estão concentrados sem

efetivamente serem degradados (NAWAZ; AHSAN, 2014). Apesar disto, a utilização dos métodos físicos como etapas iniciais de um tratamento possui extrema importância para um tratamento eficaz (FREIRE et al., 2000).

Os tratamentos químicos vêm apresentando uma enorme aplicabilidade em sistemas ambientais como purificação de ar, na desinfecção e no tratamento de água e de efluentes têxteis, em geral estão associados a outro tipo de tratamento, físico ou biológico (SILVA, 2012). São consideradas técnicas químicas de tratamentos de efluentes têxteis as que utilizam produtos, tais como: agentes de coagulação, floculação, neutralização de pH, oxidação, redução e desinfecção em diferentes etapas do tratamento (ANJANEYULU et al., 2005). Os principais processos são ozonização, clarificação, eletrocoagulação, cloração, oxidação e precipitação (GUPTA et al., 2015).

O processo oxidativo é um dos métodos químicos mais usados para o tratamento de efluentes com corantes, principalmente pela aplicação simples. A oxidação ocorre pela remoção do corante do efluente através da quebra de anéis aromáticos existentes nas moléculas dos corantes. Em geral, o agente oxidante utilizado é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), variando apenas o processo de ativação, por utilização de íons metálicos ou óxidos semicondutores, tendo como alternativa a utilização de irradiação com luz ultravioleta (SALGADO et al., 2009; HO et al., 2010). Um exemplo é a oxidação por Fenton, no qual o peróxido de hidrogênio é ativado por Fe (II). Esta é uma técnica utilizada no tratamento de efluentes que são resistentes aos processos biológicos e tem se mostrado eficiente no tratamento de corantes. A grande desvantagem deste método é a significativa produção de lodo pela floculação do reagente e das moléculas de corante (PANG; ABDULLAH, 2013).

A técnica que utiliza ozônio foi pioneira no início da década de 1970, pois é um bom agente, devido a sua alta instabilidade quando comparado com o  $H_2O_2$ . A oxidação utilizando ozônio pode auxiliar na degradação de diversos compostos fenólicos, hidrocarbonetos clorados ou aromáticos e pesticidas. A vantagem da técnica com ozônio é a possibilidade de aplicação na forma gasosa, não aumentando o volume do efluente e do lodo, já a desvantagem é o tempo de meia vida curto sendo necessária aplicação frequente aumentando os custos do processo (ANJANEYULU et al., 2005).

Os métodos de tratamento biológico estão ganhando importância, por serem considerados alternativas ecologicamente corretas na degradação de efluentes com corantes, devido aos menores custos em sua aplicação, à sua elevada eficiência e por apresentarem uma menor poluição secundária (TAN et al., 2016). Estes métodos possuem várias vantagens sob outros métodos, tais como a mineralização, conversão de compostos tóxicos recalcitrantes em compostos químicos simples, como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (BAFANA et al., 2008).

Micro-organismos tais como bactérias, fungos, algas podem ser utilizados para remover a cor dos efluentes, através de processos aeróbios, anaeróbios e anaeróbio-aeróbios sequenciais (GUPTA et al., 2015). No tratamento aeróbio, os micro-organismos que atuam na degradação dos compostos existentes nos efluentes utilizam a molécula de oxigênio livre comoceptor final de hidrogênio. O tratamento anaeróbio utiliza a molécula de oxigênio ligado aos compostos químicos, como receptor final de hidrogênio (BARRETO et al., 2011).

Os principais processos aeróbios aplicáveis ao tratamento de efluentes são lodo ativado, filtros biológicos e lagoas aeróbias. O sistema de lodo ativado é o processo biológico mais utilizado no tratamento dos efluentes, de modo geral. A técnica consiste em utilizar micro-organismos que estão em suspensão no efluente, e que são constantemente misturados pelo próprio sistema de aeração, sem necessitar de agitação. Este processo apresenta várias vantagens, pois obtém um efluente de excelente qualidade, é um método estável onde há possibilidade de alterar o tempo de contato entre o efluente e o micro-organismo e possui capacidade de absorver compostos tóxicos. Quanto às desvantagens deste processo está a formação de grande volume de lodo, além de um grande consumo de energia (VILLEN, 2001; ANJANEYULU et al., 2005).

Outra forma de tratamento biológico dos efluentes são as lagoas, que podem ser subdivididas em lagoas de estabilização e de aeração. As lagoas de estabilização são grandes tanques de pequena profundidade, onde as águas residuárias (efluentes) são tratadas naturalmente por processos biológicos. As lagoas aeradas são sistemas semelhantes às lagoas de estabilização, exceto, por existir fornecimento de oxigênio através de aeradores mecânicos (FREIRE et al., 2000; CAMPOS et al., 2006).

O tratamento anaeróbio ou digestão anaeróbia de substâncias é realizado por fermentação microbiana que ocorre em ambientes que não apresentam oxigênio livre

(molecular), é através deste processo de digestão que é formado o biogás (metano e gás carbônico). Os processos anaeróbios são, em geral, mais lentos que os aeróbios, exigindo maior tempo de retenção, no entanto, apresentam uma grande vantagem, além do tratamento do efluente, que é a produção de biogás que pode ser reutilizado para produzir calor e pode reduzir os custos de energia (ROBINSON et al., 2001; ANJANEYULU et al., 2005).

Durante o processo anaeróbio de clivagem dos corantes contidos nos efluentes pode ocorrer à formação aminas aromáticas que são mais tóxicas do que os corantes têxteis tratados (SARAYU; SANDHYA, 2012).

Visto que neste processo ocorre apenas uma degradação parcial, não pode ser considerado um passo final no tratamento de efluentes têxteis. Desta forma, as aminas aromáticas que são geradas durante as condições anaeróbicas podem prontamente serem submetidas à mineralização sob condição aeróbia, e deste modo satisfazerem os critérios padrões de descarga de efluentes. Assim, os processos anaeróbio-aeróbios sequenciais são geralmente necessários para a biodegradação eficaz de corantes por consórcio bacteriano (PANG; ABDULLAH, 2013).

Os processos de tratamento utilizados em geral pelas indústrias têxteis consistem em sistemas físico-químicos, seguidos de tratamento biológico através do sistema de lodo ativado, embora estes apresentem alta eficiência na remoção da cor do efluente, apresentam um contraponto que é a geração do lodo, que é considerado preocupante do ponto de vista ambiental, pela quantidade de corantes e outras substâncias adsorvidas. Por tudo acima relatado torna-se importante a busca por melhores alternativas de tratamento dos efluentes têxteis (OLIVEIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

Em geral, cada uma das técnicas tem suas vantagens e limitações ou fatores que precisam ser considerados. Além disso, a presença de um ou vários anéis de benzeno na estrutura dos corantes pode dificultar o tratamento, tornando um dos tratamentos ineficaz sozinho. Portanto, as estratégias de remoção de corante dos efluentes têxteis devem consistir de uma combinação de diferentes técnicas (PANG; ABDULLAH, 2013; CHHABRA et al., 2015).

### 2.1.2 Potencial de *Trichoderma* sp. no tratamento de efluentes têxteis

*Trichoderma* é um gênero muito diversificado geneticamente, que apresenta variados recursos de interesse agrícola e industrial em suas diferentes espécies. Como foi descrito anteriormente, espécies de *Trichoderma* tem sido aplicadas na produção industrial de enzimas, no tratamento da celulose, na indústria de alimentos, mas também vários relatos tem demonstrado o potencial de algumas espécies em remediar a poluição do solo e da água (ANDREOLLI et al., 2016).

Efluentes com corantes têxteis estão entre os poluentes mais problemáticos devido à sua toxicidade em vários organismos e ecossistemas (SHANMUGAM et al., 2017). Adnan et al. (2017) avaliaram a biodegradação dos corantes antraquinônicos, Vermelho Alizarina S e Verde Quinizarina SS por *Trichoderma lixii* F21 e obtiveram resultados excelentes.

A biodegradação de efluentes têxteis por enzimas produzidas por fungos é uma alternativa promissora, pois não causa danos ambientais e tem baixo custo de aplicação (TEGLI et al., 2014). Shanmugam et al. (2017) relataram a biodegradação do corante Violeta Cristal pela lacase produzida por *Trichoderma asperellum*. Sadhasivam et al. (2009) utilizaram a lacase produzida por *T. harzianum* na descoloração de corantes textéis recalcitrantes (Rodamina 6G, Erioglaucina e Azul de Tripán) e obtiveram bons resultados.

Espécies deste gênero são comumente encontradas nos solos e nas raízes das plantas, e possuem resistência à maioria dos agroquímicos. Além disso, eles são altamente resistentes a uma variedade de substâncias tóxicas como, metais pesados, compostos organometálicos, efluentes de curtume e produtos químicos nocivos, como o cianeto (TRIPATHI et al., 2013).

Chakroun et al. (2010) purificaram, caracterizaram e aplicaram a lacase produzida por *T. atroviride* na biorremediação de compostos fenólicos que podem estar presentes em efluentes industriais e agrícolas. Divya et al. (2014) trataram efluentes fenólicos salinos com lacase produzida por *T. viride*, demonstrando a versatilidade que o gênero possui na biorremediação de diferentes poluentes.

## 2.2 O GÊNERO *TRICHODERMA*

### 2.2.1 Nomenclatura do gênero *Hypocrea/Trichoderma*

O Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (Código Melbourne) determina uma nomenclatura unitária, ou seja, o uso de um único nome para um fungo pleomórfico (quando um fungo pode existir em duas fases morfológica e fisiologicamente diferentes). Para isso, não importando se é o nome do anamorfo ou do teleomorfo que irá prevalecer e se a escolha será baseada nos critérios de prioridade ou nas decisões sancionadas pelas comissões (MCNEILL et al., 2012).

Levando em consideração o Código de Melbourne, *Hypocrea* Fr. 1825 é o gênero tipo e que originou o nome a família Hypocreaceae e a ordem Hypocreales, mas o seu anamorfo, *Trichoderma* Pers. 1974, foi descrito anteriormente. Deste modo, por ter sido descrito antes, *Trichoderma* tem prioridade sobre *Hypocrea*, e é mais utilizado em aplicações comerciais, como na produção de celulase por *Trichoderma reesei* (JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2013).

Uma pesquisa realizada pela Subcomissão Internacional de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) para saber a opinião de indivíduos interessados no assunto, indicou uma clara preferência pela adoção de *Trichoderma* sobre *Hypocrea*, demonstrando uma tendência em abolir o uso do nome do teleomorfo em favor de *Trichoderma* para o holomorfo, e esta prática tem sido utilizada por vários pesquisadores desde janeiro/2013 (JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2013; LÓPEZ-QUINTERO et al., 2013).

Recentemente, uma lista incluindo 252 nomes de espécies de *Trichoderma* foi apresentada para consideração pela Comissão Geral estabelecida pelo XX Congresso Internacional de Botânica em Melbourne, que, em seguida, foi encaminhada para o Comitê de Nomenclatura para Fungos (NCF) para formar a Lista de nomes protegidos deste gênero (BISSETT et al., 2015).

### 2.2.2 História taxonômica

O gênero *Trichoderma* foi inicialmente descrito por Christian Hendrik Persoon em 1794, que incluiu no gênero quatro espécies: *Trichoderma viride*, *Trichoderma caesium*, *Trichoderma aureum* e *Trichoderma roseum*, isoladas a partir de material

coletado na Alemanha (SAMUELS, 2006). O gênero *Hypocrea* foi primeiramente descrito por Elias Fries em 1825, baseado em *Sphaeria rufa* Pers., uma espécie com ascósporos hialinos que depois se tornou *Hypocrea rufa* (Pers.) Fr., a espécie tipo do gênero. No entanto, até aquele momento o gênero não havia sido relacionado com o gênero *Trichoderma* (CHAVERRI; SAMUELS, 2003).

Em 1865, os irmãos Ludovicus-Renatus Tulasne e Carolus Tulasne determinaram que *Trichoderma viride* era a fase assexuada de *Hypocrea rufa*, descoberta que se tornou um marco na taxonomia dos fungos conidiais (SAMUELS, 2006; KUMAR, 2013).

Demonstrando a dificuldade existente para identificação de espécies deste gênero, Bisby, em 1939, reduziu todas as espécies do gênero a uma espécie *T. viride* (SAMUELS, 2006).

Este sistema foi seguido até 1969, quando Mein Rifai, o primeiro micólogo moderno a realizar taxonomia de *Trichoderma*, diferenciou morfologicamente nove “agregado de espécies”, são eles, *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, e *T. viride*. Cada agregado espécies compreendendo possivelmente a um complexo de espécies biológicas morfologicamente distintas (GAMS; BISSETT, 2002; RIFAI, 1969; SAMUELS et al., 2012).

Com base no trabalho realizado por Rifai, John Bisset revisou o gênero e reconheceu cinco seções (*Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* e *Hypocreanum*) e 27 espécies, entre estas 14 que foram descritas como novas (BISSETT, 1984, 1991a, 1991b, 1991c).

Com o advento da biologia molecular e o surgimento novas ferramentas de identificação que são baseados em análise da sequência de múltiplos genes, tornou-se possível uma identificação confiável de espécies de *Trichoderma* (GEISER et al., 2004). Segundo Atanasova et al. (2013) o trabalho pioneiro sobre a filogenia das espécies descritas do gênero foi publicado pelo grupo de Cristian Kubicek em 2002 (KULLNIG-GRADINGER et al., 2002) e ampliado em diversos estudos subsequentes tratando seções ou grupos de espécies que partilham algumas características morfológicas essenciais (CHAVERRI et al., 2004; DRUZHININA; KUBICEK, 2005; DRUZHININA et al., 2006; SAMUELS et al., 2006; JAKLITSCH, 2009, 2011).

De acordo com a Subcomissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (2006), baseada em estudos filogenéticos as espécies de *Trichoderma* estão agrupadas em cinco seções, quatro anteriormente sugeridas por Bissett e 16 clados (Quadro 1). A seção *Saturnisporum* foi agrupada a seção *Longibrachiatum* por Samuels et al. (1998).

Existem mais de 250 espécies de *Trichoderma* são reconhecidas, a maioria delas descritas a partir do ano 2000 (SAMUELS et al., 2012; JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2015). De acordo com López-Quintero et al. (2013) o aprofundamento no estudo evolutivo e taxonômico a partir de técnicas moleculares permitiu este avanço e o desenvolvimento de ferramentas confiáveis para o reconhecimento de novas espécies do gênero (DRUZHININA et al., 2005).

Quadro 1 – Distribuição filogenética de espécies de *Trichoderma* em seções e clados

Seções	Clados	Principais espécies
Pachybasium	Harzianum	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. aggressivum</i> , <i>T. pleurotum</i> e <i>T. velutinum</i>
	Virens	<i>T. crassum</i> e <i>T. virens</i>
	Semiorbis	<i>T. fertile</i> e <i>T. oblongisporum</i>
	Strictipilis	<i>T. strictipilis</i> e <i>T. longipile</i>
	Stromaticum	<i>T. stromaticum</i> e <i>T. rossicum</i>
	Pachybasioides	<i>T. polysporum</i> , <i>T. piluliferum</i> e <i>T. minutisporum</i>
Longibrachiatum	Longibrachiatum	<i>T. reesei</i> , <i>T. pseudokoningii</i> , <i>T. effusum</i> , <i>T. citrinoviride</i> , <i>T. ghanense</i> , <i>T. longibrachiatum</i> e <i>T. saturnisporum</i>
Trichoderma	Viride	<i>T. atroviride</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. viridescens</i> , <i>T. erinaceum</i> , <i>T. intricatum</i> , <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> e <i>T. petersenii</i>
	Pachybasium "A" ou Hamatum	<i>T. asperellum</i> , <i>T. hamatum</i> e <i>T. pubescens</i>
Hypocreamun	Ceramica	<i>T. ceramicum</i> e <i>T. estonicum</i>
	Chlorospora	<i>T. aureoviride</i> , <i>T. candidum</i> e <i>T. chlorosporum</i>
	Psychrophyla	<i>Hypocrea megalosulphurea</i>
	Megalocitrina	<i>H. crystalligena</i> , <i>H. psychrophila</i> , <i>H. pulvinata</i> e <i>H. sulfurea</i>
	Citrina	<i>H. citrina</i>
Lone Lineages	Lutea	<i>T. brevicompactum</i>
	Lone Lineages	<i>T. spirale</i> , <i>T. helicum</i> , <i>T. chromospermum</i> e <i>T. gelatinosus</i>

Fonte: <http://www.isth.info/biodiversity/index.php>

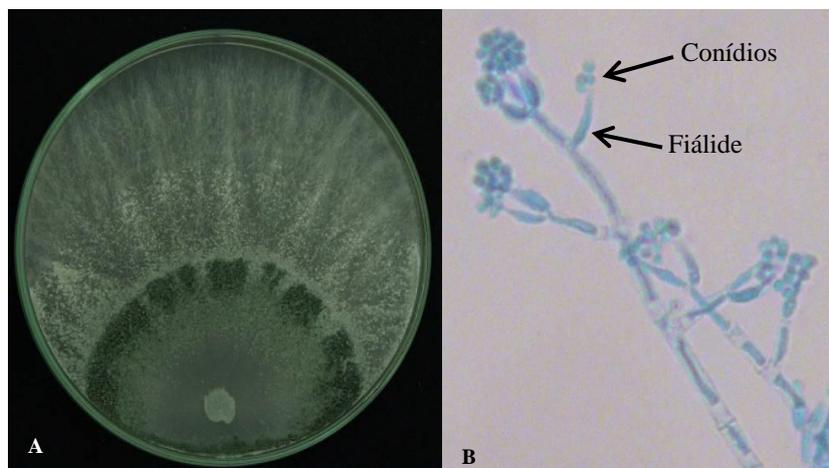
### 2.2.3 Características Gerais

O gênero *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) é caracterizado por culturas de rápido crescimento a 25-30°C, podendo apresentar odor doce ou de 'coco' característico de algumas espécies. Os conidióforos são altamente ramificados, sendo assim difíceis de definir e medir, podendo ser formados livremente ou em tufos assumindo aspecto piramidal com o ápice finalizando com uma ou poucas fiálides, que são hialinas e tipicamente ampliadas no meio, mas podem ser cilíndricas ou quase subglobosas. As fiálides são densamente agrupadas no eixo principal ou isoladas, e podem se desenvolver em espiral ou serem semelhantes às fiálides de *Gliocladium* sp (BISSETT, 1984; JAKLITSCH, 2009; SAMUELS et al., 2014).

A maioria das espécies apresentam conídios de coloração verde, mas estes também podem ser amarelos ou brancos (raramente). Quanto à forma, os conídios variam em elipsoidais, globosos ou subglobosos, e em geral são formados em tufos compactos ou soltos (Figura 2). Todas as espécies são capazes de produzir clamidosporos, porém estes nem sempre são produzidos, são tipicamente subglobosos e unicelulares, podendo ser formado na extremidade da hifa (terminal) ou no interior da célula da hifa (intercalar) (BISSETT, 1984; JAKLITSCH, 2009; SAMUELS et al., 2014).

Quanto à fase sexuada, os fungos do gênero *Hypocrea/Trichoderma* são caracterizados por apresentar peritécios inseridos no estroma carnudo formado por tecido pseudoparenquimatoso ou hifas altamente compactadas, de tons castanho claro, castanho escuro, amarelo ou laranja. Apresentam ascos com oito ascósporos hialinos ou verdes, bicelulares (um septo) e que desarticulam no septo no início de seu desenvolvimento, produzindo 16 parciais ascosporos em cada asco (CHAVERRI; SAMUELS, 2003).

Figura 2 – Características macroscópicas e microscópica de *Trichoderma* sp. A – Cultura em BDA após 96h; B – Conidióforo com fiálides e conídios



Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto a sua distribuição, *Trichoderma* sp. possui uma grande variedade de espécies que são cosmopolitas podendo ser encontradas em diferentes habitats, principalmente em locais com grande disponibilidade de matéria orgânica (DRUZHININA et al., 2011; CHEN; ZHUANG, 2016).

Presente em quase todo solo de clima temperado e tropical (cerca de  $10^1$ - $10^3$  de propágulos cultiváveis por grama de solo), são fungos mais frequentes neste ambiente (HARMAN et al., 2004). Além disto, muitas espécies do gênero são encontradas em rizosfera de plantas, em madeira em decomposição, restos de plantas, animais e em outros fungos, no interior do tecido vegetal e como patógeno em humanos, demonstrando seu alto potencial oportunista e sua capacidade de adaptação a várias condições ecológicas (SALAS et al., 2011; LÓPEZ-QUINTERO et al., 2013).

O gênero apresenta um alto nível de diversidade genética, e podem ser utilizados para produzir uma vasta gama de produtos de interesse comercial e ecológico (KAMALA et al., 2013; CHEN; ZHUANG, 2016). São bons produtores de proteínas extracelulares, e são mais conhecidos por sua capacidade de produzir enzimas que degradam a celulose e quitina, embora também produzam outros metabólitos de interesse, por exemplo, algumas cepas que produzem mais de 100 metabólitos que apresentam ação contra outros micro-organismos (HARMAN et al., 2004).

### 2.2.4 Importância do gênero

Colonização bem-sucedida de um determinado habitat por qualquer organismo depende principalmente do seu potencial para se defender, crescer e prosperar, mesmo com a competição por nutrientes, espaço e luz (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Muitos fungos, em especial os do gênero *Trichoderma* apresentam uma ampla variedade de mecanismos para a sua sobrevivência e proliferação, incluindo ataque físico e degradação de outros fungos, além da utilização de carboidratos complexos (LOPES et al., 2012).

Os principais modos de ação destes fungos incluem micoparasitismo (confronto direto com micopatógenos, secreção de enzimas degradadoras da parede celular fúngica para posterior penetração e morte), antibiose (atividade relacionada à secreção de metabólitos secundários de propriedades antimicrobianas nas proximidades do nincho fúngico) e competição (são eficientes em mobilizar e absorver macro e micronutrientes do solo, resultando na falta de nutrientes para outros microorganismos) (KESWANI et al., 2014).

Com base nessas características, as espécies deste gênero se destacam por apresentar a capacidade de assimilar uma diversidade de substratos, e pela produção de uma variedade de agentes antimicrobianos. Demonstrando considerável importância econômica, podendo ser utilizados para a produção de enzimas hidrolíticas (celulases, hemicelulases, quitinases, glucanases e proteases), na produção de antibióticos (peptaibols, antraquinona, harzianodiona, gliotoxina), na produção de outros metabólitos secundários (policetídeos, pironas, terpenos), na biodegradação de poluentes e como agentes biológicos no controle de fungos fitopatogênicos e nematóides (HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009; NICOLÁS et al., 2014; ANDREOLLI et al., 2016).

Entre as espécies do gênero, *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. hamatum* se destacam pelo potencial no controle biológico de fungos fitopatogênicos, apresentando muitas cepas registradas para uso comercial (NICOLÁS et al., 2014). No controle do nematóide *Heterodera avenae* foi relatada a eficiência de linhagens de *T. longibrachiatum* (ZHANG et al., 2014). E algumas espécies de *Trichoderma* podem induzir a resistência sistêmica de plantas por endofitismo, por exemplo, *T. asperellum* (GUZMÁN-VALLE et al., 2014), ou podem melhorar o crescimento e desenvolvimento

das plantas através da produção de formas solúveis de minerais, nutrientes e metabólitos de promoção do crescimento, como por exemplo *T. virens* (BABU et al., 2014).

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *TRICHODERMA*

Devido à importância econômica e ambiental de *Trichoderma*, a taxonomia do gênero e a correta identificação das espécies são necessárias (YU et al., 2007). Em geral, identificação e descrição de espécies de *Trichoderma* são baseadas na análise de um número limitado de linhagens, que apresentam alta similaridade, assim, muitas vezes as análises de características morfofisiológicas são insuficientes para a caracterização das espécies, sendo necessárias outras ferramentas para a identificação correta destes fungos (LARRALDE-CORONA et al., 2008; MENEZES et al., 2010).

Com o advento da biologia molecular e o surgimento novas ferramentas de identificação, que são baseados em análise da seqüência de múltiplos genes (como ITS1, ITS2 e *tef1*), tem se tornado possível a identificação de um grande número espécies do gênero (JAKLITSCH; VOGLMAYR, 2015).

#### 2.3.1 Caracterização morfofisiológica

A dificuldade de caracterização e diferenciação das espécies de *Trichoderma* a partir dos caracteres morfológicos tem sido discutida por vários autores ao longo dos anos, Rifai (1969), Bissett (1991), Samuels (1996; 2006) e Hoyos-Carvajal e Bissett (2011).

Caracteres úteis para a identificação em outros gêneros de fungos não são úteis na diferenciação de espécies de *Trichoderma*, em geral pela estreita faixa de variação morfológica entre as espécies, ou porque os termos utilizados para descrever a variação de cor ou padrão não são suficientemente precisos para definir as diferenças entre as espécies. Além disso, os poucos caracteres morfológicos disponíveis para a identificação do gênero são variáveis até certo limite, o que leva alguns caracteres a se sobrepor entre as espécies gerando identificações errôneas

relatadas na literatura, principalmente de cepas de *T. harzianum* (GAMS; BISSETT, 2002; SAMUELS, 2006; HOYOS-CARVAJAL; BISSETT, 2011).

Apesar das dificuldades existentes, as identificações com base em caracteres morfológicos permanecem como um importante método para a identificação e verificação de espécies em *Trichoderma*. A aparência da colônia pode ser distintiva e característica de uma espécie, no entanto, não é suficiente para a identificação, sendo necessária a observação de outros caracteres morfológicos (microscópicos) e fisiológicos, como a taxa de crescimento da colônia, produção de pigmentos difusos no meio (embora a cor desses pigmentos não variem muito no gênero), formas das fiáldes, forma e produção de conídios em conidióforos efusos, ou em conidióforos agregados em fascículos ou pústulas, presença de clamidósporos e odores característicos que se assemelham a coco, e que são produzidos normalmente por cepas de *Trichoderma viride*, e às vezes também por *Trichoderma atroviride* (GAMS; BISSETT, 2002).

### 2.3.2 Caracterização molecular

Antes do desenvolvimento da taxonomia molecular, a dificuldade de diferenciação das espécies de *Trichoderma* era muito comum (ATANASOVA et al., 2013). Em 1995, a utilização de análise de sequências de DNA tornou-se um novo paradigma na sistemática de fungos e os pesquisadores que trabalhavam com *Trichoderma*, rapidamente incorporaram dados de sequências para o desenvolvimento da taxonomia do gênero (SAMUELS, 2006). Lieckfeldt et al. (1999) em estudos taxonômicos sobre linhagens de *T. viride*, concluíram que se tratavam de duas espécies distintas *T. viride* e *T. asperellum*, após análises de sequencia da região ITS e de parte do gene 28S.

Desde então estudos evolutivos e taxonômicos moleculares mais aprofundados de *Trichoderma* resultaram na distinção de aproximadamente 250 espécies. Estudos primeiramente baseados na região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, região altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, possibilitou a distinção ao nível específico, e depois em sequências parciais do gene do fator de alongamento da tradução 1- alfa (*tef1*), endoquitinase (*chi18-5*), calmodulina (*cal1*) entre outros (LÓPEZ-QUINTERO et al., 2013).

Assim como descrito anteriormente, cada vez mais estão sendo necessários genes mais informativos para resolver complexos de espécies estreitamente relacionadas em *Trichoderma*. A região ITS que era considerada até recentemente a principal escolha para a identificação em nível de espécie, vem sendo considerada inadequada para distinguir espécies estreitamente relacionadas em vários clados de *Trichoderma* (BISSETT, 2009).

Em alternativa, genes que codificam proteínas e que possuem grandes íntrons têm sido escolhidos para diferenciar taxas estreitamente relacionados e recentemente evoluídos, tal como o gene que codifica o fator de alongamento da tradução 1-alfa (*tef1*). Esse gene é parte essencial na etapa da tradução de proteínas, que apresenta uma grande utilidade filogenética, pois é altamente informativo à nível de espécie em diversos gêneros de fungos, inclusive *Trichoderma* (GEISER et al., 2004; BISSETT, 2009).

Em estudos recentes, Druzhinina et al. (2012) avaliando a filogenia da seção *Longibrachiatum* de *Trichoderma* analisou fragmentos do fator de alongamento da tradução 1- alfa (*tef1*), endoquitinase (*chi18-5*), calmodulina (*cal1*) e de RPB2 (RNA polimerase subunidade B II). Kim et al. (2013) para descreverem duas espécies novas provenientes do Japão *T. eijii* e *T. pseudolacteum* utilizaram sequências dos genes acima descritos, além de sequências da região ITS que não foram utilizadas no trabalho anterior.

Além dos estudos filogenéticos realizados, tem sido realizado o sequenciamento do genoma de espécies do gênero, para uma melhor compreensão de como *Trichoderma* evoluiu para interagir com outros fungos, com plantas e ambientalmente, bem como para desenvolver processos e aplicações de grande impacto no bem-estar humano. Entre os fungos estão *T. reesei*, que foi a primeira espécie do gênero que teve o genoma sequenciado devido a sua importância na produção de celulase, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* e *T. citrinoviride* (MUKHERJEE et al., 2013).

## 2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *TRICHODERMA*

O gênero *Trichoderma* tem sido estudado para a produção de enzimas e de outros metabólitos, pois estes fungos são importantes fontes de grande variedade de

produtos naturais únicos estruturalmente e de alta eficiência biológica (XUAN et al., 2014). *Trichoderma* spp. podem secretar uma variedade de metabólitos secundários (aproximadamente 100 compostos) que não apenas contribuem de forma significativa na sinalização de micro-organismos competidores, mas também para interação com outros organismos de diversas maneiras (KESWANI et al., 2014).

Membros deste gênero são produtores importantes de um subgrupo de peptabióticos conhecido como, peptídeos antibióticos que são de importância ecológica e comercial devido as suas propriedades antimicrobianas e anti-câncerígena, como também por sua capacidade de induzir resistência sistêmica em plantas contra a invasão microbiana (REINO et al., 2008; ; CHEN; ZHUANG, 2016.). Outro composto muito conhecido produzido por *Trichoderma* são as pironas (6- pentil pirona), composto volátil responsável pelo “aroma de coco” presente em algumas espécies do gênero, apresentam propriedades antifúngicas e podem promover o crescimento de plantas (MUKHERJEE et al., 2012).

Entre as micotoxinas produzidas por espécies de *Trichoderma* está a gliotoxina, que foi o primeiro metabólito descrito para o gênero, e os tricotecenos que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas e são considerados tóxicos para a saúde humana e animal, causando sintomas indesejáveis, tais como, vômitos, falta de apetite, diarreia, hemorragia e comprometimento do sistema imunológico (REINO et al., 2008). Degenkolb et al. (2008) em seus estudos observaram que com exceção de *Hypocrea rodmanii* todas as espécies do clado Lutea foram produtoras de harzianum A ou trichodermin, tipos de tricotecenos.

Entre outras substâncias produzidas pelo gênero, estão compostos não-polares de baixo peso molecular, tais como, terpenóides, esteróides e policetídeos, como também pepitideos não ribossomais como ETPs (epipolythiodioxopiperazines) e sideróforos (MUKHERJEE et al., 2012). Estes metabólitos apresentam importância biológica variada, tais como, atuam na regulação do crescimento das plantas, apresentam efeito medicinal, atividade antimicrobiana, anti-envelhecimento, atividade antiplasmódica, atuam como agente redutor de colesterol, agente aromatizante e imunossupressor (KESWANI et al., 2014).

### 2.4.1 Produção de enzimas por *Trichoderma*

Diante da diversidade de metabólitos primários e secundários produzidos por *Trichoderma*, as enzimas têm destaque por apresentarem grande aplicabilidade biotecnológica. Por exemplo, a celulase produzida principalmente por *T. reesei* é utilizada em estudos de produção de bioetanol a partir de resíduos de celulose, em indústrias de papel e celulose e nas indústrias têxteis (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; KUMAR et al., 2014).

Diversas pesquisas realizadas ao longo dos anos vêm demonstrando a importância da produção de celulase pelo gênero, como o mutante de *T. reesei* RUT-C30 (ATCC 56765) que é uma das estirpes de fungos filamentosos mais utilizadas para a produção de enzimas celulolíticas, proteínas recombinantes e para a pesquisa acadêmica, e tem sido utilizada a mais de 30 anos (PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

Com a sua longa história na produção de enzima em escala industrial, *Trichoderma* spp. também têm sido extensivamente aplicada para a produção de aditivos alimentares e produtos relacionados, bem como no processo de fabricação de cerveja ( $\beta$ -glucanases), na produção de suco de frutas (pectinases, celulasas e hemicelulasas) e como aditivo alimentar na pecuária (xilanases) (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

Apesar de *T. reesei* ser a espécie mais utilizada em pesquisas relacionadas à produção de enzimas, outras também se destacam neste papel. Iqbal e Kapoor (2012) avaliando a produção de tanase por fungos filamentosos linhagens de diferentes amostras de solo, observaram que *T. harzianum* MTCC 10841 foi o melhor produtor desta enzima. Qualhato et al. (2013) avaliando o micoparasitismo por *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos, observaram que *T. harzianum* e *T. asperellum* além de serem bons antagonistas, também produziram diferentes enzimas como,  $\beta$  - 1,3-glucanase, quitinase, fosfatase ácida e proteases.

Espécies de *Trichoderma* podem ser muito úteis na biorremediação de água e de solo contaminados com compostos tóxicos, isto é possível por meio da produção de enzimas capazes de degradar substâncias recalcitrantes, como as enzimas oxidativas (SADHASIVAM et al., 2009; TRIPATHI et al., 2013).

#### 2.4.1.1 Enzimas oxidativas

Muitas espécies de *Trichoderma* sp. participam ativamente da deslignificação e biodegradação de compostos lignocelulósicos na natureza, esta capacidade está principalmente relacionada a um arsenal de enzimas produzidas por este gênero, entre estas destacam-se as celulases, hemicelulases e as enzimas oxidativas (CHAKROUN et al., 2010; JANUSZ et al., 2013).

As enzimas oxidativas formam um complexo enzimático que inclui as enzimas, lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP, E.C. 1.11.1.13) e lacase (E.C. 1.10.3.2) (ASGHER et al., 2014). Estas enzimas têm baixa especificidade por substratos e forte capacidade oxidativa, apresentando capacidade para remover substâncias xenobióticas que são introduzidas no ambiente a partir de inúmeras atividades industriais, tais como, hidrocarbonetos, fenóis, percloroetileno, corantes azo, carbonos aromáticos, pesticidas, tetracloreto de lignina, substâncias húmicas, entre outras (REBAH; MILED, 2013).

Assim, devido ao seu amplo potencial as enzimas oxidativas têm aplicações potenciais em diversos setores industriais, como no químico, de combustível, alimentício, agrícola, de papel, têxteis, cosméticos, como também na biorremediação, no tratamento de esgotos, descoloração de corantes e biossensores (SUN et al., 2014).

##### 2.4.1.1.1. Lignina peroxidase

A lignina peroxidase (LiP) foi descoberta primeiramente em *Phanerochaete chrysosporium* e desde então várias isoformas desta enzima são conhecidas, sendo produzidas por esta espécie e também por outros fungos (BLODIG et al., 2001). Segundo Janusz et al. (2013) estão identificadas aproximadamente 16 isoenzimas de *Trametes versicolor* e mais de 65 genes de LiPs fúngicas já foram seqüenciados e submetidos ao GenBank.

A LiP é uma glicoproteína monomérica extracelular de 38-46 kDa, dependente de peróxido de hidrogênio e com pH ótimo próximo de 3, possui um grupo heme (ferro protoporfirina IX) e pode apresentar muitas vezes  $\text{Ca}^{2+}$  em sua estrutura (BLODIG et al., 2001). Outra característica deste grupo de enzimas é a sua ocorrência como uma

grande família de isoenzimas, que catalisam uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos e outros compostos resistentes à degradação microbiana (WONG, 2009).

Este processo catalítico ocorre pela oxidação de elétrons seguida de reações não enzimáticas. Desde o início das pesquisas relacionadas à LiP, o álcool veratrílico (álcool 3,4-dimethoxybenzyl) tem desempenhado um papel fundamental no estudo do processo de biodegradação de lignina, pois ele é utilizado como um ensaio para atividade da enzima devido à absorvância facilmente detectável do produto (veratraldeído) a 310 nm (WONG, 2009).

A descoberta da lignina peroxidase foi um grande avanço na compreensão do mecanismo de degradação da lignina e são consideradas como alternativa biológica promissora para a remoção de compostos tóxicos do ambiente. O principal exemplo é a atuação da LiP na indústria têxtil, onde ocorre um grande consumo de água e de componentes químicos durante os processos de tingimento, gerando efluentes altamente complexos e recalcitrantes, que muitas vezes contém corantes considerados carcinogênicos e mutagênicos e que podem ser degradados por estas enzimas (KUNZ et al., 2002).

São poucos os relatos têm sido encontrados na literatura sobre a produção de lignina peroxidase por espécies de *Trichoderma*, como os trabalhos realizados com *T. atroviride* (HÖLKER et al., 1999), *Trichoderma* sp. (DHOUIB et al., 2005) e *T. viride* (NEETHU et al., 2012; GHORBANI et al., 2015).

#### 2.4.1.1.2. Manganês peroxidase

Manganês peroxidase (MnP) é uma enzima extracelular do tipo glicoproteína, que depende de peróxido de hidrogênio e da disponibilidade de íons manganês para sua atividade, e foi observada pela primeira vez em *Phanerochaete chrysosporium* (MARTINEZ et al., 1996; WONG, 2009). As enzimas manganês peroxidases são encontradas na natureza (em micro-organismos, plantas e animais) e catalisam a oxidação de uma grande variedade de substratos naturais e sintéticos (GIANFREDA; BOLLAG, 2002).

O extraordinário potencial de degradação da enzima manganês peroxidase não é limitado a lignina, também pode atuar em substâncias derivadas da lignina, tais

como substâncias húmicas, como organopoluentes diversos, incluindo xenobióticos persistente. A MnP está entre as enzimas mais comuns que apresentam o maior potencial para aplicações industriais, pois nestas enzimas, assim como, na lacase e lignina peroxidase faltam especificidade por um substrato (DE SOUZA; PERALTA, 2003).

O mecanismo de ação desta enzima se inicia com a ligação do peróxido de hidrogênio com ferro nativo da enzima (complexo ferro-peróxido). Em seguida, ocorre a ruptura da ligação O-O do peróxido, que necessita da transferência de dois elétrons do grupo heme da enzima. Esta quebra resulta na formação do radical Fe<sup>4+</sup>-oso porfirina (MnP-I). A quebra da ligação entre os oxigênios do peróxido libera uma molécula de água. Em seguida ocorre uma redução formando MnP-II. Um elétron é doado (Mn<sup>2+</sup>) a este complexo intermediário e ocorre a oxidação à Mn<sup>3+</sup> e nova liberação de uma molécula de água. Esta molécula formada é estabilizada por ácidos orgânicos e age como um agente oxi redutor difuso que ataca as moléculas orgânicas subtraindo um elétron (HOFRICHTER, 2002).

Entre os fungos produtores de MnP, são citados: *Pleurotus eryngii* (MARTINEZ et al., 1996), *Phanerochaete chrysosporium* (WARIISHI et al., 1992), *Ceriporiopsis subvermispora* (CANALES et al., 1998), *Aspergillus terreus* (KANAYAMA et al., 2002), *Aspergillus niger* (CONESA et al., 2002), *T. harzianum* (SOWMYA et al., 2014) e *T. viride* (AFOLABI et al., 2010; GHORBANI et al., 2015)

Alguns trabalhos relacionam o aumento na produção de MnP por espécies fúngicas por meio da interação destas com espécies de *Trichoderma*, como foi visto no trabalho de Hatvani et al. (2002) no qual *T. aureoviride*, *T. harzianum* e *T. viride* foram testados em associação com *Lentinula edodes* e foi observado um aumento na produção da enzima. Mata et al. (2005) em trabalho semelhante também observaram um aumento na produção de MnP quando houve a interação de *T. reesei* e *T. viride* com *Pleurotus* sp.

#### 2.4.1.1.3. Lacase

Lacases são polifenoloxidasas com massa molecular de aproximadamente 70 kDa, que pertencem à família de proteínas globulares multi-cobres que incluem ascorbato oxidase, ceruplasmina e bilirrubina oxidases. Contêm em sua estrutura de

10 a 25% de carboidrato *n*-ligado, podendo ainda apresentar estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, dependendo da espécie ou da isoforma. São enzimas que reduzem o oxigênio molecular à água e, simultaneamente, realizam oxidação de elétrons de vários substratos, como polifenóis, diaminas e alguns compostos inorgânicos (THURSTON, 1994; PIONTEK et al., 2002).

A ação da lacase é garantida pela presença de diferentes sítios de cobre presentes na enzima. Usualmente as lacases de fungos contêm quatro átomos de cobre distribuídos em três sítios de ligação diferentes, que são identificados por densidade eletrônica (BALDRIAN, 2006). A catálise realizada pela lacase ocorre em três etapas: (1) sítio I redução do cobre pelo substrato; (2) transferência de elétrons do sítio de cobre I para sítio II e sítio III; (3) redução do oxigênio para a água no conjunto trinuclear (KUDANGA et al., 2011).

A lacase também pode atuar em substratos não fenólicos através da inclusão de mediadores que são um grupo de compostos orgânicos de baixo peso molecular que podem ser oxidados pela lacase primeiro formando cátion altamente ativo capaz de oxidar compostos não fenólicos que a lacase naturalmente não poderia oxidar. Os mediadores sintéticos mais comuns são HBT (1-hidroxibenzotriazol), ABTS (2,2'-azido-bis ácido-3-etilbeniltioazolina-6-sulfônico) e VLA (Ácido violúrico) (TAVARES, 2006; BRIJWANI et al., 2010). A capacidade desta enzima de catalizar diferentes substratos aromáticos resultaram em um grande número de aplicações biotecnológicas. Estas incluem a descoloração e detoxificação de corantes têxteis e efluentes, deslignificação de celulose, produção de etanol, na remoção de compostos fenólicos de vinhos e outras bebidas, transformação de antibióticos, esteróides e muitos compostos aromáticos (D'SOUZA-TICLO et al., 2009).

São produzidas por fungos, plantas superiores, insetos e bactérias, e foram observadas pela primeira vez no exsudato da árvore japonesa *Rhus vernicifera* e alguns anos mais tarde foi também observada em fungos (BALDRIAN, 2006).

Nas plantas, lacases são encontradas em repolhos, nabo, batatas, pêras, maçãs e outros vegetais. Em fungos foram isoladas de Ascomycetes e Basidiomycetes (SHRADDHA et al., 2011), entre eles, *Trametes versicolor* (CORDI et al., 2007), *Pleurotus ostreatus* (MANSUR et al., 2003), *Tricholoma mongolicum* (MIAO et al., 2010), *Xylaria polymorpha* (CHAPARRO et al., 2009), *Aspergillus sclerotiorum* e *Cladosporium cladosporioide* (BONUGLI-SANTOS et al., 2010), *T. atroviride*, *T.*

*longibrachiatum* e *T. viride* (GOCHEV; KRASTANOV, 2007), *T. harzianum* (SOWMYA et al., 2014), *T. erinaceum* (INGLE; MISHRA, 2016), *T. asperellum* (SHANMUGAM et al., 2017) e *T. lixii* (ADNAN et al., 2017).

*Trichoderma* sp. são conhecidas como excelentes produtoras de lacase, e devido a este potencial são realizadas diversas pesquisas relacionadas a produção da enzima por este gênero. Sadhasivam et al. (2009) avaliaram a capacidade da lacase produzida por *T. harzianum* em descolorir corantes de várias classes. Em estudo semelhante realizado por Shanmugam et al. (2017), a lacase produzida por *T. asperellum* foi utilizada para otimização da degradação do corante catiônico Violeta Cristal, obtendo excelentes resultados. E Divya et al. (2014) analisaram a produção de lacase por cepas de *T. viride* isoladas de estuários de Kerala, na Índia, um ambiente altamente salino e poluído com compostos fenólicos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICRO-ORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para os estudos taxonômicos e biotecnológicos foram utilizados 51 e 50 isolados, respectivamente, de diferentes espécies de *Trichoderma* preservados na Micoteca URM (Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Brasil), provenientes de diferentes substratos. As amostras foram mantidas em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) contido em tubos de ensaio até a utilização.

#### 3.2 ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA

Para confirmação taxonômica dos isolados de *Trichoderma* depositados na Micoteca URM, foi realizada a análise morfofisiológica. Desta forma, as taxas de crescimento foram determinadas em BDA (Batata Dextrose Agar, Difco) a 30, 35, 40°C e em SNA (Synthetic Low-Nutrient Agar) a 35°C, ao abrigo da luz. Para preparar o inóculo, as culturas foram incubadas a 25°C durante três dias, em meio Ágar Fubá com 2% de Dextrose (AFD) contido em placas de Petri. Após sete dias foi retirado o inóculo de 6 mm de diâmetro e colocado a uma distância de 10 mm da borda da placa. As medições e a detecção da produção de 6-pentil pirona (odor de coco) das colônias foram realizadas após 96h de crescimento. As características morfológicas microscópicas (medição dos conídios e fiálides, presença de clamidósporo, hifa estéril) foram observadas em microscopia de luz a partir de culturas crescidas por quatro dias em BDA a 25°C, com 12h de luz fluorescente e 12h no escuro, a partir de lâminas preparadas com ácido láctico 85-90%. (SAMUELS et al., 2012).

##### 3.2.1 Análise dos dados fenotípicos

Foi aplicada uma análise de agrupamento e foi construído um dendrograma de relação fenotípica. A análise foi realizada com os caracteres fenotípicos que apresentaram pelo menos alta associação com cada espécie de *Trichoderma*, tais como: forma dos conídios, ornamentação, cor, comprimento e largura, comprimento e

largura da base das fiálides e presença de hifas e clamidósporos estéreis e diâmetro da colônia em BDA a 30, 35 e 40°C e SNA a 35°C. A análise foi feita usando o agrupamento hierárquico com o método de ligação completo e foi realizada com o pacote estatístico JMP 8.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

### 3.3 ANÁLISE MOLECULAR

#### 3.3.1 Extração do DNA e amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 e do gene *tef1*

Para extração do DNA, os fungos foram cultivados em Meio Mínimo líquido a 28 °C por 96h sob condição estática, em seguida, foi realizada a filtração e o micélio coletado e utilizado para a extração do DNA genômico pelo método de Griffiths et al. (2000).

As reações de amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 e do gene *tef1* (fator de alongamento da tradução 1- alfa) foram conduzidas em volume de 50 µl utilizando tampão da Taq DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, e 0,2 U de Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA. Os primers utilizados foram ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por White et al. (1990) e EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') descrito por Carbone e Kohn (1999) e *tef1* rev (5'-GCC ATC CTT GGA GAT ACC AGC-3') descrito por Samuels et al. (2002).

Os parâmetros dos ciclos térmicos consistiram em desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 s; anelamento a 55 °C por 30 s; extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min (SAMUELS et al. 2002). Os produtos da amplificação foram visualizados a partir de eletroforese em gel de agarose (1%) corados com 0,5 µg de GelGreen™ /ml, sob luz UV, fotografados e posteriormente purificados utilizando o kit Fermentas®, para serem sequenciados na Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### 3.3.2 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

Os eletroferogramas foram analisados e editados no software Staden Package 2.0 (STADEN et al., 1998) e as sequências obtidas foram utilizadas para busca das

mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências experimentais da região ITS e do gene *tef1* foram alinhadas e editadas em conjunto com as recuperadas da base de dados utilizando o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A árvore filogenética foi construída por meio do método de neighbor joining (NJ) e máxima parcimônia (MP), com 5000 reamostragens de bootstrap utilizando o programa MEGA 5.

### 3.4 EFLUENTE TÊXTIL E CORANTE

O efluente têxtil foi coletado diretamente dos tanques de armazenamento em uma Indústria de beneficiamento de jeans localizada polo têxtil Toritama, Pernambuco, Brasil. Após a coleta, o efluente foi refrigerado a 4°C para a realização da análise físico-química pelo Laboratório de Engenharia Ambiental e de Qualidade – LEAQ – do Departamento de Química da UFPE (Tabela 1) e para os ensaios de descoloração. O corante sintético utilizado foi Índigo Carmine da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

Tabela 1 – Análise físico-química do efluente têxtil coletado em uma Indústria de beneficiamento de jeans em Toritama – PE, Brasil

Análises	DQO (mg de O <sub>2</sub> /l)	DBO (mg de O <sub>2</sub> /l)	Cor (HAZEN)	Turbidez (NTU)	pH	SD (ml/l)
Efluente	3192,5	54,1	448,0	0,19	5,11	7,0

DQO – Demanda Química de Oxigênio, DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio e SD – Sólidos Sedimentáveis

### 3.5 ENSAIO DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL

Para avaliação da descoloração do corante têxtil por isolados de *Trichoderma*, discos de 6 mm de diâmetro das culturas fúngicas (50 linhagens de *Trichoderma*) crescidas em meio de cultura BDA a 30°C por 7 dias, foram transferidos para frascos de Erlenmeyers (125 ml) contendo 30 ml do meio Malte acrescido do corante Índigo Carmine (0,05% m/v) e incubados no escuro, a 28°C por 8 dias. Ao término deste período, a biomassa produzida foi separada por filtração em membrana Millipore (0,45

µm) e o filtrado utilizado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 650 nm. O meio contendo corante não inoculado foi utilizado como controle (SILVA, 2012).

### 3.5.1 Avaliação da descoloração do corante têxtil

A percentagem de descoloração do corante Índigo Carmine foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (MIRANDA et al., 2013):

$$D_{\%} = \frac{AbsT_0 - AbsT_x}{AbsT_0} \times 100$$

Onde D% = percentual de descoloração;

AbsT<sub>0</sub> = Absorbância inicial;

AbsT<sub>x</sub> = Absorbância final.

## 3.6. ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM MEIO LÍQUIDO

Para determinar a atividade das enzimas oxidativas, lacase (Lac), lignina peroxidase (LIP) e manganês peroxidase (MnP), discos de 6mm de diâmetro das culturas fúngicas (incubadas a 30°C durante 7 dias) foram inoculados em frascos de Erlenmeyers (125 ml) contendo 50 ml do meio de cultura basal para a produção das enzimas (modificado), contendo: 0,10 g de glicose, 0,15 g de extrato de levedura, 4,5 g de farelo de trigo e 0,05 g de NH<sub>4</sub>Cl, pH 6,0 (BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

A incubação ocorreu em condição estática, ao abrigo da luz, a 28°C por oito dias. Ao término deste período, a biomassa foi separada por filtração em membrana Millipore (0,45 µm) e o filtrado foi utilizado para a determinação da atividade de cada enzima por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro.

### 3.6.1. Ensaios enzimáticos

A atividade de Lacase foi mensurada a partir da oxidação do 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS), pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420nm em espectrofotômetro (Hitachi U-5100). Para preparação da mistura foi utilizado 0,8 ml de

ABTS (0,03 % v/v), 0,1 ml de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) e 0,1 ml do extrato enzimático (BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

A atividade de Lignina Peroxidase foi determinada a partir oxidação do álcool veratrílico utilizado como substrato, para isto utilizou-se 1 ml de solução tampão tartarato de sódio (125 mM pH 3,0), 500 µl de álcool veratrílico (10mM), 500 µl de peróxido de hidrogênio (2 mM) e 500 µl de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do peróxido de hidrogênio à mistura e o aparecimento de veratraldeído foi determinado a 310 nm em espectrofotômetro (ARORA; GILL, 2001).

A atividade da enzima Manganês Peroxidase foi mensurada utilizando a metodologia de medição da oxidação do vermelho de fenol (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação foi composta de 500 µl de extrato enzimático, 100 µl de vermelho de fenol, 100 µl de lactato de sódio (250 mM), 200 µl de albumina bovina (0,5 % p/v), 50 ml de sulfato de manganês (2 mM) e 50 ml de peróxido de hidrogênio (2 mM) em tampão succinato de sódio (20 mM, pH 4,0). As reações ocorreram a 30°C por 5 minutos e foram interrompidas pela adição de NaOH 2N (40 µl) e a atividade lida em espectrofotômetro a 610 nm.

Para todos os ensaios enzimáticos uma unidade de enzima foi definida como a liberação de 1,0 µmol do produto formado por minuto sob as condições do ensaio. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade no Programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

### 3.7 BIOTRATAMENTO DO EFLUENTE TÊXTIL

#### 3.7.1 Ensaio de descoloração do efluente têxtil

A fim de avaliar o efeito da esterilização do efluente sobre a descoloração de corante presente no efluente têxtil, foram preparados três ensaios, onde três discos de 6mm de diâmetro das culturas fúngicas (crescidas em BDA a 30°C durante 7 dias) foram inoculados em frascos Erlenmeyer (125ml) contendo 30 ml do efluente têxtil puro no primeiro ensaio, com efluente têxtil acrescentado de farelo de trigo (0,5 % m/v) no segundo ensaio e com efluente têxtil acrescentado de 0,5g de extrato de levedura/l, no terceiro ensaio. Após a inoculação, os fracos foram incubados em condição

estática, no escuro, a 28°C por oito dias. Após esse período, alíquotas de 2ml foram retiradas a partir dos frascos Erlenmeyer e centrifugadas a 1035xg por 15 min a 4°C, para a verificação da descoloração de efluente têxtil a partir da leitura da absorbância (660 nm) em espectrofotômetro.

### 3.7.2 Delineamento experimental e otimização da descoloração do efluente têxtil

Os isolados mais promissores foram avaliados quanto à influência dos seguintes parâmetros na degradação do efluente têxtil: temperatura, concentração da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e pH, para selecionar a melhor condição de degradação (MOHANA et al., 2008; PATRICK et al., 2011) (Tabela 2). O experimento foi realizado em um planejamento fatorial completo  $2^3$  com níveis -1 e +1 e cinco pontos centrais (zero), utilizando o Programa STATISTICA versão 13 (2015). Após a inoculação, os frascos foram incubados em condições estáticas e no escuro, durante um período de 8 dias.

Tabelas 2 – Níveis e variáveis independentes que foram escolhidas para o estudo de melhores condições de descoloração do efluente têxtil

Fator	Variáveis	Unidade	Níveis		
			-1	0	+1
A	Temperatura	°C	25	30	35
B	Extrato de levedura	g.L <sup>-1</sup>	0,5	1,0	1,5
C	pH	pH	5,0	6,0	7,0

### 3.7.3 Avaliação da descoloração do efluente

A percentagem de descoloração do efluente têxtil foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (MIRANDA et al., 2013):

$$D_{\%} = \frac{AbsT_0 - AbsT_x}{AbsT_0} \times 100$$

Onde D% = percentual de descoloração;

AbsT<sub>0</sub>= Absorbância inicial;

AbsT<sub>x</sub> = Absorbância final.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR

Cinquenta e um isolados de fungos obtidas da Micoteca URM e pertencentes ao gênero *Trichoderma* foram avaliadas. Os dados obtidos a partir da análise morfofisiológica (Tabela 3) mostram uma clara dificuldade de agrupamento das linhagens por meio dessas características observadas, quando se utilizou uma análise de agrupamento (Figura 3).

Sabe-se que, devido à homoplasia (isto é, a evolução convergente que cria traços análogos, com forma semelhante, mas que não estavam presentes no último ancestral comum) de caracteres morfológicos, é muitas vezes impossível discriminar espécies de *Trichoderma*. Não obstante, para outros grupos taxonômicos fúngicos, o agrupamento estatístico de traços fenotípicos, como forma de conídios, ornamentação e dimensões (comprimento e largura) é normalmente um dado muito bom para a identificação de espécies quando combinado com outras características (RODRIGUES et al., 2011; SILVA et al., 2015).

É bem conhecido que a variação geral nas dimensões dos conídios em *Trichoderma* não é grande. Contudo, as espécies relacionadas podem muitas vezes ser separadas por diferenças de tamanho ligeiras mas consistentes. O conidio de parede lisa pode ser visto na maioria das espécies quando observadas em microscópio de luz, embora muitas espécies, que tenham conídios aparentemente de parede lisa, tenham na verdade conídios com parede delicadamente ornamentada, quando examinadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Na maioria das espécies, as fiálides terminais tendem a ser mais alongadas e mais estreitas, e frequentemente mais ou menos subuladas, ou seja, estreita na base e afinando uniformemente na ponta. Clamidósporos são comuns em muitas espécies, e eles tendem a ser uniformemente globoso ou elipsoidal, terminal e intercalar, de paredes lisas, incolor, amarelado ou esverdeado, e medindo 6-15µm diâmetro na maioria das espécies. Hifas vegetativas mostram poucos caracteres úteis para identificação (Figura 4).

Tabela 3 – Caracteres morfofisiológicos utilizados para a revisão taxonômica de espécimes de *Trichoderma* depositadas na Micoteca URM

Número da linhagem	Conídio			Fiálide				Hifa estéril	Clamidosporo	Cultura em BDA (mm)			Cultura em SNA (mm)	Odor de coco
	Forma	Ornamentação	Coloração	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento (µm)	Largura da Base (µm)			30°C	35°C	40°C	35°C	
URM3343	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	8,5-10,2	2,0-2,6	Ausente	Ausente	73,0	14,0	Ø	6,0	Ausente
URM3735	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	8,5-10,2	2,6-3,1	Ausente	Ausente	44,0	Ø	Ø	Ø	Presente
URM3734	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	8,5-10,2	2,6-3,1	Ausente	Ausente	71,0	Ø	Ø	Ø	Presente
URM6625	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	2,8-3,4	2,7-3,2	8,5-10,2	1,8-2,0	Ausente	Ausente	69,0	Ø	Ø	Ø	Ausente
URM4162	Elipsoidal	Liso	Verde	4,2-4,8	2,7-3,2	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Presente	73,0	20,0	Ø	17,0	Ausente
URM3341	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Presente	Presente	54,0	Ø	Ø	Ø	Ausente
URM3476	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Presente	Presente	63,0	Ø	Ø	Ø	Ausente
URM5351	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	8,5-10,2	1,8-2,0	Presente	Presente	75,0	35,0	Ø	36,0	Ausente
URM6668	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Presente	79,0	44,0	Ø	38,0	Ausente
URM3935	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Ausente	Ausente	58,0	20,0	Ø	14,0	Ausente
URM5574	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,8-3,4	1,8-2,2	6,8-8,5	1,8-2,0	Presente	Ausente	65,0	7,0	Ø	6,0	Ausente
URM4463	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,8-3,4	1,8-2,2	8,5-10,2	1,8-2,0	Ausente	Ausente	78,0	29,0	Ø	29,0	Ausente
URM2842	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	10,2-11,9	2,0-2,6	Ausente	Ausente	71,0	13,0	Ø	10,0	Ausente
URM6669	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Ausente	Ausente	58,0	17,0	Ø	12,0	Ausente
URM5158	Elipsoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	2,2-2,7	10,2-11,9	2,6-3,1	Ausente	Presente	83,0	83,0	31,0	80,0	Ausente
URM6656	Subgloboso a ovoidal	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	8,5-10,2	2,0-2,6	Ausente	Presente	77,0	22,0	Ø	18,0	Presente
URM3492	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,8-3,4	2,7-3,2	10,2-11,9	1,8-2,0	Presente	Presente	64,0	25,0	Ø	9,0	Ausente
URM3606	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	13,6-15,2	2,0-2,6	Ausente	Ausente	54,0	12,0	Ø	3,0	Ausente
URM3276	Oblonga	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	5,1-6,8	2,6-3,1	Presente	Presente	67,0	9,0	Ø	Ø	Ausente
URM3280	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	10,2-11,9	1,8-2,0	Ausente	Presente	67,0	9,0	Ø	7,0	Presente
URM6239	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	3,2-3,6	8,5-10,2	1,8-2,0	Ausente	Ausente	77,0	24,0	Ø	16,0	Presente
URM3086	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	10,2-11,9	1,8-2,0	Ausente	Presente	51,0	31,0	Ø	23,0	Ausente
URM4926	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	3,2-3,6	8,5-10,2	1,8-2,0	Presente	Presente	71,0	32,0	Ø	27,0	Ausente
URM3197	Subgloboso a ovoidal	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	10,2-11,9	2,6-3,1	Ausente	Presente	52,0	24,0	Ø	18,0	Ausente
URM4950	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	8,5-10,2	2,6-3,1	Ausente	Ausente	77,0	Ø	Ø	Ø	Presente
URM3601	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	8,5-10,2	2,6-3,1	Ausente	Ausente	80,0	Ø	Ø	Ø	Presente
URM3270	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	8,5-10,2	2,6-3,1	Ausente	Ausente	40,0	Ø	Ø	Ø	Ausente
URM4172	Elipsoidal	Liso	Verde	4,2-4,8	3,2-3,6	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Presente	46,0	9,0	Ø	8,0	Presente
URM4722	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Presente	Presente	42,0	Ø	Ø	Ø	Ausente
URM4475	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Ausente	Ausente	68,0	17,0	Ø	13,0	Ausente
URM5482	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Ausente	Ausente	57,0	31,0	Ø	28,0	Ausente
URM4720	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	2,4-2,7	2,2-2,7	8,5-10,2	2,0-2,6	Ausente	Ausente	64,0	15,0	Ø	11,0	Ausente
URM6266	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	5,1-6,8	1,8-2,0	Ausente	Presente	79,0	28,0	Ø	11,0	Ausente
URM4328	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,4-2,7	1,8-2,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Ausente	Ausente	50,0	8,0	Ø	8,0	Ausente
URM3487	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,2-2,7	10,2-11,9	1,8-2,0	Ausente	Presente	74,0	28,0	Ø	24,0	Presente

Continua...

Continuação...

Número da linhagem	Conídio			Fiálide				Hifa estéril	Clamidosporo	Cultura em BDA (mm)			Cultura em SNA (mm)	Odor de coco
	Forma	Ornamentação	Coloração	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento (µm)	Largura da Base (µm)			30°C	35°C	40°C	35°C	
URM3271	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	3,2-3,6	8,5-10,2	1,8-2,0	Ausente	Ausente	65,0	26,0	Ø	15,0	Presente
URM3881	Elipsoidal	Liso	Verde	4,2-4,8	3,2-3,6	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Presente	50,0	14,0	Ø	11,0	Presente
URM3732	Elipsoidal	Liso	Verde	4,9-5,5	2,7-3,2	5,1-6,8	2,0-2,6	Ausente	Ausente	75,0	75,0	56,0	77,0	Ausente
URM4723	Elipsoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	1,8-2,2	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Ausente	76,0	8,0	Ø	15,0	Ausente
URM4745	Elipsoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	1,8-2,2	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Ausente	74,0	10,0	Ø	17,0	Ausente
URM3880	Elipsoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	1,8-2,2	6,8-8,5	1,8-2,0	Ausente	Ausente	72,0	11,0	Ø	13,0	Ausente
URM5007	Subgloboso a ovoidal	Finamente verrucoso	Verde	2,8-3,4	2,7-3,2	8,5-10,2	2,0-2,6	Ausente	Ausente	78,0	44,0	Ø	23,0	Presente
URM4358	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	3,5-4,1	2,2-2,7	10,2-11,9	1,8-2,0	Ausente	Presente	76,0	25,0	Ø	20,0	Presente
URM3934	Globoso a subgloboso	Finamente verrucoso	Verde	3,5-4,1	2,2-2,7	10,2-11,9	1,8-2,0	Ausente	Presente	75,0	23,0	Ø	21,0	Presente
URM5629	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	2,2-2,7	13,6-15,2	1,8-2,0	Ausente	Presente	56,0	28,0	Ø	27,0	Ausente
URM4210	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	13,6-15,2	2,0-2,6	Ausente	Ausente	82,0	27,0	Ø	24,0	Ausente
URM4466	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Presente	Presente	53,0	21,0	Ø	20,0	Ausente
URM4951	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	3,5-4,1	2,7-3,2	10,2-11,9	2,0-2,6	Presente	Presente	66,0	43,0	Ø	16,0	Ausente
URM2820	Subgloboso a ovoidal	Liso	Verde	2,8-3,4	1,8-2,2	6,8-8,5	2,0-2,6	Ausente	Ausente	74,0	23,0	Ø	19,0	Ausente
URM4996	Globoso a subgloboso	Liso	Verde	4,2-4,8	3,2-3,6	8,5-10,2	2,6-3,1	Ausente	Presente	69,0	35,0	Ø	25,0	Ausente
URM2596	Subgloboso a ovoidal	Liso	Branco a amarelo	3,5-4,1	2,7-3,2	13,6-15,2	2,6-3,1	Ausente	Presente	73,0	28,0	Ø	28,0	Ausente

Ø – Não cresceu na temperatura indicada.

Figura 3 – Dendrograma utilizando a análise de agrupamento hierárquico (ligação média entre grupos) de parentesco entre os isolados de *Trichoderma* com base nos dados da análise morfológica

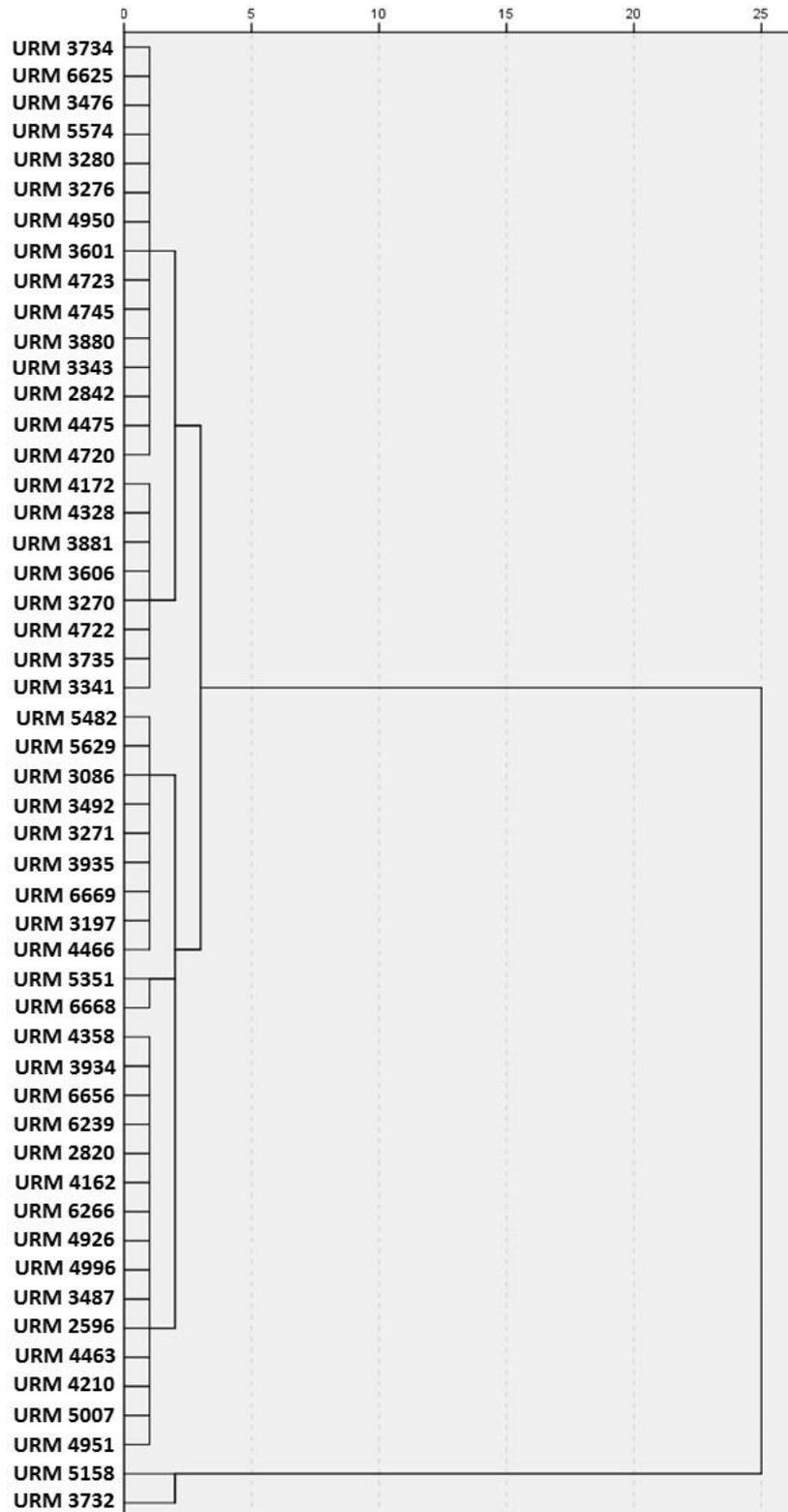
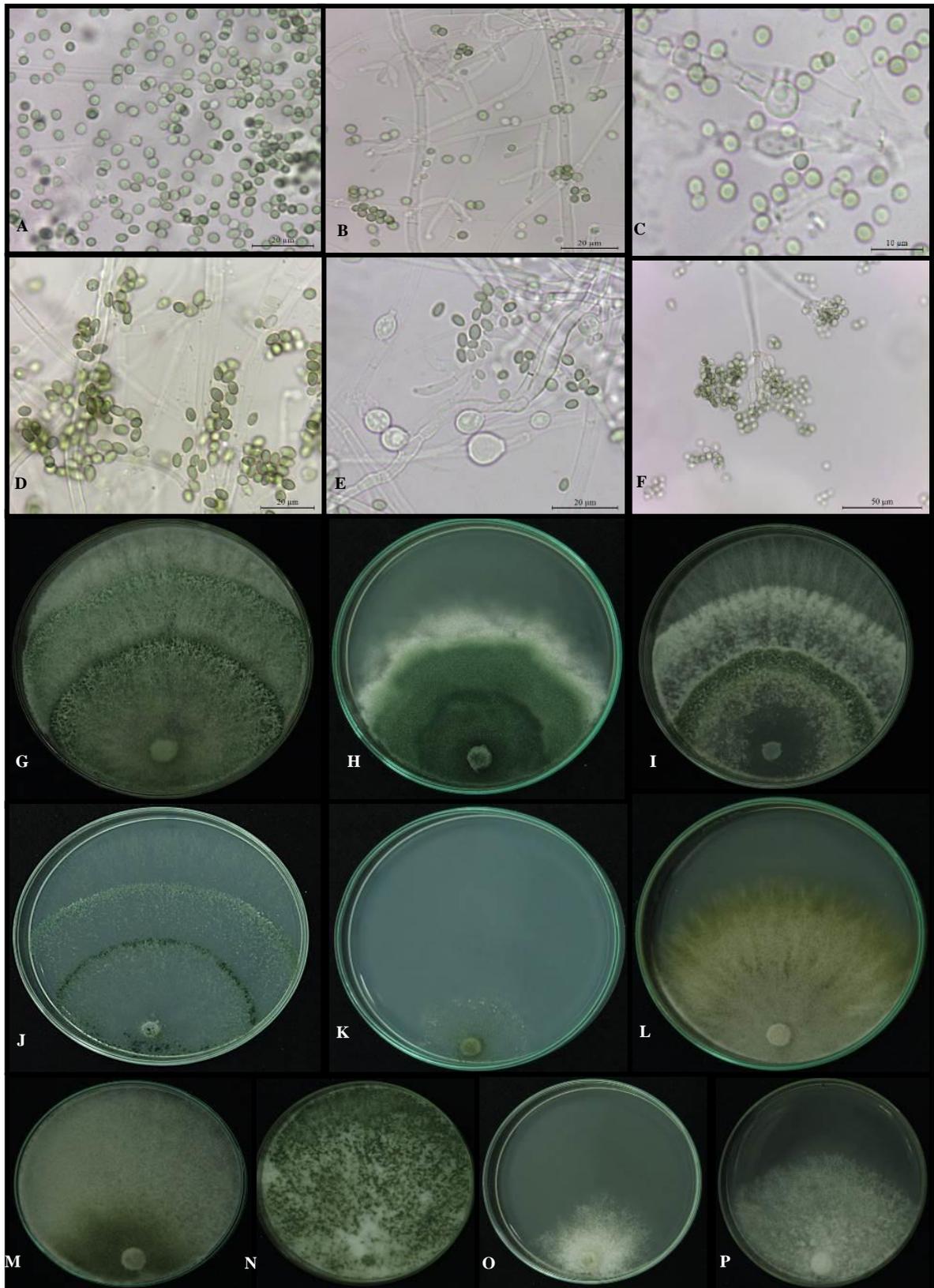


Figura 4 – Espécies de *Trichoderma* utilizadas neste estudo. A-E Estruturas microscópicas. A- *T. asperellum* URM 3343; B- *T. asperelloides* URM 3086; C- *T. atroviride* URM 3601; D- *T. ghanense* URM 3732; E- *T. longibrachiatum* URM 5158; F- *T. virens* URM 4466. G-P Culturas em BDA (30, 35 e 40°C) e SNA (35°C). G e J –URM 3343 em BDA a 30°C e SNA 35°C após 96h; H e K - URM 3086 em BDA a 30°C e SNA 35°C após 96h; I e L - URM 3601 e URM 4466 em BDA a 30°C após 96h; M e N - URM 3732 e URM 5158 em BDA a 35°C após 96h; O e P- URM 3732 e URM 5158 em BDA a 40°C após 96h



Isto significa que a identificação baseada nas técnicas clássicas pode ser utilizada como abordagem presuntiva. No entanto, para obter uma boa e confiável identificação, a biologia molecular é necessária (OLIVEIRA et al., 2015). Como consequência, no presente estudo, a informação taxonômica foi revisada ao longo da análise de biologia molecular baseada nos fragmentos de 500 e 600 pares de bases obtidos a partir das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e do gene *tef1* do rDNA, respectivamente.

Através da análise filogenética baseada na região ITS, clados imprecisos foram observados e os agrupamentos observados para algumas espécies de *Trichoderma* não estavam claros (Figura 5). Por exemplo, para espécies crípticas como *T. aspereloides* e *T. asperellum*, a região ITS não foi suficientemente discriminatória. Em contraste, através da análise do gene *tef1* as espécies *T. aspereloides* e *T. asperellum* foram bem delineadas. Na Figura 6 é possível observar 6 clados suportados com bootstrap acima de 85%: Viride (*Trichoderma koningiopsis*, *T. erinaceum* e *T. atroviride*), Hamatum (*Trichoderma asperellum*, *T. asperelloides* e *T. hamatum*); Longibrachiatum (*Trichoderma longibrachiatum* e *T. ghanense*); Lone lineages (*Trichoderma spirale*), Virens (*Hypocrea virens* / *Trichoderma virens*) e Harzianum (*Hypocrea lixii* / *Trichoderma harzianum*).

Com base na identificação anterior disponível nos registros da Micoteca URM, os 51 isolados fúngicos foram distribuídos em 6 espécies de *Trichoderma*, conforme demonstrado na Tabela 4. Com base na análise de biologia molecular aqui apresentada, foi possível separá-los em 11 Espécies diferentes: *Trichoderma asperelloides* (8 cepas), *T. asperellum* (4), *T. atroviride* (6), *T. erinaceum* (3), *T. ghanense* (1), *T. hamatum* (4), *T. harzianum* (13), *T. koningiopsis* (4), *T. longibrachiatum* (1), *T. spirale* (1) e *T. virens* (6) (Tabela 4). Em geral, apenas 10 dos 51 isolados (cerca de 20%) conservaram a sua identificação anterior, são eles *T. hamatum* (URM 3492), *T. harzianum* (URM 4475, 5482, 4720, 6266 e 4328) e *T. virens* (URM 4358, 3934, 3343 e 6656).

O conhecimento da distribuição geográfica das espécies de *Trichoderma* é de extrema importância para a identificação correta, já que algumas espécies apresentam distribuição retrita, como *T. viride* que é uma espécie relativamente rara e restrita as regiões da Europa e América do Norte, e *T. aureoviride* que tem uma distribuição limitada ao norte da Europa (HOYOS-CARVAJAL E BISSETT, 2011).

Algumas linhagens depositadas na Micoteca URM estavam identificadas como *T. viride* e *T. aureoviride*, mas após as análises foram reconhecidas com espécies diferentes da identificação original. Desta forma, a utilização de ferramentas moleculares em conjunto com as ferramentas morfofisiológicas foi de inestimável importância para a caracterização de espécies de *Trichoderma* pertencentes ao acervo da Micoteca URM e provou a necessidade de constante atualização do acervo, tendo em vista que a literatura referente à identificação de *Trichoderma* sofre modificações contínuas com a frequente inserção de novas espécies.

Tabela 4. Re-identificação de linhagens de *Trichoderma* da Micoteca URM após caracterização morfofisiológica e molecular

URM	Identificação Revisada	Identificação Original	Ano de Depósito	Substrato	Origem geográfica (Brasil)
3280	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. harzianum</i>	1992	Solo	Paraná
6239	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. harzianum</i>	2010	Solo	Pernambuco
3086	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. harzianum</i>	1989	Folha de <i>R. gardenioides</i>	São Paulo
3487	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. koningii</i>	1994	Fezes de aves	Pernambuco
3271	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. koningii</i>	1992	Desconhecido	São Paulo
5007	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	2005	Solo	Pernambuco
4358	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	2001	Solo	Pernambuco
3934	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	1997	Água	Pernambuco
3343	<i>T. asperellum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1993	Desconhecido	Pernambuco
6656	<i>T. asperellum</i>	<i>T. hamatum</i>	2012	Solo com efluente têxtil	Pernambuco
4926	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	2005	Argila	Pernambuco
3197	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	1990	Castanha do Pará	Pará
3735	<i>T. atroviride</i>	<i>T. aureoviride</i>	1997	Água do rio	Pernambuco
3734	<i>T. atroviride</i>	<i>T. aureoviride</i>	1997	Água do rio	Pernambuco
6625	<i>T. atroviride</i>	<i>T. aureoviride</i>	2012	Solo de Agrofloresta	Pernambuco
4950	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	2005	Solo	Pernambuco
3601	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	1995	Desconhecido	Paraná
3270	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	1992	Desconhecido	São Paulo
4162	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1999	Rizosfera de Girassol	Pernambuco
4172	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. harzianum</i>	1999	Rizosfera de Girassol	Pernambuco
3881	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. koningii</i>	1997	Solo de cultura de <i>P. edulis</i>	Pernambuco
3732	<i>T. ghanense</i>	<i>T. koningii</i>	1997	Água do rio	Pernambuco

Tabela 4. (Cont.) Re-identificação de linhagens de *Trichoderma* da Micoteca URM após caracterização morfofisiológica e molecular

URM	Identificação Revisada	Identificação Original	Ano de Depósito	Substrato	Origem geográfica (Brasil)
3341	<i>T. hamatum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1992	Rizosfera de <i>V. herbacea</i>	São Paulo
3476	<i>T. hamatum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1993	Rizosfera de <i>V. herbacea</i>	São Paulo
3492	<i>T. hamatum</i>	<i>T. hamatum</i>	1994	Fezes de aves	Pernambuco
4722	<i>T. hamatum</i>	<i>T. harzianum</i>	2003	Jardim de <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
5351	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2006	Cana-de-açúcar	Unknown
6668	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2012	Solo com efluente têxtil	Pernambuco
3935	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1997	Água do rio	Pernambuco
5574	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2007	Sedimento de manguezal	Pernambuco
4463	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2002	Água do mar	Pernambuco
2842	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1986	Desconhecido	Pernambuco
6669	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2012	Solo com efluente têxtil	Pernambuco
4475	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2002	Areia da praia	Pernambuco
5482	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2007	Desconhecido	São Paulo
4720	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2003	Jardim de <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
6266	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2010	Solo de Agrofloresta	Pernambuco
4328	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2001	Solo de mina	Bahia
2820	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>	1985	Bagaço de cana-de-açúcar	Alagoas
3606	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. hamatum</i>	1995	Desconhecido	Paraná
4723	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningii</i>	2003	Jardim de <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
4745	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningii</i>	2003	Jardim de <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
3880	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningii</i>	1997	Solo de cultura de <i>P. edulis</i>	Pernambuco
5158	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2005	Cimento	Pernambuco
3276	<i>T. spirale</i>	<i>T. hamatum</i>	1991	Sorgo	Pernambuco
5629	<i>T. virens</i>	<i>T. hamatum</i>	---	Desconhecido	Paraná
4210	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	1999	Rizosfera de Girassol	Pernambuco
4466	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	2002	Água do mar	Pernambuco
4951	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	2005	Solo	Pernambuco
4996	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	2005	Solo	Pernambuco
2596	<i>T. virens</i>	<i>T. viride</i>	1980	Desconhecido	Pernambuco

Figura 5 – Reconstrução filogenética das sequencias obtidas de linhagens de *Trichoderma* da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos ITS I + 5.8S + ITSII (rDNA). *Hyphomyces subiculosus* foi o grupo externo. Valores de bootstrap (em %) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança e do método de Máxima Parcimônia com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 bootstraps), respectivamente. Somente valores acima de 50% são apresentados.

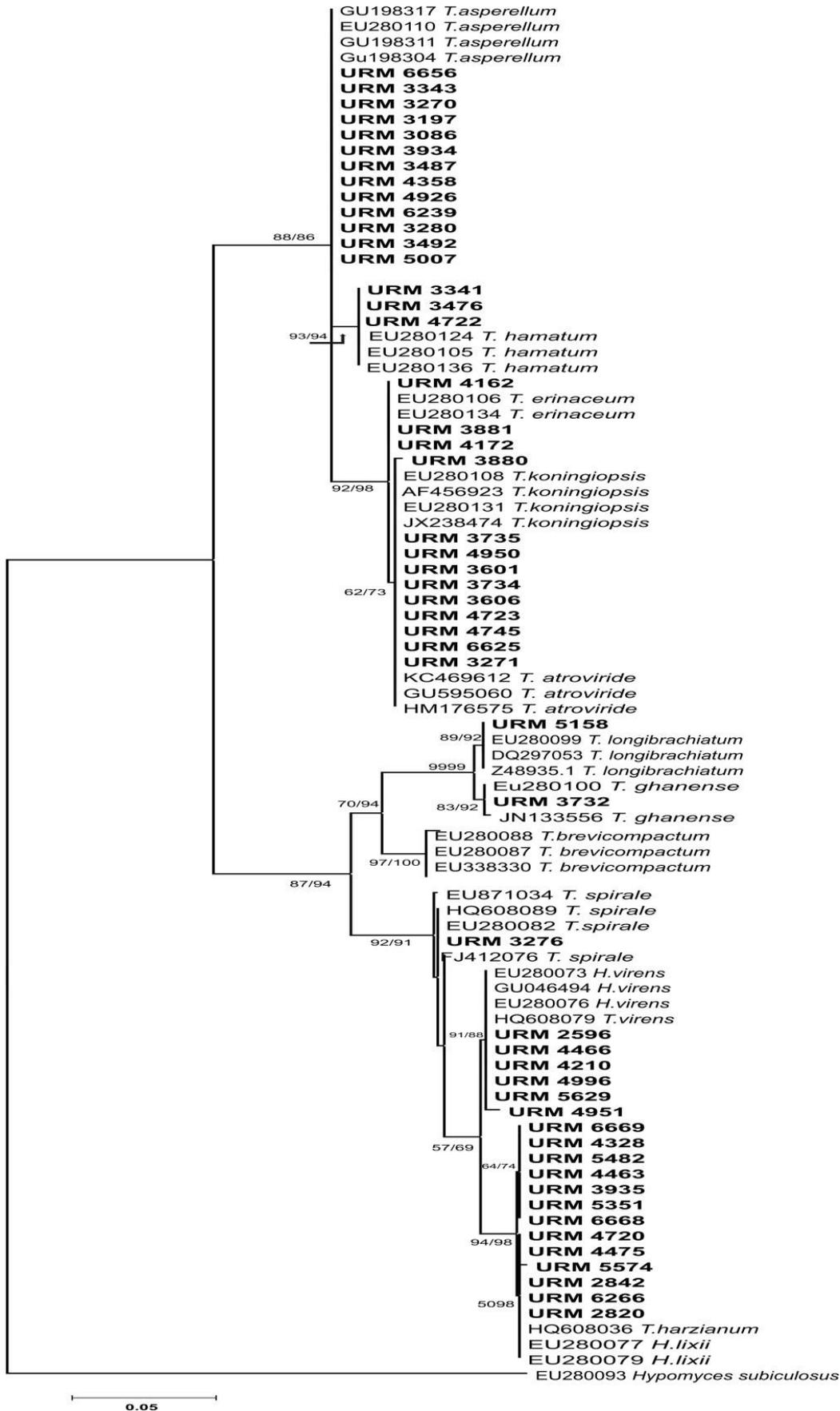
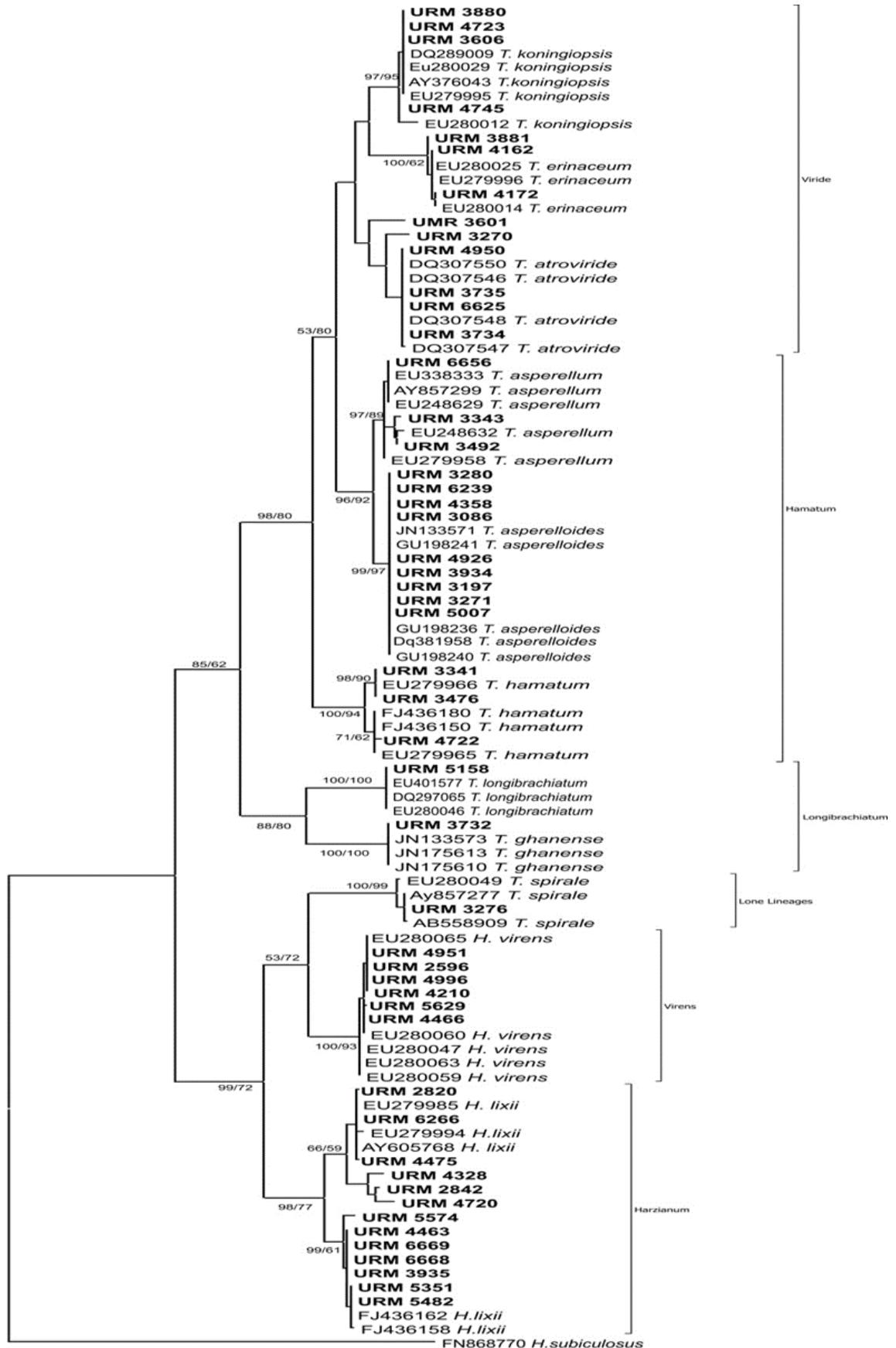


Figura 6 – Reconstrução filogenética de linhagens de *Trichoderma* da Micoteca URM a partir do alinhamento de nucleotídeos relativos à combinação dos fragmentos *tef1*. *Hyphomyces subiculosus* foi o grupo externo. Valores de bootstrap (em %) foram gerados a partir do método de Máxima Verossimilhança e do método de Máxima Parcimônia com as distâncias de Kimura 2-parâmetros (1000 bootstraps), respectivamente. Somente valores acima de 50% são apresentados.



## 4.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE CORANTE E EFLUENTE TÊXTIL

### 4.2.1 Descoloração de Indigo Carmine

Os fungos podem utilizar diferentes mecanismos para realizar a degradação completa de corantes e outros poluentes ambientais. A biossorção, biodegradação, bioacumulação e mineralização enzimática pela ação da lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase são processos pelos quais os fungos removem a cor dos efluentes (TRIPATHI et al., 2013).

Entre os 50 isolados de *Trichoderma* estudados, 18 apresentaram acima de 70% de descoloração do corante têxtil Índigo Carmine. Três isolados apresentaram valores maiores que 90% de descoloração, com destaque para *T. atroviride* (URM 3270, 3735 e 6625) que apresentaram, respectivamente, 96,86, 94,61 e 93,57 % de descoloração do corante testado (Tabela 5). Estes resultados corroboram os anteriores obtidos por Adnan et al. (2017) para um isolado de *T. atroviride*, isolada de casca de árvore em uma floresta da Malásia. Nesse caso, os autores obtiveram resultados semelhantes com 91,1% de descoloração para o corante Reactive Black 5. Além disso, eles avaliaram a biodegradação dos corantes antraquinônicos, Vermelho Alizarina S e Verde Quinizarina SS por *Trichoderma lixii* F21 e obtiveram 77,78 e 98,31% de descoloração, respectivamente.

Em contraste, *T. asperelloides* URM 3086, 3934 e 5007, *T. asperellum* URM 6656, *T. hamatum* URM 4722, *T. koningiopsis* URM 3606 e *T. virens* URM 4466 não descoloriram o corante Índigo Carmine (Tabela 5). Estes resultados ocorreram devido ao fato dos isolados pertencentes a estas espécies necessitarem de mais tempo para serem adaptadas ao ambiente poluído para poderem descolorir o efluente. Gajera et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes quando avaliaram a capacidade de descoloração de corantes por *T. viride* e *T. harzanium* isolados de rizosfera contaminada com um efluente têxtil industrial na Índia. Neste caso, isolados pertencentes a estas duas espécies necessitaram de um período superior a 12 dias para descolorir completamente corantes azo reativos, tais como Red HE7B, Violet Reactive 5, Black Red-B, Azul Escuro e Azul Claro H2GP HEG.

Tabela 5 – Percentual de descoloração (D%) do corante têxtil Índigo Carmine por espécies de *Trichoderma* da Micoteca URM

URM	Espécies	D%	URM	Espécies	D%
3280	<i>T. asperelloides</i>	73,22	4722	<i>T. hamatum</i>	0
6239	<i>T. asperelloides</i>	9,70	5574	<i>T. harzianum</i>	23,52
3086	<i>T. asperelloides</i>	0	4463	<i>T. harzianum</i>	82,88
3487	<i>T. asperelloides</i>	65,07	3935	<i>T. harzianum</i>	87,99
3271	<i>T. asperelloides</i>	32,27	5351	<i>T. harzianum</i>	3,36
3934	<i>T. asperelloides</i>	0	6668	<i>T. harzianum</i>	70,05
5007	<i>T. asperelloides</i>	0	2842	<i>T. harzianum</i>	74,64
4358	<i>T. asperelloides</i>	43,80	6669	<i>T. harzianum</i>	0,91
3343	<i>T. asperellum</i>	5,39	6266	<i>T. harzianum</i>	32,74
6656	<i>T. asperellum</i>	0	5482	<i>T. harzianum</i>	88,18
4926	<i>T. asperellum</i>	71,92	4328	<i>T. harzianum</i>	77,12
3197	<i>T. asperellum</i>	8,15	4720	<i>T. harzianum</i>	42,25
3734	<i>T. atroviride</i>	56,42	4475	<i>T. harzianum</i>	34,20
6625	<i>T. atroviride</i>	93,57	2820	<i>T. harzianum</i>	59,97
3735	<i>T. atroviride</i>	94,61	3606	<i>T. koningiopsis</i>	0
4950	<i>T. atroviride</i>	80,38	3880	<i>T. koningiopsis</i>	79,78
3270	<i>T. atroviride</i>	96,86	4723	<i>T. koningiopsis</i>	43,04
3601	<i>T. atroviride</i>	40,45	4745	<i>T. koningiopsis</i>	69,67
4162	<i>T. erinaceum</i>	54,04	5158	<i>T. longibrachiatum</i>	57,97
4172	<i>T. erinaceum</i>	32,52	4951	<i>T. virens</i>	65,36
3881	<i>T. erinaceum</i>	74,14	4466	<i>T. virens</i>	0
3732	<i>T. ghanense</i>	70,62	4210	<i>T. virens</i>	33,38
3341	<i>T. hamatum</i>	66,91	5629	<i>T. virens</i>	74,68
3476	<i>T. hamatum</i>	75,72	2596	<i>T. virens</i>	4,98
3492	<i>T. hamatum</i>	0,54	4996	<i>T. virens</i>	71,70

#### 4.2.2 Atividade das enzimas oxidativas

A avaliação da atividade das enzimas oxidativas (Lac, LiP e MnP) foi realizada pelos fungos selecionados que apresentaram percentuais acima de 70% de descoloração do corante têxtil Índigo Carmine. Após a análise foi possível observar que houve diferença entre as atividades de Lac, LiP, MnP, para a maioria dos isolados, com exceção de *T. atroviride* (URM 6625 e URM 4950) e *T. harzianum* (URM 6668 e URM 4328), e também na interação entre as médias das três enzimas estudadas, comprovando que a maioria dos isolados testados foram melhores produtores de LiP, quando em comparação com a atividade de Lac e MnP por estes fungos (Tabela 6).

Em estudo realizado por Adnan et al. (2015) a linhagem *T. atroviride* F03 não apresentou atividade de LiP e MnP, diferente dos resultados obtidos neste estudo no qual a melhor atividade de LiP foi obtida por *T. atroviride* URM 3735 que teve uma produção de 1307,0 U.L<sup>-1</sup>, seguido por *T. harzianum* URM 2842 com uma atividade de 924,0 U.L<sup>-1</sup> e por *T. virens* URM 4996 com uma atividade de 844,0 U.L<sup>-1</sup>. E para a atividade MnP, que a melhor média foi 875,3 U.L<sup>-1</sup>, obtida pelo isolado *T. erinaceum*

URM 3881, seguida por *T. atroviride* URM 4950 e 3735 com atividade de 680,0 U.L<sup>-1</sup> e 617,3 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 6 – Produção de enzimas oxidativas (U.L<sup>-1</sup>) por espécies de *Trichoderma* da Micoteca URM

URM	Especies	Lacase	Lignina peroxidase	Manganês peroxidase
3280	<i>T. asperelloides</i>	1,7 aC	760,0 cdA	379,3 defB
4926	<i>T. asperellum</i>	8,3 aC	517,3 fghA	366,0 defgB
6625	<i>T. atroviride</i>	1,3 aB	692,0 deA	90,7 jIB
3270	<i>T. atroviride</i>	2,0 aC	758,0 cdA	394,0 defB
3735	<i>T. atroviride</i>	8,3 aC	1307,0 aA	617,3 bcB
4950	<i>T. atroviride</i>	2,3 aB	750,0 cdA	680,0 bA
3881	<i>T. erinaceum</i>	10,0 aC	378,7 iB	875,3 aA
3732	<i>T. ghanense</i>	1,7 aC	766,3 cdA	298,0 fghB
3476	<i>T. hamatum</i>	1,0 aC	593,3 efgA	92,7 jIB
2842	<i>T. harzianum</i>	2,3 aC	924,0 bA	176,0 hijB
3935	<i>T. harzianum</i>	1,3 aC	480,0 ghiA	143,3 ijB
4463	<i>T. harzianum</i>	1,7 aC	758,7 cdA	232,0 ghiB
6668	<i>T. harzianum</i>	3,0 aB	440,0 hiA	0,0 IB
4328	<i>T. harzianum</i>	2,7 aB	378,0 iA	442,7 deA
5482	<i>T. harzianum</i>	2,7 aC	631,3 defA	369,3 defB
3880	<i>T. koningiopsis</i>	7,7 aC	645,3 defA	146,0 ijB
4996	<i>T. virens</i>	15,7 aC	844,0 bcA	329,3 efgB
5629	<i>T. virens</i>	1,7 aC	612,7 efgA	500,0 cdB

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúscula (vertical) e maiúscula (horizontal), não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliando a atividade de Lac, foi possível observar que não houve diferença significativa entre as médias de atividade de Lac pelas espécies de *Trichoderma*, porém, o isolado *T. virens* URM 4996 apresentou uma produção de 15,7 U.L<sup>-1</sup> de Lac, média numericamente maior que as demais apresentadas (Tabela 6). Adnan et al. (2015) em estudo da produção das enzimas oxidativas por *T. atroviride* F03, observaram que este isolado produziu 0,0058 U.L<sup>-1</sup> de lacase após 4 dias de experimento, e que esta produção estava diretamente relacionada a biodegradação do corante têxtil Preto Reativo 5. No entanto, resultados mais significativos foram obtidos por Adnan et al. (2017), com a produção de lacase por *T. lixii* atingindo o máximo de 83,12 U.L<sup>-1</sup> no 4º dia incubação. No presente estudo foram analisadas a atividade de Lac de quatro isolados de *T. atroviride* (URM 3270, 3735, 4950 e 3881), após 8 dias de experimento, e estas apresentaram as atividades de 1,3, 2,0, 8,3 e 2,3 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os isolados URM 4926, 3735, 4950, 3881, 2842 e 4996 que apresentaram os melhores resultados para uma ou mais enzimas ligninolíticas, foram selecionados

para a etapa de avaliação da degradação do efluente têxtil proveniente de uma lavanderia de jeans no município de Toritama-PE, Brasil (Figura 7).

#### 4.2.3 Tratamento do efluente têxtil

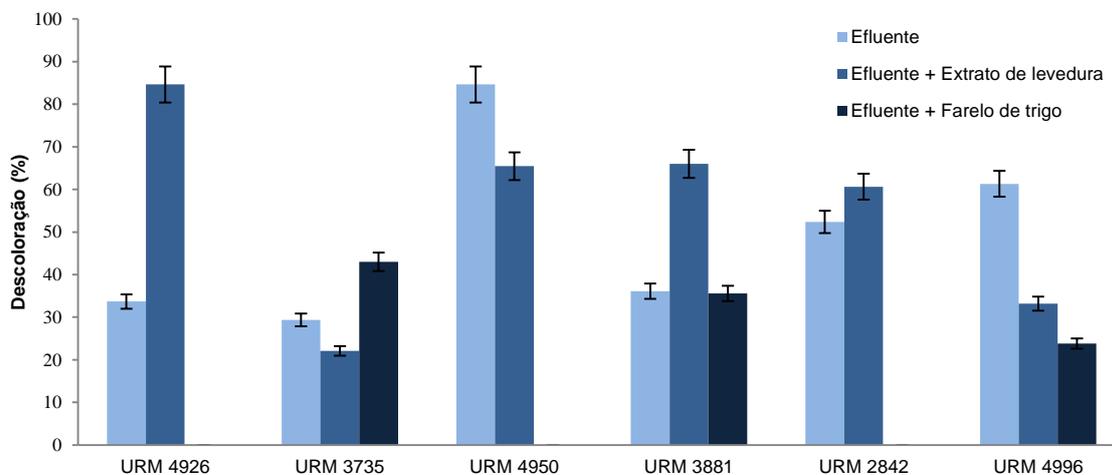
As seis estirpes de *Trichoderma* acima mencionadas, que foram as melhores produtoras enzimáticas, foram selecionadas para descolorir o efluente têxtil, caracterizado por uma elevada carga orgânica, uma vez que os parâmetros DQO e BOD são superiores ao normal aceito para eliminação de águas residuárias (DQO <250 mg.L<sup>-1</sup> e DBO <30 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 1).

De acordo com os resultados obtidos, *T. atroviride* URM 4950 apresentou o melhor desempenho na descoloração de a) efluente têxtil (84,6%) e b) efluente têxtil suplementado com extrato de levedura (65,4%) (Figura 7). Além disso, *T. asperellum* URM 4926 apresentou um bom desempenho (84,6%) na descoloração quando foi utilizado efluente têxtil suplementado com farelo de trigo.

Quando o efluente foi suplementado com farelo de trigo, a taxa de descoloração foi maior para os isolados *T. atroviride* URM 3735 (43,0%), *T. erinaceum* URM 3881 (35,6%) e *T. virens* URM 4996 (23,8%), respectivamente (Figura 7).

De acordo com Saravanakumar e Kathiresan (2014), observou-se uma grande taxa de descoloração (89%) de corante Malachite Green após 10 dias de incubação de *T. harzianum* TSK8 (JQ809340), quando este isolado foi cultivado em meio suplementado com 5,8 mg.L<sup>-1</sup> de extracto de levedura. Adnan et al. (2015) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na descoloração do corante têxtil Reactive Black 5 por *T. atroviride*, e os autores observaram que o extrato de levedura foi uma boa fonte de nitrogênio para o crescimento de *T. atroviride* e para estimulá-lo a descolorir até 91,1% do corante Reactive Black 5. Além disso, os autores avaliaram a descoloração do corante usando nitrato de amônio e cloreto de amônio e, em contraste, observaram apenas uma taxa de descoloração de 29,1% e 71,7%, respectivamente.

Figura 7 – Descoloração (%) do efluente têxtil de lavanderias de jeans por espécies de *Trichoderma* da Micoteca URM



#### 4.2.3.1 Otimização da descoloração do efluente têxtil usando delineamento experimental

Ao término do ensaio com efluente têxtil foram selecionadas duas linhagens promissoras, uma na descoloração *T. atroviride* URM 4950 e a outra na produção de enzimas oxidativas, que foi *T. atroviride* URM 3735. O delineamento experimental foi usado para avaliar os principais efeitos e interações dos três fatores escolhidos (temperatura, concentração de extrato de levedura e pH) agindo sobre o fator de resposta, o percentual de descoloração do efluente têxtil.

Após a conclusão do delineamento experimental, verificou-se que, entre os 26 experimentos, apenas três apresentaram acima de 70% de descoloração no final do oitavo dia de experimento, um deles pertencendo a *T. atroviride* URM 4950 (ensaio 6 - 71,36%) e dois pertencendo a *T. atroviride* URM 3735 (ensaios 18 e 19 - 73,52 e 72,29%), sendo as melhores condições para atingir o nível máximo de descoloração do efluente têxtil por estas espécies, temperaturas 25 e 35°C, concentração do extrato de levedura 0,5 g.L<sup>-1</sup> e o pH 7 (Tabela 7).

Miranda et al. (2012) em estudo da otimização dos parâmetros (pH, concentração de extrato de levedura, a agitação e a concentração de sulfato de cobre), para tratamento biológico (por fungos) de efluente têxtil de lavanderia em Caruaru – Pernambuco, observaram que entre os 27 experimentos realizados 19 apresentaram 99% de descoloração do efluente têxtil no décimo dia de experimento.

Murugesan et al. (2007) otimizando a descoloração de azocorante Preto Reativo 5 por lacase produzida pelo fungo de podridão branca *Pleurotus sajor-caju*, utilizando a metodologia de superfície resposta, constataram que a concentração ótima do corante, da enzima e do HBT (1-hydroxybenzotriazole) e o melhor tempo para descolorir o corante foram, 62,5 mg.L<sup>-1</sup>, 2,5 U.mL<sup>-1</sup>, 1,5 mM e 36 h, respectivamente.

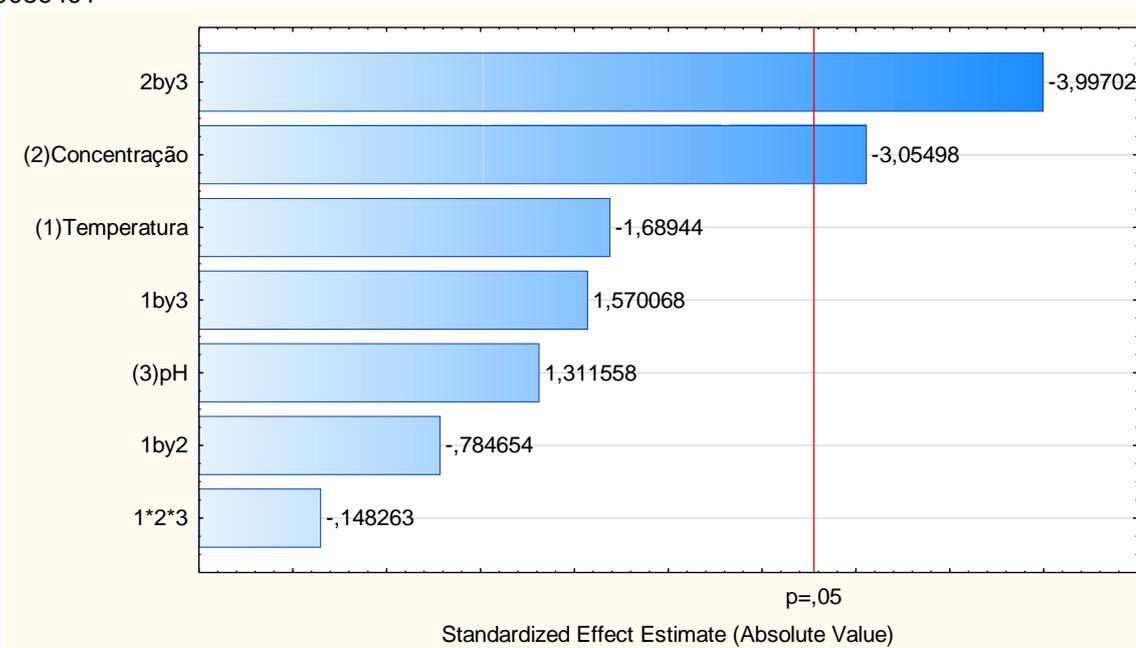
Tabela 7 – Delineamento experimental e de resposta para descoloração do efluente têxtil por *Trichoderma atroviride* URM 4950 e URM 3735

Número de depósito	Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Resposta Descoloração (%)
		A: Temperatura (°C)	B: Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	C: pH	
URM4950	1	25	0,5	5	42,40
URM4950	2	35	0,5	5	25,15
URM4950	3	25	1,5	5	52,78
URM4950	4	35	1,5	5	27,16
URM4950	5	25	0,5	7	66,01
URM4950	6	35	0,5	7	71,36
URM4950	7	25	1,5	7	25,77
URM4950	8	35	1,5	7	18,85
URM4950	9	30	1,0	6	15,63
URM4950	10	30	1,0	6	31,57
URM4950	11	30	1,0	6	19,18
URM4950	12	30	1,0	6	38,39
URM4950	13	30	1,0	6	29,26
URM3735	14	25	0,5	5	49,61
URM3735	15	35	0,5	5	41,75
URM3735	16	25	1,5	5	56,42
URM3735	17	35	1,5	5	35,14
URM3735	18	25	0,5	7	73,52
URM3735	19	35	0,5	7	72,29
URM3735	20	25	1,5	7	34,90
URM3735	21	35	1,5	7	26,85
URM3735	22	30	1,0	6	28,48
URM3735	23	30	1,0	6	31,11
URM3735	24	30	1,0	6	33,90
URM3735	25	30	1,0	6	12,22
URM3735	26	30	1,0	6	33,59

O diagrama de Pareto mostra os valores absolutos do efeito dos fatores que são importantes na realização do experimento (Figura 12 e 13). Nos ensaios com *T. atroviride* URM 4950 e URM 3735, a concentração do extrato de levedura e a combinação da concentração do extrato de levedura e pH foram os fatores mais influentes para a remoção da cor do efluente têxtil, todos com efeito negativo (Figura 8 e 9). Bonugli-Santos et al. (2016) em estudo do potencial biotecnológico do fungo derivado do mar *Peniophora* sp. CBMAI 1063 investigaram a influencia de 12 fatores independentes na descoloração e degradação do Preto Reativo 5 utilizando

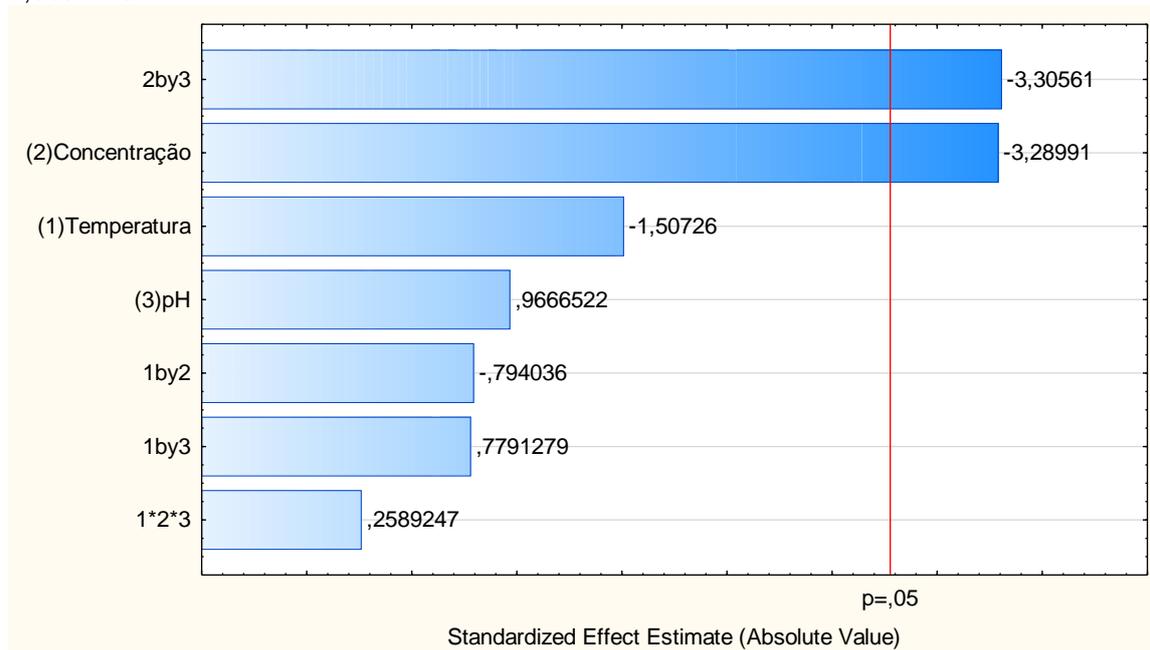
delineamento experimental e observaram que com base na análise estatística, os fatores com maior impacto foram a peptona, extrato de levedura, concentração de corante, e de  $\text{CuSO}_4$ , todos com efeito negativo.

Figura 8 – Diagrama de Pareto no processo de descoloração do efluente têxtil pelo fungo *Trichoderma atroviride* URM 4950; (1) temperatura, (2) Concentração de extrato de levedura e (3) pH; MS Pure Error =,0086491



Embora exercendo um efeito negativo sobre o processo de descoloração, o fator temperatura não apresenta significância estatística relevante, o que sugere que *T. atroviride* URM 4950 e URM 3735 podem ser testados em uma temperatura mais baixa sem influenciar negativamente descoloração (Figura 8 e 9). Miranda et al. (2012) analisaram em diagrama de Pareto a descoloração do efluente têxtil por *P. chrysosporum* CCT 1999 e constataram que os quatro fatores estudados (pH, concentração do extrato de levedura, a agitação e a concentração de sulfato de cobre) influenciaram significativamente na remoção da cor do efluente têxtil.

Figura 9 – Diagrama de Pareto no processo de descoloração do efluente têxtil pelo *fungo Trichoderma atroviride* URM 3735; (1) temperatura, (2) Concentração de extrato de levedura e (3) pH; MS Pure Error =,0081218



A aplicação de técnicas estatísticas de delineamento experimental no processo de descoloração pode resultar em melhor remoção, menor variabilidade, além da redução de tempo e de custos no desenvolvimento do processo (SRINIVASAN; MURTHY, 2009).

## 5 CONCLUSÕES

A utilização de ferramentas moleculares e morfofisiológicas para a identificação de espécies de *Trichoderma* são importantes para a diferenciação das espécies. As linhagens de *Trichoderma* preservadas na Micoteca URM foram re-identificadas e serão disponibilizadas no catálogo eletrônico da coleção de cultura, para serem mais exploradas do ponto de vista biotecnológico.

No caso específico de descoloração de corantes em efluentes têxteis, o delineamento estatístico foi utilizado para otimizar a descoloração do efluente por *T. atroviride* URM 4950 e URM 3735, resultando numa excelente taxa de descoloração do efluente a 25 e 35 °C, com concentração de extrato de levedura, 0,5 g.L<sup>-1</sup> e pH 7,0.

*Trichoderma atroviride* URM 4950 e URM 3735 podem ser consideradas em um processo de expansão a nível industrial. Além disso, estes isolados também são indicados para serem utilizados para futuros estudos relacionados com o tratamento de efluentes têxteis industriais e biorremediação de ambientes contaminados com corantes.

Desta forma, a capacidade das espécies de *Trichoderma*, depositadas na Micoteca URM, na descoloração do corante têxtil presente no efluente têxtil e a produção das enzimas oxidativas Lac LiP e MnP foram demonstradas com sucesso.

## REFERÊNCIAS

- ADNAN, L. A.; SATHISHKUMAR, B. P.; YUSOFF, A. R. M.; HADIBARATA, T. Metabolites characterisation of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.104, p. 274-282, 2015.
- ADNAN, L. A.; SATHISHKUMAR, P.; YUSOFF, A. R. M.; HADIBARATA, T.; AMEEN, F. Rapid bioremediation of Alizarin Red S and Quinizarine Green SS dyes using *Trichoderma lixii* F21 mediated by biosorption and enzymatic processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.40, p. 85-97, 2017.
- ANDREOLLI, M.; LAMPIS, S.; BRIGNOLI, P.; VALLINI, G. *Trichoderma longibrachiatum* Evx1 is a fungal biocatalyst suitable for the remediation of soils contaminated with diesel fuel and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 9134-9143, 2016.
- AFOLABI, O. O.; FAGADE, O. E.; OGUNJOBI, A. A. Enzymatic activity of some fungal isolates from decaying bamboo leaves. **Acta SATECH**, v. 3, p. 108-112, 2010.
- ALJEBOREE, A. M.; ALSHIRIFI, A. N.; ALKAIM, A. F. Kinetics and equilibrium study for the adsorption of textile dyes on coconut shell activated carbon. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.020>.
- ATANASOVA, L.; DRUZHININA, I. S.; JAKLITSCH, W. M. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. In: MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; SINGH, U. S.; MUKHERJEE, M.; SCHMOLL, M. (eds.). **Trichoderma: Biology and Applications**. Boston: CABI, 2013. p. 10-42.
- ANJANEYULU, Y.; CHARY, N. S.; RAJ, D. S. S. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 4, p. 245-273, 2005.
- ARFARITA, N.; IMAI, T.; KANNO, A.; YARIMIZU, T.; XIAOFENG, S.; JIE, W.; HIGUCHI, T.; AKADA, R. The potential use of *Trichoderma viride* strain FRP3 in biodegradation of the herbicide glyphosate. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, p. 3518-3521, 2014.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 602-605, 2001.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- BABU, A. G.; SHEA, P. J.; OH, B. T. *Trichoderma* sp. PDR1-7 promotes *Pinus sylvestris* reforestation of lead-contaminated mine tailing sites. **Science of the Total Environment**, v. 476-477, p. 561-567, 2014.

BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Biological decolourization of C.I. Direct Black 38 by *E. gallinarum*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, p. 187-193, 2008.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 30, p. 215-242, 2006.

BARRETO, W. J.; BERNARDINO, N. D.; AFONSO, R.; DOI, S. M. O. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: um estudo cinético. **Química Nova**, v. 34, p. 568-572, 2011.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 924-931, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 2357-2372, 1991a.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2373-2417, 1991b.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2418-2420, 1991c.

BISSETT, J. Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor-1 $\alpha$  gene (eEF1a1). **ISTH**, Vienna, 2009. Disponível em: <<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>>. Acesso em: 22 abril 2014.

BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v. 6, p. 263-295, 2015.

BLODIG, W.; SMITH, A. T.; DOYLE, W. A.; PIONTEK, K. Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, p. 851-61, 2001.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; VIEIRA, G. A. L.; COLLINS, C.; FERNANDES, T. C. C.; MORALES, M. A. M.; 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, p. 8659-8668, 2016.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 10 junho 2014.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-10, 2010.

CAMPOS, A. T.; DAGA, J.; RODRIGUES, E. E.; FRANZENER, G.; SUGUIY, M. M. T.; SYPPERRECK, V. L. G. Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. **Engenharia Agrícola**, v. 26, p. 235-242, 2006.

CANALES, M.; LOBOS, S.; RAFAEL, V. Molecular modeling of manganese peroxidase from the lignin-degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* and structural comparison with other peroxidases. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 96-102, 1998.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553-556, 1999.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CHAKROUN, H.; MECHICHI, T.; MARTINEZ, M. J.; DHOUIB, A.; SAYADI, S. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 507-513, 2010.

CHANDA, A.; GUMMADIDALA, P. M.; GOMAA, O. M. Mycoremediation with mycotoxin producers: a critical perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 17-29, 2016.

CHAPARRO, D. F.; ROSAS, D. C.; VARELA, A. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 238-243, 2009.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. **Studies in Mycology**, v. 48, p. 1-116, 2003.

CHAVERRI, P.; CANDOUSSAU, F.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea phyllostachydis* and its *Trichoderma* anamorph, a new bambusicolous species from France. **Mycological Progress**, v. 3, p. 29-36, 2004.

CHHABRA, M.; MISHRA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Combination of chemical and enzymatic treatment for efficient decolorization/degradation of textile: High operational stability of the continuous process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p.17-24, 2015.

CHEN, K.; ZHUANG, W. Y. *Trichoderma shennongjianum* and *Trichoderma tibetense*, two new soil-inhabiting species in the Strictipile clade. **Mycoscience**, v. 57, p. 311-319, 2016.

CONESA, A.; JEENES, D.; ARCHER, D. B.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; Punt, P. J. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 846-851, 2002.

CORDI, L.; MINUSSI, R. C.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1255-1259, 2007.

DASGUPTA, J.; SIKDER, J.; CHAKRABORTY, S.; CURCIO, S.; DRIOLI, E. Remediation of textile effluents by membrane based treatment techniques: A state of the art review. **Journal of Environmental Management**, v. 147, p. 55-72, 2015.

DE SOUZA, C. G.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by White-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal Basic Microbiology**, v. 43, p. 2277-2282, 2003.

DEGENKOLB, T.; DIECKMANN, R.; NIELSEN, K. F.; GRÄFENHAN, T.; THEIS, C.; ZAFARI, D.; CHAVERRI, P.; ISMAIEL, A.; BRÜCKNER, H.; VON DÖHREN, H.; THRANE, U.; PETRINI, O.; SAMUELS, G. J. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. **Mycological Progress**, v. 7, p. 177-219, 2008.

DEVECI, E. U.; DIZGEB, N.; YATMAZC, H. C.; AYTEPED, Y. Integrated process of fungal membrane bioreactor and photocatalytic membrane reactor for the treatment of industrial textile wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 420-427, 2016.

DHOUIB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; HMIDI, R.; LABAT, M.; MARTINEZ, M. J.; SAYADI, S. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1415-1423, 2005.

DIVYA, L. M.; PRASANTH, G. K.; SADASIVAN, C. Potential of the salt-tolerant laccase-producing strain *Trichoderma viride* Pers. NFCCI-2745 from an estuary in the bioremediation of phenol-polluted environments. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 542-547, 2014.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KOMON, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 813-828, 2005.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6, p.100-112, 2005.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first one hundred of *Trichoderma* species is characterised by molecular data. **Mycoscience**, v. 47, p. 55-64, 2006.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews – Microbiology*, v.16, p. 749-759, 2011.

DRUZHININA, I. S.; KOMOŃ-ZELAZOWSKA, M.; ISMAIEL, A.; JAKLITSCH, W.; MULLAW, T.; SAMUELS, G. J.; KUBICEK, C. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 358-368, 2012.

D'SOUZA-TICLO, D.; GARG, S.; RAGHUKUMAR, C. Effects and interactions of medium components on laccase from a marine-derived fungus using response surface methodology. **Marine Drugs**, v. 7, p. 672-688, 2009.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, v. 30, p. 953-971, 2004.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, p. 504-511, 2000.

GAJERA, H. P.; BAMBHAROLIA, R. P.; HIRPARA, D. G.; PATEL, S. V.; GOLAKIYA, B. A. Molecular identification and characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decolorization and biodegradation of textile dye effluents. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 98, p.406-416, 2015.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (eds.). ***Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics***. London: Taylor & Francis, 2002. p. 3-3.

GEISER, D. M.; JIMENEZ-GASCO, M. D.; KANG, S. C.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 473-479, 2004.

GHALY, A. E.; ANANTHASHANKAR, R.; ALHATTAB, M.; RAMAKRISHNAN, V. V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Chemical Engineering & Process Technology**, v. 5, p. 1-19, 2014.

GHORBANI, F.; KARIMIA, M.; BIRIA, D.; KARIMINIAB, A. JEIHANIPOURA, H. R. Enhancement of fungal delignification of rice straw by *Trichoderma viride* sp. to improve its saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 77-84, 2015.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, J. M. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: BURNS, R. G., DICK, R. P. (eds.). **Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 495-538.

GOCHEV, V. K.; KRASTANOV, A. I. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 171-176, 2007.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5488-5491, 2000.

GUPTA, V. K.; KHAMPARIA, S.; TYAGI, I.; JASPAL, D.; MALVIYA, A. Decolorization of mixture of dyes: A critical review. **Global Journal of Environmental Science and Management**, v. 1, p. 71-94, 2015.

GUZMÁN-VALLE, P.; BRAVO-LUNA, L.; MONTES-BELMONT, R.; GUIGÓN-LÓPEZ, C.; SEPÚLVEDA JIMÉNEZ, G. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 223-229, 2014.

HARMAN, G.; HOWELL, C.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HASAN, S. H.; RANJAN, D.; TALAT, M. Agro-industrial waste 'wheat bran' for the biosorptive remediation of selenium through continuous up-flow fixed-bed column. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 1134-1142, 2010.

HATVANI, N.; KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MÉCS, I. Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 415-423, 2002.

HO, C. H.; CHEN, L.; HO, Y. P.; YANG, C. L. Oxidative decomposition of reactive blue c.i. 19 with sodium hypochlorite. **Environmental engineering science**, v. 27, p.103-109, 2010.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HÖLKER, U.; LUDWIG, S.; SCHEEL, T.; HÖFER, M. Mechanisms of coal solubilization by the deuteromycetes *Trichoderma atroviride* and *Fusarium oxysporum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 57-59, 1999.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 615-631, 2009.

HOYOS-CARVAJAL, L., BISSETT, J. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (eds.) **The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution**. Rijeka: InTech, 2011. p. 303-320.

INGLE, M. R.; MISHRA, R. L. Production of Laccase Enzyme By *Trichoderma erinaceum*. **Indian Journal of Applied Research**, v. 6, p. 141-144, 2016.

INTERNATIONAL SUBCOMMISSION ON *TRICHODERMA* AND *HYPOCREA* TAXONOMY. **Hypocrea/Trichoderma diversity. List of known species described by 2006**. Disponível em: <<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>>. Acesso em: 19 março 2014.

IQBAL, H.; KAPOOR, A. Culture Conditions for the Production of Tannase from *Trichoderma harzianum* MTCC 10841. **International Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 584-595, 2012.

JAKLITSCH, W.M. European species of *Hypocrea* part I the green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p.1-91, 2009.

JAKLITSCH, W.M. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. **Fungal Diversity**, v. 48, p. 1-250, 2011.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. New combinations in *Trichoderma* (Hypocreaceae, Hypocreales). **Mycotaxon**, v. 126, p.143-156, 2013.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in Mycology**, v. 80, p.1-87, 2015.

JANUSZ, G.; KUCHARZYKB, K. H.; PAWLIKA, A.; STASZCZAKA, M.; PASZCZYNSKIC, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p.1-12, 2013.

KANAYAMA, N.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 405-410, 2002.

KAMALA, T.; DEVI, S. I.; THINGNAM, G.; SOMKUWAR, G. B. Genetic diversity and species pattern of *Trichoderma* and *Hypocrea* in Manipur using insilico analysis. **Bioinformation**, v. 9, p. 106-111, 2013.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R. E.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quimica Nova**, v. 28, p. 629-632, 2005.

KANT, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. **Natural Science**, v. 4, p. 22-26, 2012.

KARIM, E.; DHAR, K.; HOSSAIN, T. Co-metabolic decolorization of a textile reactive dye by *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, p.177-186, 2017.

KESWANI, C.; MISHRA, S.; SARMA, B. K.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 533-544, 2014.

KHAMBHATYA, Y.; ANANTHA, S.; SREERAMB, K. J.; RAOB, J. R.; NAIR, B. U. Dual utility of a novel, copper enhanced laccase from *Trichoderma aureoviridae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 69-75, 2015.

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.

KIM, C. S.; SHIROUZU, T.; NAKAGIRI, A.; SOTOME, K.; MAEKAWA, N. *Trichoderma eijii* and *Trichoderma pseudolacteum*, two new species from Japan. **Mycological Progress**, v. 12, p. 739-753, 2013.

KUDANGA, T.; NYANHONGOB, G. S.; GUEBITZB, G. M.; BURTONA, S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p.195-208, 2011.

KULLNIG-GRADINGER, C. M.; SZAKÁCS, G.; KUBICEK, C. P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v. 106, p. 757-767, 2002.

KUMAR, M.R., KUMARAN, M.D.B., BALASHANMUGAM, P., REBECCA, A.I.N., KUMAR, D.J.M., KALAICHELVAN, P.T. Production of cellulose enzyme by *Trichoderma reesei* Cef19 and its application on the production of bio-ethanol. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 735-739, 2014.

KUMAR, S. *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. **The International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, v. 1, p.106-121, 2013.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quimica Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

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**, v. 307, p.1026-1036, 2017.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.169, p. 247-250, 1984.

LARRALDE-CORONA, C. P.; SANTIAGO-MENA, M. R.; SIFUENTES-RINCÓN, A. M.; RODRÍGUEZ-LUNA, I. C.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A.; SHIRAI, K.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 167-177, 2008.

Li, Q. R.; Tan, P.; Jiang, Y. L.; Hyde, K. D.; Mckenzie, E. H. C.; Bahkali, A. H.; Kang, J. C.; Wang, Y. A novel *Trichoderma* species isolated from soil in Guizhou, *T. guizhouense*. **Mycological Progress**, v.12, p.167-172, 2013.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J.; NIRENBERG, H. I.; PETRINI, O. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2418-2428, 1999.

LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDÃO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; JÚNIOR, M. L.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 116, p. 815-824, 2012.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A.; ATANASOVA, L.; FRANCO-MOLANO, A. E.; GAMS, W.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; THEELEN, B.; MÜLLER, W. H.; BOEKHOUT, T.; DRUZHININA, I. DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.104, p. 657-674, 2013.

MAJI, D.; SINGH, M.; WASNIK, K.; CHANOTIYA, C. S.; KALRA, A. The role of a novel fungal strain *Trichoderma atroviride* RVF3 in improving humic acid content in mature compost and vermicompost via ligninolytic and celluloxylanolytic activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, 1584-1596, 2015.

MANSUR, M.; ARIAS, M. E.; COPA-PATIÑO, J. L.; FLÄRDH, M.; GONZÁLEZ, A. E. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**, v. 95, p.1013-1020, 2003.

MARTINEZ, M. J.; RUIZ-DUENAS, F. J.; CUILLEN, F.; MARTINEZ, A. T. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, p. 424-432, 1996.

MATA, G.; HERNÁNDEZ, D. M. M.; ANDREU, L. G. I. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p.143-150, 2005.

MCNEILL, J.; BARRIE, F. R.; BUCK, W. R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D. L.; HERENDEEN, P. S.; KNAPP, S.; MARHOLD, K.; PRADO, J.; PRUD'HOMME VAN REINE, W. F.; SMITH, G. E.; WIERSEMA, J. H.; TURLAND, N. J. **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. Regnum Vegetabile 154, Koeltz Scientific Books, Königstein, 2012. Disponível em: <<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>>. Acesso em: 17 abril 2014.

MIAO, L.; ZHANG, G.; WANG, H.; NG, T. Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1069-1076, 2010.

MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; GOUVEIA, E. R.; MACHADO, K. M. G.; GUSMAO, N. B. Decolorization of laundry effluent by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 4216-4224, 2012.

MIRANDA, R. C.; GOMES, E. B.; PEREIRA, N. J.; MARIN-MORALES, M. A.; MACHADO, K. M.; GUSMÃO, N. B. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia luneta* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 361-367, 2013.

MOHANA, S.; SHRIVASTAVA, S.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 562-569, 2008.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, p. 35-45, 2012.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SCHMOLL, M.; KENERLEY, C. M. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 105-29, 2013.

MURUGESAN, K.; DHAMIJA, A.; NAM, I.; KIM, Y.; CHANG, Y. Decolourization of reactive black 5 by laccase: Optimization by response surface methodology. **Dyes and Pigments**, v. 75, p.176-184, 2007.

NAWAZ, M. S.; AHSAN, M. Comparison of physico-chemical, advanced oxidation and biological techniques for the textile wastewater treatment. **Alexandria Engineering Journal**, v. 53, p. 717-722, 2014.

NEETHU, K.; RUBEENA, M.; SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; PRIJI, P.; UNNI, K. N.; JOSH, M. K. S.; JISHA, V. N.; PRADEEP, S.; BENJAMIN, S. A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p.1160-1166, 2012.

NICOLÁS, C.; HERMOSA, R.; RUBIO, B.; MUKHERJEE, P. K.; MONTEB, E. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. **Plant Science**, v. 228, p. 71-78, 2014.

OLIVEIRA, L. H. S.; BARRETO, B.; VITALLI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, v. 33, p. 85-99, 2010.

OLIVEIRA, M. M. E.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; LIMA, N.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, p. 102-110, 2015.

PANG, Y. L.; ABDULLAH, A. Z. Current status of textile industry wastewater management and research progress in Malaysia: A Review. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 41, p. 751-764, 2013.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajorcaju*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 10166-10177, 2011.

PEREIRA, A. R. B.; BUENO, F. L.; SANTOS, S. C.; LIMA, C. A. A.; DIAS, A. L. T. Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. **Holos Environment**, v. 10, p. 165-179, 2010.

PEROVANO FILHO, N.; SILVA, K. F. S., LÓPEZ, A. M.Q. Ação de micoflora de efluentes agroindustriais sobre diferentes corantes e substratos lignocelulósicos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá**, v. 33, n. 4, p. 427-435, 2011.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUTC30 – thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, p. 58-68, 2012.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 37663-37669, 2002.

PRAVEEN, K.; VISWANATH, B.; USHA, K. Y.; PALLAVI, H.; REDDY, G. V. S.; NAVEEN, M.; REDDY, B. R. Lignolytic Enzymes of a Mushroom *Stereum ostrea* Isolated from Wood Logs. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; BRANDÃO, R. S.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, p.1461-1468, 2013.

REBAH, F.B.; MILED, N. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. **3 Biotech**, v. 3, p. 255-265, 2013.

REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 89-123, 2008.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUES, P.; SANTOS, C.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Species identification of *Aspergillus* section Flavi isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including

MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 877-892, 2011.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1733-1741, 2009.

SALAS, C. F. S.; JOSHI, A. Y.; DHIMAN, N.; BANERJEE, R.; HUSKINS, W. C.; WENGENACK, N. L.; HENRY, N. K. Fatal post-operative *Trichoderma longibrachiatum* mediastinitis and peritonitis in a pediatric patient with complex congenital cardiac disease on peritoneal dialysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p.1869-1871, 2011.

SALGADO, B. C. B.; NOGUEIRA, M. I. C.; RODRIGUES, K. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; BUARQUE, H. L. B., ARAÚJO, R. S. Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 1-8, 2009.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 100, p. 923-935, 1996.

SAMUELS, G. J.; PETRINI, O.; KUHL, K.; LIECKFELDT, E.; KUBICEK, C. P. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. **Studies in Mycology**, v. 41, p. 1-54, 1998.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, p. 146-170, 2002.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. **Phytopathology**, v. 96, p. 195-206, 2006.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 67-133, 2006.

SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; MULAW, T. B.; SZAKACS, G.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P.; JAKLITSCH, W. M. The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. **Fungal Diversity**, v. 55, p. 77-108, 2012.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA**. 2014. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/T.Index.cfm>>. Acesso em: 20 março 2014.

SANTOS, P. K.; FERNANDES, K. C.; FARIA, L. A.; FREITAS, A. C.; SILVA, L. M. Descoloração e degradação do azo corante vermelho grlx-220 por ozonização. **Química Nova**, v. 34, p.1315-1322, 2011.

SARAVANAKUMAR, K.; KATHIRESAN, K. Bioremoval of the synthetic dye malachite green by marine *Trichoderma* sp. **SpringerPlus**, v. 3, p. 1-12, 2014.

SARAYU, K.; SANDHYA, S. Current technologies for biological treatment of textile wastewater - a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 645-661, 2012.

SATHISHKUMAR, P.; ARULKUMARB, M.; PALVANNANB, T. Utilization of agro-industrial waste *Jatropha curcas* pods as an activated carbon for the adsorption of reactive dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR). **Journal of Cleaner Production**, v. 22, p. 67-75, 2012.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

SHANMUGAMA, S.; ULAGANATHANB, P.; SIVASUBRAMANIANA, S.; ESAKKIMUTHUA, S.; KRISHNASWAMYA, S.; SUBRAMANIAMA, S. *Trichoderma asperellum* laccase mediated crystal violet degradation— Optimization of experimental conditions and characterization. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 222-231, 2017.

SHRADDHA, S.; SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat – Statistical Assistance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE. 7., 2009, Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, Reno, 2009.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section Flavi strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 2119-2129, 2015.

SILVA, M. C.; CORREA, A. D.; TORRES, J. A., AMORIM, M. T. S. P. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S. A. (eds.). **Computer Methods in Molecular Biology. Bioinformatics Methods and Protocols**. Totowa: Humana Press Inc, 1998. p.115-130.

SOWMYA, H. V.; RAMALINGAPPA, KRISHNAPPA, M.; THIPPESWAMY, B. Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.186, p. 6577-6586, 2014.

SRINIVASAN, S.V.; MURTHY, D.V.S. Statistical optimization for decolorization of textile dyes using *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, p. 909-914, 2009.

SUN, S.; LI, X.; RUAN, L.; ZHANG, L.; HU, K. A novel breeding strategy for new strains of *Hypsizygus marmoreus* and *Grifola frondosa* based on ligninolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2005-2013, 2014.

SUZUKI, R. M.; ANDRADE, A. D.; SOUSA, J. C.; ROLLEMBERG, M. C. Preparation and characterization of activated carbon from rice bran. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1985-1991, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, L.; HE, M.; SONG, L.; FU, X.; SHI, S. Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 287-294, 2016.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. 2006. 190f. Tese (Pós-Graduação Engenharia Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.

TEGLI, S.; CERBONESCHI, M.; CORSI, M.; BONNANNI, M.; BIANCHINI, R. Water recycle as a must: decolorization of textile wastewaters by plant-associated fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p.120-132, 2014.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

TRIPATHI, P.; SINGH, P. C.; MISHRA, A.; CHAUHAN, P. S.; DWIVEDI, S.; BAIS, R. T.; TRIPATHI, R. D. *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean-up. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 15, p. 541-550, 2013.

VASQUES, A. R.; SOUZA, S. M. A. G. U.; WEISSENBERG, L.; SOUZA, A. A. U.; VALLE, J. A. B. Adsorção dos corantes RO16, RR2 e RR141 utilizando lodo residual da indústria têxtil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, p. 245-252, 2011.

VERMA, A. K.; DASH, R. R.; BHUNIA, P. A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. **Journal of Environmental Management**, v. 93, p.154-168, 2012.

VILLEN, R. A. Tratamento Biológico de Efluentes. In: LIMA, U. A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (cords.). **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 513-546.

WARIISHI, H.; VALLIS, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 23689-23695, 1992.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, Inc., 1990. p. 315-322.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 157, p. 174-209, 2009.

XUAN, Q. C.; HUANG, R.; MIAO, C. P.; CHEN, Y. W.; ZHAI, Y. Z.; SONG, F.; WANG, T.; WU, S. H. Secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma* sp. YM 311505 of *Azadirachta indica*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, p.139-141, 2014.

YU, Z. F.; QIAO, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, K. Q. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, p.101-108, 2007.

ZAFRA, G.; CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p.19426-19433, 2015.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. **BioControl**, v. 59, p. 319-331, 2014.

## APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO



International Journal of  
*Environmental Research  
and Public Health*



Article

## Requalification of a Brazilian *Trichoderma* Collection and Screening of Its Capability to Decolourise Real Textile Effluent

Dianny Silva Lisboa <sup>1</sup>, Cleidir Santos <sup>2,\*</sup>, Renan N. Barbosa <sup>1</sup>, Oliane Magalhães <sup>1</sup>,  
Laura M. Paiva <sup>1</sup>, Keila A. Moreira <sup>3</sup>, Nelson Lima <sup>4</sup> and Cristina M. Souza-Motta <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Mycology, Centre of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50740-600, Brazil; dy\_carol@hotmail.com (D.S.L.); renan.rnb@gmail.com (R.N.B.); olimicomed@yahoo.com.br (O.M.); mesquitapaiva@terra.com.br (L.M.P.); cristina.motta@ufpe.br (C.M.S.-M.)
  - <sup>2</sup> Department of Chemical Sciences and Natural Resources, Centro de Excelencia en Investigación Biotecnológica Aplicada al Medio Ambiente (CIBAMA), Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco 4811-230, Chile
  - <sup>3</sup> Academic Unity of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, PE 55292-270, Brazil; moreiralab@yahoo.com.br
  - <sup>4</sup> CEB-Centre of Biological Engineering, Micoteca da Universidade do Minho, University of Minho, Braga 4710-057, Portugal; nelson@ie.uminho.pt
- \* Correspondence: cleidir.santos@ufrontera.cl; Tel.: +56-452-596-726; Fax: +56-452-325-440

Academic Editor: Jason K. Levy

Received: 27 January 2017; Accepted: 27 March 2017; Published: 1 April 2017

**Abstract:** Water contamination with large amounts of industrial textile coloured effluents is an environmental concern. For the treatment of textile effluents, white-rot fungi have received extensive attention due to their powerful capability to produce oxidative (e.g., ligninolytic) enzymes. In addition, other groups of fungi, such as species of *Aspergillus* and *Trichoderma*, have also been used for textile effluents treatment. The main aim of the present study was to requalify a Brazilian *Trichoderma* culture collection of 51 *Trichoderma* strains, isolated from different sources in Brazil and preserved in the oldest Latin-American Fungal Service Culture Collection, The Micoteca URM WDCM 804 (Recife, Brazil). Fungal isolates were re-identified through a polyphasic approach including macro- and micro-morphology and molecular biology, and screened for their capability to decolourise real effluents collected directly from storage tanks of a textile manufacture. *Trichoderma atroviride* URM 4950 presented the best performance on the dye decolourisation in real textile effluent and can be considered in a scale-up process at industrial level. Overall, the potential of *Trichoderma* strains in decolourising real textile dye present in textile effluent and the production of the oxidative enzymes Lac, LiP and MnP was demonstrated. Fungal strains are available in the collection e-catalogue to be further explored from the biotechnological point of view.

**Keywords:** culture collection; filamentous fungi; laccase; lignin peroxidase; manganese peroxidase; textile effluent decolourisation; *Trichoderma* identification

### 1. Introduction

Textile industries waste large water quantities that in some cases return to environment as untreated or incorrectly treated effluents [1]. Due to the presence of non-fixed dyes during the dyeing process, these wastewaters are highly coloured [2,3]. Water contamination with large amounts of coloured effluents is a serious environmental problem.

There are mainly three types of treatment for textile effluents: physical, chemical and biological. In recent years, relevant methods based on biological textile effluents degradation have been developed

using bacteria and fungi in aerobic and anaerobic processes [1,2,4–10]. A recent review on current technologies for biological treatment of textile wastewater discusses in deep these bioprocesses [11]. The use of oxidative enzymes, mainly Lac and peroxidases, in textile industry has increased quickly. It has been due to both: (a) the ability of these oxidative enzymes to bleach textiles; and (b) the biological treatments involving these enzymes seem to be an attractive solution mainly because most existing treatments (e.g., coagulation/flocculation, adsorption, ion exchange, and electrochemical methods) of dye wastewater utilize ineffective and uneconomical processes [12]. In addition, other biomimetic oxidative bleaches, like metalloporphyrins, are very promising catalysts for synthetic textile dyes. However, they also show some limitations and drawbacks [13].

For the treatment of textile effluents, white-rot fungi have been extensively assessed due to their powerful capability to produce oxidative, including ligninolytic (e.g., laccase (Lac), lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP)) enzymes [6]. Other groups of fungi have also been evaluated for textile effluents treatment (e.g., species of ascomycetes like *Aspergillus* and *Trichoderma*) [6,11]. In addition, although the oxidative system is frequently produced during fungal secondary metabolism, different microorganisms produce different enzymes depending on cultivation conditions [4–6,14].

*Trichoderma* is a very genetically diverse genus with interesting features, which make some of its species of agricultural and industrial interest. Species of *Trichoderma* are widely used in the production of enzymes for both pulp treatment and food production [15]. In addition, there are also different reports showing the potential of these fungi to remediate the pollution of soil and water [14,16–18].

All these features make *Trichoderma* an important fungal taxonomic group for biotechnological application. As a matter of consequence, for microbial culture collections that have *Trichoderma* in their catalogues it is important to have these assets identified and characterised according to the current state-of-the-art. Considering this, the main aim of the present study was to requalify a Brazilian *Trichoderma* culture collection of 51 *Trichoderma* strains, isolated from different sources in Brazil and preserved in the oldest Latin-American Fungal Service Culture Collection, The Micoteca URM WDCM 804 (Recife, Brazil). The requalification work was based on the fungal identification through a polyphasic approach including macro- and micro-morphology, molecular biology and screening their capability to decolourise real effluents collected directly from storage tanks of a textile manufacture.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganisms and Culture Conditions

Fifty-one *Trichoderma* strains previously isolated from different substrates of geographic regions of Brazil (see Table 1) were obtained from the Fungal Culture Collection Micoteca URM (Department of Mycology, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife, Brazil, [www.ufpe.br/micoteca](http://www.ufpe.br/micoteca)). The Micoteca URM is a culture collection registered at the World Federation for Culture Collections (WFCC) under the number WDCM 604 and certified in the ISO 9001:2015 standard under the Certificate Number BR018207-1. Fungal strains were obtained from preserved form under mineral oil, revived according to the instructions issued by the Micoteca URM culture collection, and grown and maintained in Potato Dextrose Agar plates (PDA, for 1 L water: 4 g potato starch, 20 g dextrose and 15 g agar).

### 2.2. Morphological Fungal Identification

In order to confirm the taxonomical identification of the 51 *Trichoderma* strains, macro- and micro-morphological analyses were performed (see Table 1). For macro-morphological analyses, the strains were grown on PDA plates at 30, 35 and 40 °C, and on Synthetic Low-Nutrient Agar plates (SNA, for 1 L water: 1.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g KNO<sub>3</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g KCl, 0.2 g glucose, 0.2 g sucrose and 20 g agar) at 35 °C, in the dark without humidity control and under aerobic conditions.

For micro-morphological analysis, strains were inoculated on Cornmeal Agar Medium supplemented with dextrose plates (CMD, for 1 L water: 30 g cornmeal, 20 g dextrose and 20 g agar). Fungi were incubated at 25 °C for 3 days in the same conditions described above. Afterwards,

6 mm diameter plugs of each CMD fungal culture were inoculated on PDA plates and grown for 4 days in the same conditions but with a regime of 12:12 h light:dark.

Conidia and phialides, presence of chlamydospores and sterile hyphae were observed using 90% lactic acid slides on a light microscopy. Final morphological identification followed the taxonomic keys and guides available for *Trichoderma* [19,20].

### 2.3. Molecular Fungal Identification

For the molecular identification, the fungal strains were cultivated in Minimum Liquid Medium (MLM, for 1 L water: 10 g glucose, 10 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and, 2 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) at 28 °C under static condition for 96 h. Mycelia were filtered and collected for extraction of genomic DNA according to the method previously described elsewhere [21]. Amplifications of gene regions ITS1-5.8S-ITS2 and translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) were performed in 50 µL mixture containing: buffer Taq DNA polymerase 1×; 1.5 mM of  $\text{MgCl}_2$ ; 0.4 µM each primer (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; EF1-728F: 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'; TEF1 rev: 5'-GCCATCCTTGAGATACCAGC-3') [22–24]; 0.2 mM of dNTPs; 0.2 U of Taq DNA polymerase; and 25 ng of DNA template.

The thermal cycling parameters consisted of initial denaturation at 94 °C for 2 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 55 °C for 30 s, primer extension at 72 °C for 1 min and a final extension for 10 min at 72 °C [20,21]. Amplification products were visualised on 1% agarose gel electrophoresis, stained with 0.5 µg/mL of GelGreen™ under UV light and then photographed and purified using Fermentas® kit (Cambridge, UK). The amplified DNA fragments were sequenced in the Sequencing Platform of the Central Laboratory of the Centre of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Electropherograms were analysed and edited in the software Staden Package 2.0. Sequences obtained were used to search the most similar sequences deposited in the GenBank by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The experimental sequences of ITS1-5.8S-ITS2 and *tef1* gene regions were aligned and edited together with the retrieved from the database using the software MEGA 5.0. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbour Joining method and the Maximum Parsimony (MP), with 1000 bootstrap resampling using the software MEGA 5.0 [25].

### 2.4. Decolourisation Assay

Samples of textile effluent were collected directly from storage tanks in a textile manufacture at the municipality of Toritama, State of Pernambuco, Brazil. The effluent samples were kept at 4 °C and transferred to the Laboratory of Environmental and Quality Engineering (Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) to perform the physical-chemical analyses and decolourisation assay.

The physical-chemical analyses involved the Chemical Oxygen Demand (COD) by colorimetric method, Biochemical Oxygen Demand (BOD) by azide modification of a Winkler titration method, Colour (HAZEN scale), Turbidity (NTU scale), pH using the potentiometric measurement principle, and Sedimentable Solids (SD) by gravimetric through a 0.45 µm filter membrane, using the standard methods for the examination of water and wastewater [26].

The screening of textile dye decolourisation by *Trichoderma* strains was assessed by using 6 mm diameter plugs of fungal cultures previously grown at 30 °C for 7 days on PDA plates. Plugs were transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of Malt Broth (MB, for 1 L water: 20 g malt extract, 1 g peptone and 20 g dextrose) supplemented with  $1.9 \times 10^{-2}$  mM Indigo Carmine dye (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Fungal cultures were incubated in the dark at 28 °C for 8 days. Fungal biomass was then removed by filtration through a 0.45 µm Millipore membrane and absorbance of filtrates was assessed in a Hitachi U-5100 spectrophotometer at 650 nm which is the maximum absorption of Indigo Carmine

( $\epsilon_{650\text{ nm}} = 3.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). The Indigo Carmine was used as standard and MB free of inoculum containing dye was used as abiotic control. The decolourisation percentage of Indigo Carmine dye was calculated according to Miranda et al. [27].

Previous to evaluate the decolourisation of the dye present on the real textile effluent, this was sterilised by autoclave at 121 °C during 15 min. Three different experiments were performed. In each case, 3 plugs of 6 mm diameter of fungal cultures grown for 7 days at 30 °C on PDA plates were added to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of: (1) textile effluent; (2) textile effluent supplemented with 0.5% (*w/v*) wheat bran, and (3) textile effluent supplemented with 0.05% (*w/v*) extract yeast. Cultures were incubated under static conditions, in the dark at 28 °C for 8 days. Afterwards, 2 mL aliquots were transferred into tubes and centrifuged at 1035 g for 15 min at 4 °C. Supernatants were analysed at 650 nm in a Hitachi U-5100 spectrophotometer.

The decolourisation results were submitted to analysis of variance and means compared by Friedman test at 5% probability in the ASSISTAT software [28].

### 2.5. Determination of Enzymatic Activities

In order to determine the activity of Lac, LiP and MnP, 6 mm diameter plugs of fungal cultures previously grown for 7 days at 30 °C on PDA plates were transferred into 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Basal Culture Medium (BCM, for 1 L water: 0.1 g glucose; 0.15 g yeast extract; 4.5 g wheat bran; and 0.05 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 6.0). Fungal incubation occurred under static condition in the dark, at 28 °C for 8 days. The biomass was then separated by filtration through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore membrane. In order to determine the activity of each enzyme, absorbance of filtrates was assessed in a spectrophotometer Hitachi U-5100 and one unit (U) of enzyme was defined as the release of 1.0  $\mu\text{mol}$  product formed per min under the assay conditions.

Lac activity was measured from the oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). For this reaction, a mixture containing 0.8 mL ABTS (0.03% *v/v*), 0.1 mL sodium acetate buffer (0.1M, pH 5.0) and 0.1 mL enzymatic extract was used [6]. The oxidation of ABTS was determined at 420 nm with  $\epsilon_{420\text{ nm}} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . LiP activity was assessed through the oxidation of veratryl alcohol. For this reaction, a mixture containing 1 mL sodium tartrate buffer solution (125 mM, pH 3.0), 500  $\mu\text{L}$  veratryl alcohol (10 mM), 500  $\mu\text{L}$  hydrogen peroxide (2 mM) and 500  $\mu\text{L}$  enzymatic extract was used. The reaction was started by adding hydrogen peroxide to the mixture and the production of veratraldehyde was determined at 310 nm [29] with  $\epsilon_{310\text{ nm}} = 9.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

MnP activity was assessed by using the methodology of phenol red oxidation measurement as previously described elsewhere [30]. Briefly, the reaction mixture was composed of 500  $\mu\text{L}$  enzymatic extract, 100  $\mu\text{L}$  phenol red, 100  $\mu\text{L}$  sodium lactate (250 mM), 200  $\mu\text{L}$  bovine albumin (0.5% *w/v*), 50  $\mu\text{L}$  sulphate manganese (2 mM), 50  $\mu\text{L}$  hydrogen peroxide (2 mM) and 1.0 mL sodium succinate buffer (20 mM, pH 4.0). The reactions were performed at 30 °C for 5 minutes and were stopped by adding 2 N NaOH (40  $\mu\text{L}$ ). MnP activity were determined at 610 nm with  $\epsilon_{610\text{ nm}} = 2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Overall, the enzymatic results were submitted to analysis of variance and means compared by Tukey test at 5% probability in the ASSISTAT software [28].

### 2.6. Phenotype Data Analysis

A cluster analysis was applied and a dendrogram of phenotype relatedness was constructed. The analysis was performed using the phenotype traits that showed at least high association with each *Trichoderma* species, such as: conidia shape, ornamentation, colour, length and width, and phialide length and base width, and presence of sterile hyphae and chlamydospore, and colony diameter on PDA at 30, 35 and 40 °C and SNA at 35 °C. The analysis was made using the hierarchical clustering with the complete linkage method and was performed with the statistical package jmp 8.0.2 for Macintosh (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Morphological and Molecular Identification

Fifty-one fungal strains obtained from the Micoteca URM culture collection and belonging to the genus *Trichoderma* were evaluated. Data obtained from the morphological analysis (Table 1 and Figure 1) show a clear difficulty to cluster the strains by morphological traits when a cluster analysis was used. It is well known that, due to homoplasy (i.e., convergent evolution that creates analogous traits with similar form but were not present in the last common ancestor) of morphological characters, it is often impossible to discriminate species of *Trichoderma*. Notwithstanding this, for other fungal taxonomic groups, the statistical grouping of phenotype traits such as conidia shape, ornamentation and dimensions (length and wide) are normally very good data for species identification when combined with other traits [31,32].

It is well known that the overall range of variation in conidial dimensions in *Trichoderma* is not great. However, related species can often be differentiated by slight but consistent differences in size. The conidial surface appears smooth in most species in light microscope observations, although many species with apparently smooth-appearing conidia are delicately ornamented when examined by SEM. In most species, terminal phialides tend to be more elongate and narrower, and frequently more or less subulate. Chlamydospores are common in many species, although they tend to be uniformly globose or ellipsoidal, terminal and intercalary, smooth-walled, colourless, yellowish or greenish, and 6–15 µm diameter in most species. Vegetative hyphae show few characters useful for identification.

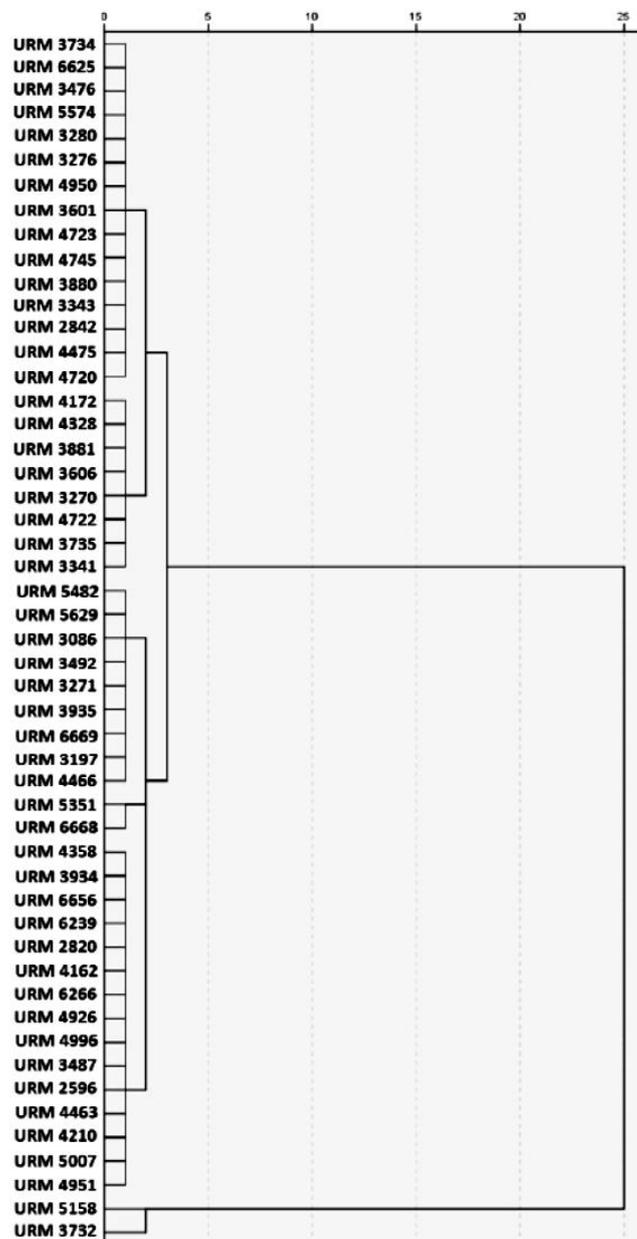
This means that the identification based on the classical morphology techniques can be used as presumptive approach. However, to obtain a sound and reliable identification, molecular biology must be performed [33]. Consequently, in the present study the taxonomic information was revised throughout molecular biology analysis based on the 500 and 600 base pairs fragments obtained from the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA and *tefl* gene regions, respectively.

Through the phylogenetic analysis based on ITS region, inaccurate clades were observed and the groupings observed for some *Trichoderma* species were unclear (Figure 2). For instance, for cryptic species like *T. aspereloides* and *T. asperelum*, the ITS region was not discriminatory enough. In contrast, through the *tefl* gene analysis the species *T. aspereloides* and *T. asperelum* were well-delineated. In fact, in Figure 3, it is possible to observe six clades supported with bootstrap above 85%: Viride (*Trichoderma koningiopsis*, *T. erinaceum* and *T. atroviride*), Hamatum (*Trichoderma asperellum*, *T. asperelloides* and *T. hamatum*); Longibrachiatum (*Trichoderma longibrachiatum* and *T. ghanense*); Lone lineages (*Trichoderma spirale*), Virens (*Hypocrea virens*/*Trichoderma virens*), and Harzianum (*Hypocrea lixii*/*Trichoderma harzianum*).

Based on the former identification available in the records of the Micoteca URM culture collection, the 51 fungal isolates were distributed into six *Trichoderma* species, as shown in the Table 2. Based on the molecular biology analysis presented herein, it was possible to separate them into 11 different species: *Trichoderma asperelloides* (8 strains), *T. asperellum* (4), *T. atroviride* (6), *T. erinaceum* (3), *T. ghanense* (1), *T. hamatum* (4), *T. harzianum* (13), *T. koningiopsis* (4), *T. longibrachiatum* (1), *T. spirale* (1) and *T. virens* (6) (Table 2). Overall, only 10 out of 51 (ca. 20%) isolates retained their former identification, namely, *T. hamatum* (URM 3492), *T. harzianum* (URM 4475, 5482, 4720, 6266 and 4328) and *T. virens* (URM 4358, 3934, 3343 and 6656).

Table 1. Cont.

URM	Conidia			Phialide				Sterile Hyphae	Chlamyd.	PDA (mm)			SNA (mm)
	Shape <sup>1</sup>	Ornament <sup>2</sup>	Colour <sup>3</sup>	Length (µm)	Width (µm)	Length (µm)	Base Width (µm)			30 °C	35 °C	40 °C	35 °C
2820	SGL/O	S	G	2.8–3.4	1.8–2.2	6.8–8.5	2.0–2.6	–	–	74.0	23.0	Ø	19.0
3606	GL/SGL	S	G	3.5–4.1	2.7–3.2	13.6–15.2	2.0–2.6	–	–	54.0	12.0	Ø	3.0
4723	E	S	G	3.5–4.1	1.8–2.2	6.8–8.5	1.8–2.0	–	–	76.0	8.0	Ø	15.0
4745	E	S	G	3.5–4.1	1.8–2.2	6.8–8.5	1.8–2.0	–	–	74.0	10.0	Ø	17.0
3880	E	S	G	3.5–4.1	1.8–2.2	6.8–8.5	1.8–2.0	–	–	72.0	11.0	Ø	13.0
5158	E	S	G	3.5–4.1	2.2–2.7	10.2–11.9	2.6–3.1	–	+	83.0	83.0	31.0	80.0
3276	OB	S	G	3.5–4.1	2.7–3.2	5.1–6.8	2.6–3.1	+	+	67.0	9.0	Ø	Ø
5629	SGL/O	S	G	3.5–4.1	2.2–2.7	13.6–15.2	1.8–2.0	–	+	56.0	28.0	Ø	27.0
4210	SGL/O	S	G	3.5–4.1	2.7–3.2	13.6–15.2	2.0–2.6	–	–	82.0	27.0	Ø	24.0
4466	GL/SGL	S	G	3.5–4.1	2.7–3.2	10.2–11.9	2.0–2.6	–	+	53.0	21.0	Ø	20.0
4951	GL/SGL	S	G	3.5–4.1	2.7–3.2	10.2–11.9	2.0–2.6	+	+	66.0	43.0	Ø	16.0
4996	GL/SGL	S	G	4.2–4.8	3.2–3.6	8.5–10.2	2.6–3.1	–	+	69.0	35.0	Ø	25.0
2596	SGL/O	S	W/Y	3.5–4.1	2.7–3.2	13.6–15.2	2.6–3.1	–	+	73.0	28.0	Ø	28.0



**Figure 1.** Dendrogram using the hierarchical cluster analysis (average linkage between groups) of relatedness among the strains of *Trichoderma* based on the morphological analysis data in Table 1.

**Table 2.** Re-identification of bio-resources from Micoteca URM culture collections after morphological and molecular characterisation.

URM	Revised Identification	Original Identification	Deposit Year	Substrate	Geographical Origin (Brazil)
3280	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. harzianum</i>	1992	Soil	Paraná
6239	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. harzianum</i>	2010	Soil	Pernambuco
3086	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. harzianum</i>	1989	Leaf of <i>R. gardenioides</i>	São Paulo
3487	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. koningii</i>	1994	Birds faeces	Pernambuco
3271	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. koningii</i>	1992	Unknown	São Paulo
5007	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	2005	Soil	Pernambuco
4358	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	2001	Soil	Pernambuco
3934	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. virens</i>	1997	Water	Pernambuco
3343	<i>T. asperellum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1993	Unknown	Pernambuco
6656	<i>T. asperellum</i>	<i>T. hamatum</i>	2012	Soil with textile effluent	Pernambuco
4926	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	2005	Clay soil	Pernambuco
3197	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	1990	Amazonian nuts	Pará
3735	<i>T. atroviride</i>	<i>T. aureoviride</i>	1997	Lake water	Pernambuco
3734	<i>T. atroviride</i>	<i>T. aureoviride</i>	1997	Lake water	Pernambuco
6625	<i>T. atroviride</i>	<i>T. aureoviride</i>	2012	Soil of agroforestry	Pernambuco
4950	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	2005	Soil	Pernambuco
3601	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	1995	Unknown	Paraná
3270	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	1992	Unknown	São Paulo
4162	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1999	Rhizosphere of sunflower	Pernambuco
4172	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. harzianum</i>	1999	Rhizosphere of sunflower	Pernambuco
3881	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. koningii</i>	1997	Soil of <i>P. edulis</i> culture	Pernambuco
3732	<i>T. ghanense</i>	<i>T. koningii</i>	1997	Lake water	Pernambuco
3341	<i>T. hamatum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1992	Rhizosphere of <i>V. herbacea</i>	São Paulo
3476	<i>T. hamatum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1993	Rhizosphere of <i>V. herbacea</i>	São Paulo
3492	<i>T. hamatum</i>	<i>T. hamatum</i>	1994	Birds faeces	Pernambuco
4722	<i>T. hamatum</i>	<i>T. harzianum</i>	2003	Garden of <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
5351	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2006	Sugarcane	Unknown
6668	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2012	Soil with textile effluent	Pernambuco
3935	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1997	River water	Pernambuco
5574	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2007	Mangrove sediment	Pernambuco
4463	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2002	Sea water	Pernambuco
2842	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	1986	Unknown	Pernambuco
6669	<i>T. harzianum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2012	Soil with textile effluent	Pernambuco
4475	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2002	Beach sand	Pernambuco
5482	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2007	Unknown	São Paulo
4720	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2003	Garden of <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
6266	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2010	Soil of agroforestry	Pernambuco
4328	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2001	Soil of mining	Bahia
2820	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>	1985	Sugarcane bagasse	Alagoas
3606	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. hamatum</i>	1995	Unknown	Paraná
4723	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningii</i>	2003	Garden of <i>A. cephalotes</i>	Alagoas
4745	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningii</i>	2003	Garden of <i>A. cephalotes</i>	Alagoas

Table 2. Cont.

URM	Revised Identification	Original Identification	Deposit Year	Substrate	Geographical Origin (Brazil)
3880	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. koningii</i>	1997	Soil of <i>P. edulis</i> culture	Pernambuco
5158	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. aureoviride</i>	2005	Cement	Pernambuco
3276	<i>T. spirale</i>	<i>T. hamatum</i>	1991	sorghum	Pernambuco
5629	<i>T. virens</i>	<i>T. hamatum</i>	—	Unknown	Paraná
4210	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	1999	Rhizosphere of sunflower	Pernambuco
4466	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	2002	Sea water	Pernambuco
4951	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	2005	Soil	Pernambuco
4996	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	2005	Soil	Pernambuco
2596	<i>T. virens</i>	<i>T. viride</i>	1980	Unknown	Pernambuco

### 3.2. Screening of Indigo Carmine Decolourisation in Malt Broth

Among the 51 *Trichoderma* strains assessed for decolourisation of Indigo Carmine in MB, 18 of them presented over 70% decolourisation, which corresponds to  $0.57 \times 10^{-2}$  mM or less residual dye (Table 3). From these fungal strains, three presented values greater than 90% decolourisation: *T. atroviride* URM 3270, URM 3735 and URM 6625, which presented dye decolourisation of 96.86%, 94.61% and 93.57%, respectively. These results corroborate those previous obtained by Adnan et al. [14] for a strain of *T. atroviride* isolated from tree bark in a Malaysian forest. In that case, authors obtained similar results with 91.1% decolourisation for the dye Reactive Black 5.

**Table 3.** The 18 *Trichoderma* URM strains that presented decolourisation percentages of Indigo Carmine above 70% and related oxidase enzyme activities (U·L<sup>-1</sup>) after eight days of incubation.

Species	URM	Lac	LiP	MnP
<i>T. asperelloides</i>	3280	1.7 aC	760.0 cdA	379.3 defB
<i>T. asperellum</i>	4926	8.3 aC	517.3 fghA	366.0 defgB
<i>T. atroviride</i>	3270	2.0 aC	758.0 cdA	394.0 defB
<i>T. atroviride</i>	3735	8.3 aC	1307.0 aA	617.3 bcB
<i>T. atroviride</i>	4950	2.3 aB	750.0 cdA	680.0 bA
<i>T. atroviride</i>	6625	1.3 aB	692.0 deA	90.7 iJB
<i>T. erinaceum</i>	3881	10.0 aC	378.7 iB	875.3 aA
<i>T. ghanense</i>	3732	1.7 aC	766.3 cdA	298.0 fghB
<i>T. hamatum</i>	3476	1.0 aC	593.3 efgA	92.7 jJB
<i>T. harzianum</i>	2842	2.3 aC	924.0 bA	176.0 hijB
<i>T. harzianum</i>	3935	1.3 aC	480.0 ghiA	143.3 iJB
<i>T. harzianum</i>	4328	2.7 aB	378.0 iA	442.7 deA
<i>T. harzianum</i>	4463	1.7 aC	758.7 cdA	232.0 ghiB
<i>T. harzianum</i>	5482	2.7 aC	631.3 defA	369.3 defB
<i>T. harzianum</i>	6668	3.0 aB	440.0 hiA	0.0 iB
<i>T. koningiopsis</i>	3880	7.7 aC	645.3 defA	146.0 iJB
<i>T. virens</i>	4996	15.7 aC	844.0 bcA	329.3 efgB
<i>T. virens</i>	5629	1.7 aC	612.7 efgA	500.0 cdB

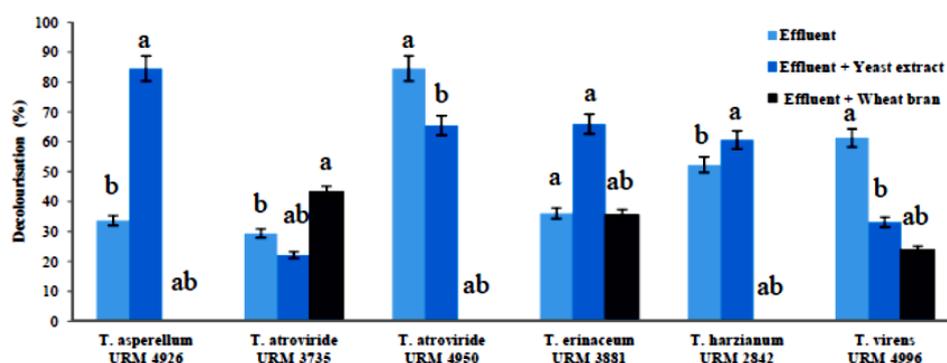
Averages values followed by the same superscript letters, lower case (within column) and capital (within row), do not differ by Tukey test at 5% probability.

In contrast, according to the data obtained in the present study, the strains *T. asperelloides* URM 3086, URM 3934 and URM 5007; *T. asperellum* URM 6656; *T. hamatum* URM 4722; *T. koningiopsis* URM 3606; and *T. virens* URM 4466 were not efficient in decolourising Indigo Carmine. These results were due to the fact strains belonging to these species require more time to be adapted on the polluted environment to become able to decolourise the effluent. Gajera et al. [34] obtained similar results

61.3%, respectively). In addition, *T. asperellum* URM 4926 (84.6%), *T. erinaceum* URM 3881 (66%) and *T. harzianum* URM 2842 (60.6%) presented a good performance of decolourisation when textile effluent supplemented with extract yeast was used.

When the effluent was supplemented with wheat bran, the percentage of effluent decolourisation was higher for the strains *T. atroviride* URM 3735 (43.0%), *T. erinaceum* URM 3881 (35.6%) and *T. virens* URM 4996 (23.8%) (Figure 4).

According to Saravanakumar and Kathiresan [17], a large decolourisation rate (89%) of Malachite Green dye after 10 days of incubation of *T. harzianum* TSK8 (JQ809340) was observed when this strain was grown in supplemented medium with 5.8 mg·L<sup>-1</sup> yeast extract. In addition, Adnan et al. [14] evaluated the effect of different sources of carbon and nitrogen in the decolourisation of textile dye Reactive Black 5 by *T. atroviride*. Authors observed that yeast extract was a good source of nitrogen for growth *T. atroviride* and to stimulate it to decolourise Reactive Black 5 up to 91.1%. Furthermore, authors evaluated dye decolourisation by using ammonium nitrate and ammonium chloride and, in contrast, observed only a decolourisation rate of 29.1% and 71.7%, respectively.



**Figure 4.** Decolourisation percentage of real textile effluent by the six *Trichoderma* strains best oxidases producers. Averages followed by the same letters do not differ by Friedman test at 5% probability.

#### 4. Conclusions

The Brazilian *Trichoderma* asset preserved at the Micoteca URM culture collection was re-identified and made available in the culture collection e-catalogue to be further explored from the biotechnologically point of view. In the specific case of dye decolourisation screening using real textile effluent, the strain *T. atroviride* URM 4950 gave the best results and can be considered in a scale-up process at industrial level. This strain is herein indicated to be used as a major target for future studies related with the treatment of industrial textile effluent and bioremediation of environments contaminated with dyes. Overall, the data obtained suggest that the dye decolourisation in real textile effluent is not a one-step process. More than one oxidative enzyme can be involved in this complex process. The contribution of these enzymes for decolourisation of textile effluent differs from fungus to fungus. The potential of *Trichoderma* strains in decolourising real textile dye present in textile effluent and the production of the oxidative enzymes Lac, LiP and MnP were successfully demonstrated. Finally, in this study, the strains available through Micoteca URM culture collection are identified according the current state-of-the-art and better characterised to underpinning life sciences and biotechnology.

**Acknowledgments:** Authors are grateful to the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Brazil for the financial support. C. Santos thanks to the Universidad de La Frontera (Temuco, Chile) for the internal support to the current external funded project (DIUFRO PIA16-0009).

**Author Contributions:** Keila A. Moreira and Cristina M. Souza-Motta conceived and designed the experiments; Dianny Silva Lisboa and Renan N. Barbosa performed the experiments; Dianny Silva Lisboa, Laura M. Paiva,



Oliane Magalhães, Keila A. Moreira, Cristina M. Souza-Motta, Cledir Santos and Nelson Lima analysed the data; Keila A. Moreira and Cristina M. Souza-Motta contributed reagents and materials; and Dianny Silva Lisboa, Cledir Santos and Nelson Lima wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## References

1. Durruty, I.; Fasce, I.; González, J.F.; Wolski, E.A. A kinetic study of textile dyeing wastewater degradation by *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, *38*, 1019–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ottoni, C.A.; Santos, C.; Kozakiewicz, Z.; Lima, N. White-rot fungi capable of decolourising textile dyes under alkaline conditions. *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 187–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. 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. *Sustain. Water Resour. Manag.* **2015**, *1*, 233–243. [[CrossRef](#)]
4. Kanayama, N.; Suzuki, T.; Kawap, K. Purification and Characterization of an Alkaline Manganese Peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *93*, 405–410. [[CrossRef](#)]
5. Saparrat, M.C.M.; Martínez, M.J.; Cabello, M.N.; Arambarri, A.M. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev. Iberoam. Micol.* **2002**, *19*, 181–185. [[PubMed](#)]
6. Bonugli-Santos, R.C.; Durranta, L.R.; Silva, M.; Settec, L.D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 32–37. [[CrossRef](#)]
7. Maciel, M.; Ottoni, C.; Santos, C.; Lima, N.; Moreira, K.; Souza-Motta, C. Production of polygalacturonases by *Aspergillus* section *Nigri* strains in a fixed bed reactor. *Molecules* **2013**, *18*, 1660–1671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Maciel, M.D.H.C.; Ottoni, C.A.; Herculano, P.N.; Porto, T.S.; Porto, A.L.F.; Santos, C.; Lima, N.; Moreira, K.A.; Souza-Motta, C.M. Purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, *371*, 125–130. [[CrossRef](#)]
9. Ottoni, C.A.; Lima, L.; Santos, C.; Lima, N. Effect of Different Carbon Sources on Decolourisation of an Industrial Textile Dye Under Alkaline-Saline Conditions. *Curr. Microbiol.* **2014**, *68*, 53–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Passarini, M.R.Z.; Santos, C.; Lima, N.; Berlinck, R.G.S.; Sette, L.D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drumacidon reticulatum*. *Arch. Microbiol.* **2013**, *195*, 99–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sarayu, K.; Sandhya, S. Current technologies for biological treatment of textile wastewater: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167*, 645–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ottoni, C.; Simões, M.F.; Fernandes, S.; Santos, C.R.; Lima, N. High laccase expression by *Trametes versicolor* in a simulated textile effluent with different carbon sources and pHs. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zucca, P.; Neves, C.M.B.; Simões, M.M.Q.; Neves, M.G.P.M.S.; Cocco, G.; Sanjust, E. Immobilized lignin peroxidase-like metalloporphyrins as reusable catalysts in oxidative bleaching of industrial dyes. *Molecules* **2016**, *21*, 964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Adnan, L.A.; Sathishkumar, P.; Yusoff, A.R.M.; Hadibarata, T. Metabolites characterization of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2015**, *104*, 274–282. [[CrossRef](#)]
15. Hoyos-Carvajal, L.; Orduz, S.; Bissett, J. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal. Genet. Biol.* **2009**, *46*, 615–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nicolás, C.; Hermosa, R.; Rubio, B.; Mukherjee, P.K.; Monteb, E. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant. Sci.* **2014**, *228*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Saravanakumar, K.; Kathiresan, K. Bioremoval of the synthetic dye malachite green by marine *Trichoderma* sp. *SpringerPlus* **2014**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tripathi, P.; Singh, P.C.; Mishra, A.; Chauhan, P.S.; Dwivedi, S.; Bais, R.T.; Tripathi, R.D. *Trichoderma*: A potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Techn. Environ. Policy* **2013**, *15*, 541–550. [[CrossRef](#)]

19. Samuels, G.J.; Chaverri, P.; Farr, D.E.; McCray, E.B. Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available online: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (accessed on 18 February 2016).
20. Santos, C.; Ventura, J.A.; Costa, H.; Fernandes, P.M.B.; Lima, N. MALDI-TOF MS to identify the pineapple pathogen *Fusarium guttiforme* and its antagonist *Trichoderma asperellum* on decayed pineapple. *Trop. Plant Pathol.* **2015**, *40*, 227–232. [CrossRef]
21. Griffiths, R.L.; Whiteley, A.S.; O'donnell, A.G.; Bailey, M.J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 5488–5491. [CrossRef] [PubMed]
22. Samuels, G.J.; Dodd, S.L.; Gams, W.; Castlebury, L.A.; Petrini, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **2002**, *94*, 146–170. [CrossRef] [PubMed]
23. Carbone, I.; Kohn, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **1999**, *91*, 553–556. [CrossRef]
24. White, T.J. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*; Academic Press: New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322.
25. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731–2739. [CrossRef] [PubMed]
26. Rice, E.W.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L.S. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2012.
27. Miranda, R.C.M.; Gomes, E.B.; Pereira, J.N.; Marin-Morales, M.A.; Machado, K.M.G.; Gusmão, N.B. Treatment of textile effluent under static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 361–367. [CrossRef] [PubMed]
28. Silva, F.A.Z.; Azevedo, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In *World Congress on Computers in Agriculture, 7*; American Society of Agricultural and Biological Engineers: Reno, NV, USA, 2009.
29. Arora, D.S.; Gill, P.K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 602–605. [CrossRef]
30. Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Gold, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **1984**, *169*, 247–250. [CrossRef]
31. Silva, F.C.; Chalfoun, S.M.; Batista, L.R.; Santos, C.; Lima, N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. *Ann. Microbiol.* **2015**, *65*, 2119–2129. [CrossRef]
32. Rodrigues, P.; Santos, C.; Venâncio, A.; Lima, N. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 877–892. [CrossRef] [PubMed]
33. Oliveira, M.M.E.; Santos, C.; Sampaio, P.; Romeo, O.; Almeida-Paes, R.; Pais, C.; Lima, N.; Zancoppe-Oliveira, R.M. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res. Microbiol.* **2015**, *166*, 102–110. [CrossRef] [PubMed]
34. Gajera, H.P.; Bambharolia, R.P.; Hirpara, D.G.; Patel, S.V.; Golakiya, B.A. Molecular identification and characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decolourisation and biodegradation of textile dye effluents. *Process Saf. Environ.* **2015**, *98*, 406–416. [CrossRef]



**APÊNDICE B – ARTIGO PARA SUBMISSÃO****Optimization of decolorization of textile effluent by *Trichoderma atroviride* URM 3735 and URM 4950**

Dianny Carolyne Vasconcelos da Silva-Lisboa, Ana Caroline Lima Araújo, Gianne Rizzuto Araújo, Karla Torres Lins Souza Freire, Laura Mesquita Paiva, Cledir Santos, Keila Aparecida Moreira and Cristina Maria de Souza-Motta

D.C.V. Silva-Lisboa, A.C.L. Araújo G.R. Araújo, K.T.L.S. Freire, L.M. Paiva, C.M. Souza-Motta(\*) Department of Micology, Centre of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; (\*) e-mail: [souzamotta@yahoo.com.br](mailto:souzamotta@yahoo.com.br)

C. Santos

Department of Chemical Sciences and Natural Resources, CIBAMA, BIOREN-UFRO, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

K. A. Moreira

Academic Unity of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil.

**Abstract***Objectives*

In this context, this study aimed to optimize the decolorization of textile effluent by *Trichoderma atroviride* URM 3735 and URM 4950, for use in bioremediation of environments contaminated by textile industries

*Results*

The best conditions to achieve the maximum level of decolorization of textile effluent by *T. atroviride* URM 4950 and URM 3735 were temperatures 25 and 35 °C, concentration of yeast extract 0.5 g.L<sup>-1</sup> and pH 7. In trials with *T. atroviride* URM 4950 and URM 3735, the concentration of yeast extract (negative effect) and the combination of the concentration of yeast extract and pH (negative effect) were the most influential factors for the removal of color from textile effluent.

*Conclusions*

1 *T. atroviride* URM 4950 and URM 3735 had great potential for the practical application in the field of  
2 environmental biotechnology such as biodegradation of different industrial dyes and textile effluents.

3  
4 **Keywords** Filamentous fungi · *Trichoderma* · Decolorization of textile effluents · Pareto chart

## 5 6 **Introduction**

7 The effluents generated by the textile industries are regarded as the most polluting between those produced by  
8 industrial sectors, and the launch of these colored effluents in aquatic environments can cause as well as visual  
9 pollution, decreased photosynthetic ability of plants of these environments and eutrophication of rivers, as well as  
10 contamination of soil and groundwater (Gajera et al. 2015). Another concern is with the existing colorants found  
11 in these effluents, which may contain toxic substances and carcinogenic to humans and other animals (Sivasamy  
12 & Sundarabal 2011).

13 There are three types of treatment for textile effluents: physical, chemical and biological. Comparing these  
14 methods, biological recently gained importance, being considered the best alternative in the degradation of  
15 effluents with dyes, due to lower costs in application of its high efficiency and because they have a smaller  
16 secondary pollution (Tan et al. 2016).

17 Studies related to biological methods for treatment of textile effluents have used microorganisms, especially fungi,  
18 since they are able to degrade or accumulate dyes and other substances present in textile effluents. This due to  
19 amount of enzymes that these microorganisms can synthesize and among them some that bring more benefits to  
20 bioremediation as laccase, tyrosinase and peroxidases (Perovano Filho et al. 2011; Chanda et al. 2016). Recent  
21 research has demonstrated the effectiveness of *Trichoderma* species in producing oxidative enzymes (laccase,  
22 manganese peroxidase and lignin peroxidase) which has applications in industrial bleaching dyes and the  
23 degradation of a wide range of organic pollutants (Khambhaty et al. 2015; Maji et al. 2015).

24 The genus *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) has a wide variety of species, which are  
25 cosmopolitan and can be found in different habitats, especially in places with large availability of organic matter  
26 (Zafra & Cortés-Espinosa 2015). Many species of this genus have been studied in relation to various physiological  
27 and biotechnological applications. It's because these species have powerful enzymatic mechanisms consisting of  
28 cellulases, chitinases, glucanases, and proteases, among others, for the decomposition and the use of present  
29 substrates in soils, but in particular, for degradation of lignocellulosic material, having desirable characteristics for  
30 commercial and industrial use (Zafra & Cortés-Espinosa 2015). In this context, this study aimed to optimize the

1 decolorization of textile effluent by *Trichoderma atroviride* URM 3735 and URM 4950, for use in bioremediation  
2 of environments contaminated by textile industries.

3

#### 4 **Materials and Methods**

5 Microorganisms and culture conditions

6 For the study was used two strains of *Trichoderma atroviride* URM 3735 and URM 4950 (Table 1), preserved in  
7 the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Center of Biosciences, Federal University of  
8 Pernambuco - UFPE, Brazil. The samples were maintained in medium culture of potato dextrose agar medium  
9 (PDA) contained in test tubes until use.

10

11 **Table 1** Taxonomical information of *Trichoderma* strains

Strain number (URM)	Identification	Deposit year	Substrates	Geographical origin in Brazil
3735	<i>T. atroviride</i>	1997	Lake water	Pernambuco
4950	<i>T. atroviride</i>	2005	Soil	Pernambuco

12

13 Textile effluent

14 The textile effluent was collected directly from storage tanks in a jeans processing powerhouse textile polo  
15 Toritama, Pernambuco, Brazil. After collection, the effluent was cooled to 4°C for perform the physical-chemical  
16 analysis (Table 2) by the Environmental Engineering Laboratory and quality - LEAQ – in the Chemistry  
17 Department of UFPE and for bleaching tests.

18

19 **Table 2** Physic-chemical analyses of textile effluent obtained from the textile manufacture located at the  
20 municipality of Toritama, Pernambuco, Brazil

Analyses	COD (mg O <sub>2</sub> /l)	BOD (mg O <sub>2</sub> /l)	Colour (HAZEN)	Turbidity (NTU)	pH	SD (ml/l)
Effluent	3192.5	54.1	448.0	0.19	5.11	7.0

21

COD - Chemical Oxygen Demand, BOD - Biochemical Oxygen Demand and SD – Sedimentable Solid

22

23

24

1 Experimental design and optimization of textile effluent decolorization  
 2 The strains *T. atroviride* URM 3735 and URM 4950 were evaluated for the influence of the following parameters  
 3 in the degradation of textile effluent temperature, concentration of the nitrogen source (yeast extract) and pH, to  
 4 select the best degradation condition (Mohana et al. 2008)(Table 3). The experiment was conducted in a full  
 5 factorial design 2<sup>3</sup>, with levels -1 and +1 and five central points (zero) using the STATISTICA program version  
 6 13 (2015). After inoculation, the flasks were incubated in static and dark conditions, for 8-day period.

7  
 8 **Table 3** Levels and independent variables were chosen to study the best bleaching conditions textile effluent

Factors	Variables	Units	Levels		
			-1	0	+1
A	Temperature	°C	25	30	35
B	Yeast Extract	g.L <sup>-1</sup>	0.5	1.0	1.5
C	pH	pH	5.0	6.0	7.0

9

10 Analysis of decolourisation

11 After the 8-day period, two milliliters aliquots were removed from the Erlenmeyer flasks and centrifuged at  
 12 3300 rpm for 15 minutes to verify the textile effluent decolourisation from the absorbance reading at Hitachi U-  
 13 5100 spectrophotometer at 660nm. Percent decolourisation was calculated as follows (Miranda et al. 2013):

$$14 \quad D_{\%} = \frac{AbsT_0 - AbsT_x}{AbsT_0} \times 100$$

15 where,

16 D% = decolourisation percentage;

17 AbsT<sub>0</sub>= initial absorbance;

18 AbsT<sub>x</sub> = Absorbance at considered time.

19

## 20 Results and discussion

21 The experimental design was used to evaluate the main effects and interactions of the three chosen factors  
 22 (temperature, yeast extract concentration and pH) acting on the response factor, the rate of decolorization of textile  
 23 effluent. After completion of the experimental design, it was found that among the 26 experiments, only three  
 24 showed over 70% decolorization in the end of the eighth day of the experiment. Belonging to *T. atroviride* URM

1 4950 (test 6 to 71.36%) and two belonging to *T. atroviride* URM 3735 (tests 18 and 19 to 73.52 and 72.29%,  
 2 respectively). And the best conditions to achieve the level maximum decolorization of textile effluent by these  
 3 species was temperature 25 °C, concentration of yeast extract, 0.5 g.L<sup>-1</sup> and pH 7.0 for *T. atroviride* URM 4950  
 4 and 25 and 35 °C, concentration of yeast extract, 0.5 g.L<sup>-1</sup> and pH 7.0 for *T. atroviride* URM 3735 (Table 4).  
 5 Miranda et al. (2012) In a study of optimization parameters (pH, yeast extract concentration, agitation and copper  
 6 sulphate concentration), for biological treatment (by fungi) of textile laundry effluent in Caruaru - Pernambuco,  
 7 observed that among the 27 experiments carried out, 19 presented 99% decolorization of textile effluent on tenth  
 8 day of incubation.  
 9 Murugesan et al. (2007) optimizing of Reactive Black 5 decolorization by laccase produced by *Pleurotus sajor-*  
 10 *caju*, using the response surface methodology, found that optimal concentration of dye, enzyme and HBT (1-  
 11 hydroxybenzotriazole) and the best time to discolor the dye were 62.5 mg.L<sup>-1</sup>, 2.5 U.mL<sup>-1</sup>, 1.5 mM and 36 h,  
 12 respectively.

13

14 **Table 4** Experimental design and response to decolorization of textile effluent by *Trichoderma atroviride* URM  
 15 4950 and URM 3735

16

Strain number (URM)	Assay	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response
		A: Temperature (°C)	B: Concentration (g.L <sup>-1</sup> )	C: pH	Decolorization (%)
4950	1	25	0.5	5	42.40
4950	2	35	0.5	5	25.15
4950	3	25	1.5	5	52.78
4950	4	35	1.5	5	27.16
4950	5	25	0.5	7	66.01
4950	6	35	0.5	7	71.36
4950	7	25	1.5	7	25.77
4950	8	35	1.5	7	18.85
4950	9	30	1.0	6	15.63
4950	10	30	1.0	6	31.57
4950	11	30	1.0	6	19.18

4950	12	30	1.0	6	38.39
4950	13	30	1.0	6	29.26
3735	14	25	0.5	5	49.61
3735	15	35	0.5	5	41.75
3735	16	25	1.5	5	56.42
3735	17	35	1.5	5	35.14
3735	18	25	0.5	7	73.52
3735	19	35	0.5	7	72.29
3735	20	25	1.5	7	34.90
3735	21	35	1.5	7	26.85
3735	22	30	1.0	6	28.48
3735	23	30	1.0	6	31.11
3735	24	30	1.0	6	33.90
3735	25	30	1.0	6	12.22
3735	26	30	1.0	6	33.59

1

2 The Pareto chart shows the absolute values factors that are important in this study (Figure 1 and 2). In tests with  
3 *T. atroviride* URM 4950 e URM 3735, the concentration of yeast extract (negative effect) and the combination of  
4 the concentration of yeast extract and pH (negative effect) were the most influential factors for the removal of  
5 color from the textile effluent (Figure 1 and 2). Bonugli-Santos et al. (2016) in study of biotechnological potential  
6 of fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 derived from sea, investigated the influence of 12 independent factors on  
7 degradation of Reactive Black 5, using the experimental design, and observed that the factors with the greatest  
8 impact were peptone, yeast extract, dye concentration, and CuSO<sub>4</sub>, all with negative effect.

9

10

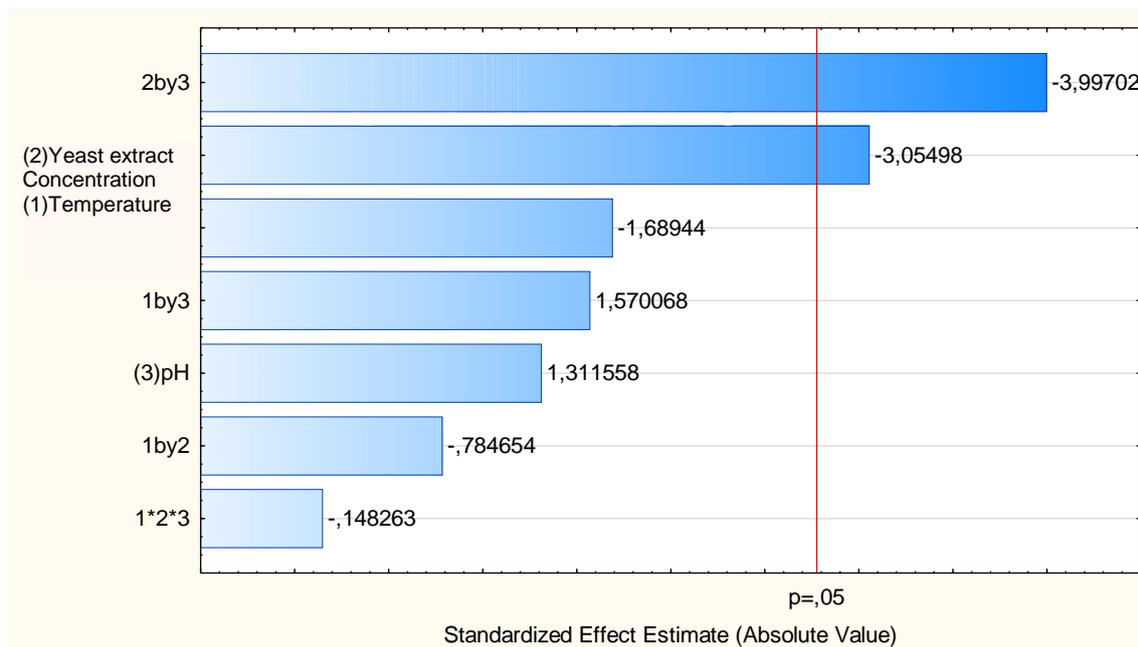
11

12

13

14

- 1 **Figure 1** Pareto chart in the bleaching process of textile effluent by the fungus *Trichoderma atroviride* URM 4950;  
 2 (1) Temperature, (2) Yeast Extract Concentration and (3) pH; MS Pure Error =.0086491



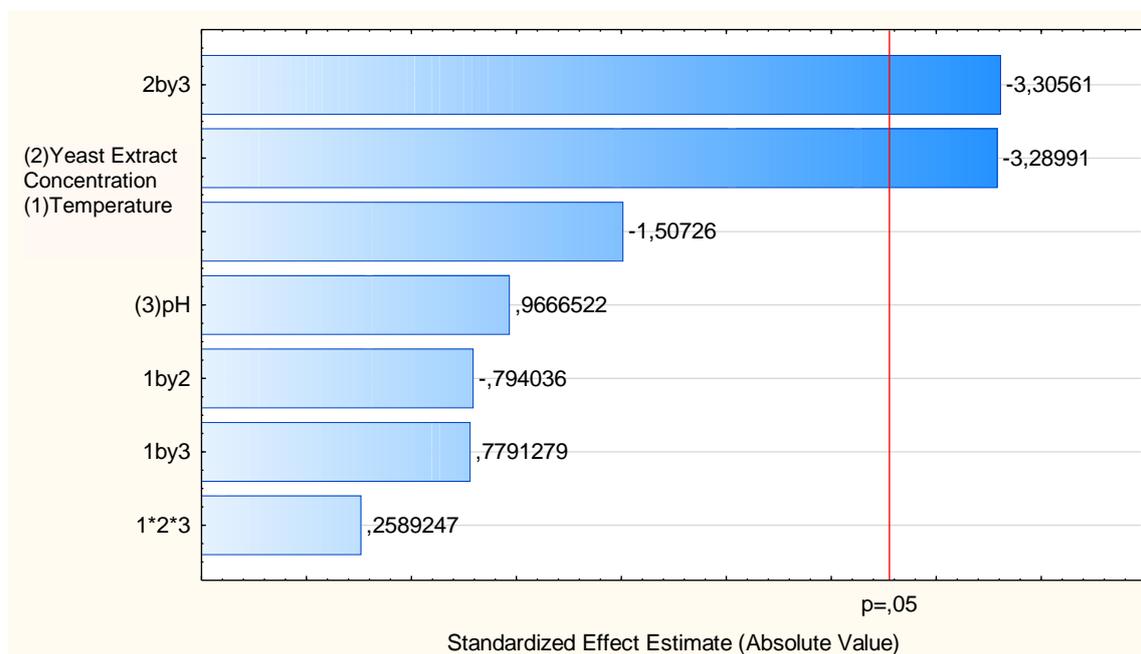
3  
4

5 Although has a negative effect on the decolorization process, temperature factor not present significant statistical  
 6 significance, which suggests that *T. atroviride* URM 4950 and URM 3735 can be tested at a lower temperature  
 7 without negatively influencing decolorization, thus suggesting the temperature of 25 °C to perform the process  
 8 (Figure 8 and 9). Miranda et al. (2012) analyzed in Pareto chart the decolorization of textile effluent by *P.*  
 9 *chryso sporum* CCT 1999 and found that the four factors studied (pH, concentration of yeast extract, agitation and  
 10 copper sulphate concentration) significantly influenced the removal of Color of the textile effluent.

11 The application of statistical techniques of experimental design in process of decolorization can result in better  
 12 removal, less variability, besides the reduction of time and costs without development of the process (Srinivasan  
 13 and Murthy, 2009).

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

- 1 **Figure 2** Pareto chart in the bleaching process of textile effluent by the fungus *Trichoderma atroviride* URM 3735;  
 2 (1) Temperature, (2) Yeast Extract Concentration and (3) pH; MS Pure Error =,0081218



3

4

## 5 Conclusions

6 In the present study, the statistical design was used to optimize the decolorization of the textile effluent by  
 7 *T. atroviride* URM 4950 and URM 3735, resulting in an excellent rate of decolorization and effluent at 25 and 35  
 8 °C, concentration of yeast extract, 0.5 g.L<sup>-1</sup> and pH 7.0. Thus, *T. atroviride* URM 4950 and URM 3735 had great  
 9 potential for the practical application in the field of environmental biotechnology such as biodegradation of  
 10 different industrial dyes and textile effluents.

## 11 Acknowledgment

12 Authors are greatfull to Universidade Federal de Pernambuco and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia  
 13 do Estado de Pernambuco (FACEPE), Brazil. Cledir Santos thanks to the DIUFRO, Universidad de La Frontera,  
 14 Temuco, Chile, for the internal support to the current external funded project.

15

## 16 References

17 Bonugli-Santos, RC, Vieira, GAL, Collins, C, Fernandes, TCC, Morales, MAM, Murray, P, Sette, LD (2016)  
 18 Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using  
 19 integrated statistical design. Environ Sci Pollut Res 23: 8659-8668

- 1 Chanda A, Gummadidala PM, Gomaa OM (2016) Mycoremediation with mycotoxin producers: a critical  
2 perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:17-29
- 3 Gajera HP, Bambharolia RP, Hirpara DG, Patel SV, Golakiya BA (2015) Molecular identification and  
4 characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decolourisation and biodegradation of  
5 textile dyeeffluents. *Process Saf Environ* 98:406-416
- 6 Khambhatya Y, Anantha S, Sreeramb KJ, Raob JR, Nairba BU (2015) Dual utility of a novel, copper enhanced  
7 laccase from *Trichoderma aureoviridae*. *Int J Biol Macromol* 81:69-75
- 8 Maji D, Singh M, Wasnik K, Chanotiya CS, Kalra A (2015) The role of a novel fungal strain *Trichoderma*  
9 *atroviride* RVF3 in improving humic acid content in mature compost and vermicompost via ligninolytic and  
10 celluloxylanolytic activities. *J Appl Microbiol* 119:1584-1596
- 11 Miranda RCM, Gomes EB, Gouveia ER, Machado KMG, Gusmão NB (2012) Decolorization of laundry effluent  
12 by filamentous fungi. *Afr J Biotechnol* 11:4216-4224
- 13 Miranda RCM, Gomes EB, Pereira Jr. N, Marin-Morales MA, Machado KMG, Gusmão NB (2013) Treatment of  
14 textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM  
15 6181. *Bioresour Technol* 142:361-367
- 16 Mohana S, Shrivastava S, Divecha J, Madamwar D (2008) Response surface methodology for optimization of  
17 medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresour Technol*  
18 99:562-569
- 19 Murugesan K, Dhamija A, Nam IH, Kim YM, Chang YS (2007) Decolourization of reactive black 5 by laccase:  
20 Optimization by response surface methodology. *Dyes and Pigments* 75:176-184
- 21 Perovano Filho N, Silva KFS, López AMQ (2011) Biosorption of an Azo Dye by *Aspergillus niger* and  
22 *Trichoderma* sp. *Fungal Biomasses. Acta Sci Biol Sci* 33:427-435
- 23 Sivasamy A, Sundarabal N (2011) Biosorption of an Azo Dye by *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. *Fungal*  
24 *Biomasses. Curr Microbiol* 62:351-357
- 25 Srinivasan SV, Murthy DVS (2009) Statistical optimization for decolorization of textile dyes using *Trametes*  
26 *versicolor*. *J Hazard Mater* 165:909-914
- 27 Tan L, He M, Song L, Fu X, Shi S (2016) Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by  
28 a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. *Bioresour Technol* 203:287-294
- 29 Zafra G, Cortés-Espinosa DV (2015) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma*  
30 species: a mini review. *Environ Sci Pollut Res* 22:19426-19433