

**Armando Duarte, Teresa Rocha Saiz, Alexandre Panteleitchouk e Ricardo Prego (eds.) 2002.**  
*Ecotoxicologia e remoção de poluentes: Estudos na Península Ibérica.* Lisboa: Instituto Piaget.

**ECOTOXICOLOGIA  
E REMOÇÃO  
DE POLUENTES  
ESTUDOS  
NA PENÍNSULA  
IBÉRICA**

***Tratamento biológico de efluentes têxteis  
simulados com corantes azo reactivos  
bioacessíveis a fungos lenhicolíticos***

**M. A. M. MARTINS  
N. LIMA  
& M. J. QUEIROZ**

# Tratamento biológico de efluentes têxteis simulados com corantes azo reactivos bioacessíveis a fungos lenhícolíticos

M. A. M. MARTINS<sup>a</sup>  
N. LIMA<sup>a</sup>  
& M. J. QUEIROZ<sup>a</sup>

**Resumo.** – Os corantes azo derivados do azobenzeno são compostos xenobióticos recalcitrantes, principalmente devido às anilinas carcinogénicas e/ou mutagénicas a que podem dar origem por redução. Alguns fungos lenhícolíticos como *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* demonstraram capacidades de biodegradação deste tipo de compostos, através de mecanismos oxidativos, evitando a formação de anilinas e conduzindo à mineralização total. Neste trabalho simularam-se diferentes efluentes têxteis utilizando 4 ou 8 corantes azo reactivos de aplicação têxtil, que foram sintetizados por diazotação de ácidos aminobenzóicos ou aminosulfónicos, seguida de acoplamento com componentes fenólicas, guaiacol ou siringol, presentes na estrutura da lenhina. Estes grupos são considerados pontos de acesso para o sistema enzimático lenhícolítico destes fungos. Procedeu-se a estudos comparativos de biodegradação utilizando as duas espécies referidas. A extensão da biodegradação foi avaliada estudando três parâmetros ao longo do tempo de incubação: decréscimo da intensidade do  $\lambda_{\max}$  apresentado pela mistura de corantes no  $t_0$  do ensaio (UV-Visível); decréscimo da concentração de sacarose (fonte de C primária); e aumento da biomassa. A constituição do efluente simulado com 4 corantes teve como base estudos preliminares em que se determinou a relação estrutura do corante/extensão da biodegradação. Quando se utilizou o fungo *T. versicolor* ou se adicionou ao meio de cultura de *P. chrysosporium* sobrenadante de um ensaio usando a primeira espécie, atingiram-se percentagens de biodegradação mais elevadas. Diferenças existentes na produção de enzimas extracelulares destes dois fungos poderão explicar a obtenção destes resultados.

**Abstract.** – BIOLOGICAL TREATMENT OF SIMULATED TEXTILE EFFLUENTS CONTAINING BIOACCESSIBLE REACTIVE AZO DYES TO LIGNINOLYTIC FUNGI. Azo dyes are recalcitrant xenobiotic compounds, namely due to the formation of carcinogenic and/or mutagenic anilines by reductive cleavage. Some ligninolytic fungi such as *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* showed the capacity of biodegradation and even mineralization of this compounds through their oxidative mechanisms, avoiding the anilines formation. In this work different textile effluents were simulated using 4 or 8 reactive azo dyes, synthesized by diazotation of aminobenzoic or aminosulphonic acids,

and coupled with phenolic components, guaiacol or syringol, present in the structure of lignin. These groups are access points to the ligninolytic enzymatic system of these fungi. Comparative studies of biodegradation of the two mentioned species were performed. The extension of biodegradation was determined, during the incubation time, through: the decrease of the absorption intensity at  $\lambda_{\max}$  presented by the mixture of dyes at  $t_0$  (UV-Vis), the decrease of sucrose concentration and the increase of biomass. The higher percentages of biodegradation were obtained using *T. versicolor* or adding the supernatant of an assay using this species to the liquid culture medium of *P. chrysosporium*. The differences in the extracellular enzymes production by these two fungi could be an explanation of the results obtained.

## INTRODUÇÃO

Os corantes azo são extensivamente utilizados nas indústrias de tinturaria têxtil mas tal como muitos outros corantes sintéticos são compostos xenobióticos recalcitrantes, o que dificulta o tratamento biológico usual dos efluentes têxteis (Swamy e Ramsay, 1999). O impacto ambiental por eles causado advém da sua toxicidade e principalmente devido à formação de anilinas, aminas aromáticas, consideradas carcinogénicas e/ou mutagénicas, originadas pela quebra redutiva da ligação azo (N=N) que, normalmente, ocorre em condições de anaerobiose (Stolz, 2001; Chung e Stevens, 1993; Gottschalk e Knackmuss, 1993).

Alguns fungos filamentosos, como os fungos da podridão-branca da madeira, são capazes de degradar diversos compostos sintéticos recalcitrantes (Field *et al.*, 1993; Knapp *et al.*, 1995). Os fungos da podridão-branca, para além de degradarem a celulose, têm a capacidade de degradar a lenhina, polímero estrutural das plantas lenhosas, formando um visível resíduo fibroso branco na madeira, de onde advém a sua designação. Apesar de ser evidente o seu potencial biotecnológico, ainda é reduzido o número de aplicações industriais fazendo uso destes fungos (Burdall Jr., 1998). *Phanerochaete chrysosporium* é o fungo lenhícolítico melhor caracterizado, até em termos de aplicação a nível industrial. Esta espécie demonstrou a capacidade de biodegradar diversos corantes através dos seus mecanismos oxidativos, evitando a formação de anilinas e conduzindo à sua mineralização (Paszczynski *et al.*, 1991; Spadaro *et al.*, 1992; Zhou e Zimmermann, 1993).

A maioria dos trabalhos publicados refere-se à degradação de compostos aromáticos isolados e apenas em alguns casos foram efectuados estudos de biodegradação da mistura de compostos tal como se apresentam nos efluentes industriais (Arvin *et al.*, 1991; Rochkind *et al.*, 1986). Galeno e Agosin (1990) testaram a capacidade de descoloração de efluentes da pasta do papel, por diversos fungos da podridão branca. Atendendo à capacidade destes fungos de degradar a lenhina, tem-se considerado a possibilidade de utilizar este tipo de microrganismos em termos de estratégias de biorremediação e de mineralização de uma grande diversidade de poluentes ambientais persistentes ou tóxicos (Barr e Aust, 1994). Kirby *et al.* (1995) apresentaram resultados

da rápida descoloração de um efluente têxtil industrial simulado com diferentes corantes por acção de *P. chrysosporium*. Este fungo apresenta um sistema enzimático lenhínolítico cujas peroxidases lenhínolíticas produzidas têm sido implicadas na descoloração e degradação de muitos corantes (Spadaro *et al.*, 1992; Ollikka *et al.*, 1993). Os resultados promissores obtidos com este fungo levaram à investigação das potencialidades de outras espécies, nomeadamente do género *Trametes*, cuja produção de lacase também foi relacionada com a degradação da lenhina e de corantes (Abadulla *et al.*, 2000; Thurston, 1994).

A biodegradação deste tipo de corantes de aplicação têxtil é influenciada pelas condições do meio de cultura (Spadaro *et al.*, 1992) e pela posição e natureza dos grupos substituintes (Pasty-Grigsby *et al.*, 1992, Paszczynski *et al.*, 1992).

No âmbito deste trabalho, sintetizaram-se corantes *azo* (Martins *et al.*, 2001) com grupos bioacessíveis, 2-metoxifenol (guaiacol) e 2,6-dimetoxifenol (siringol), aos fungos em estudo, *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, com o objectivo de aumentar a extensão da biodegradação, já que esses grupos estão presentes na estrutura da lenhina e têm sido referidos como pontos de acesso para o sistema enzimático lenhínolítico destes fungos (Gottschalk e Knackmuss, 1993; Paszczynski *et al.*, 1991; Spadaro *et al.*, 1992). Os resultados obtidos permitiram estabelecer possíveis condições de optimização do processo de descoloração de efluentes têxteis simulados com estes corantes reactivos bioacessíveis de aplicação têxtil, comparando as potencialidades de biodegradação das duas espécies de fungos referidas. Os níveis elevados de descoloração dos efluentes simulados mostraram que estes microrganismos podem ser adaptados para remover de forma eficaz misturas de corantes *azo*, possíveis contaminantes em efluentes industriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### CORANTES AZO

Os 8 corantes *azo* reactivos utilizados neste trabalho (figura 1) foram sintetizados por diazotação de ácidos *meta* ou *para* aminobenzóicos ou aminossulfónicos, as componentes diazo, seguida de acoplamento com 2-metoxifenol (guaiacol) ou 2,6-dimetoxifenol (siringol), como componentes de acoplamento (Martins *et al.*, 2001).

A nomenclatura apresentada em que se indica a componente diazo → componente de acoplamento é usada em química têxtil, para sugerir o processo de síntese. As siglas utilizadas traduzem o tipo de ácido (Sulfónico – S ou Carboxílico – C) a sua posição em relação à ligação *azo* (*meta* – *m* ou *para* – *p*) e também a componente de acoplamento (guaiacol – *g* e siringol – *s*).

## MICROORGANISMOS

As estirpes de fungos da podridão-branca, *Phanerochaete chrysosporium* Burds. (Burdall & Eslyn 1974) MUM 95.01 (= ATCC 24725) e *Trametes versicolor* (= *Coriolus versicolor*) Link Frenz (Quelef) MUM 94.04 (= LCP 85.3524), utilizadas nos ensaios de biodegradação, fazem parte da coleção de culturas da Micoteca da Universidade do Minho (MUM). As culturas foram mantidas a 4 °C em meio de TWAcelulose, com repicagens periódicas.

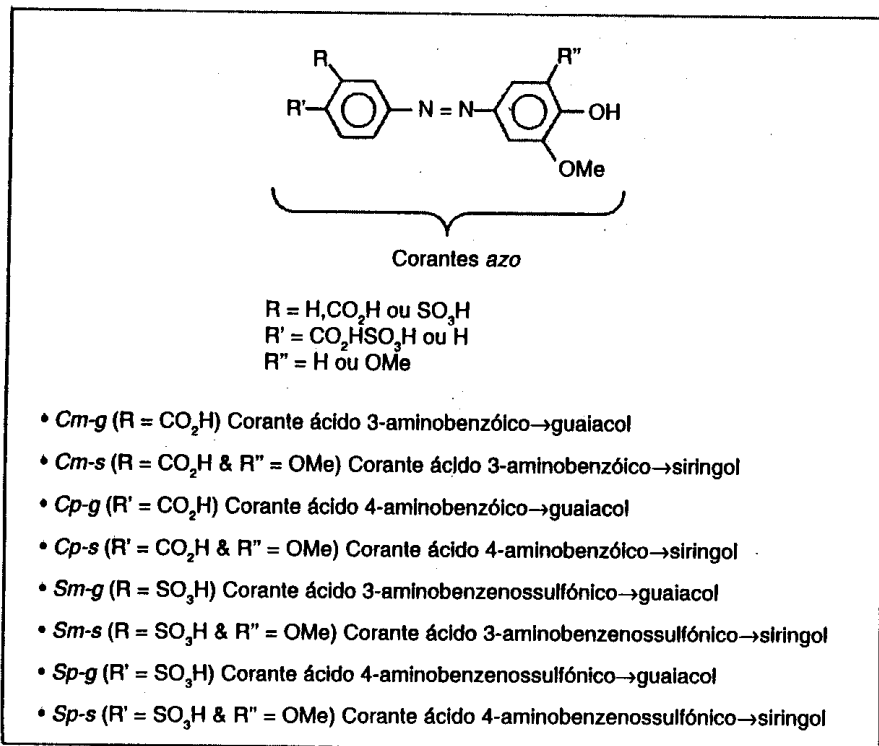


FIGURA 1 – Estrutura geral dos corantes azo estudados.

FIGURE 1 – General structure of the synthesized azo dyes.

The siglas used refer the kind of acid (Carboxylic – C or Sulphonic – S) its relative position to the azo bond (meta – m or para – p) and also the coupling component (guaiacol – g or syringol – s).

## MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura líquido, meio-CL (sacarose 5 g L<sup>-1</sup>, sulfato de amónio 0.5 g L<sup>-1</sup>, meio mineral base YNB – «yeast nitrogen base» sem aminoácidos nem sulfato de

amónio 1,7 g L<sup>-1</sup>, L-asparagina 1 g L<sup>-1</sup> e um dos corantes *azo* sintetizados 50 mg L<sup>-1</sup>) foi utilizado nos ensaios. O pH final foi de 4,5. As soluções-mãe dos corantes (100×), de YNB (10×) e de L-asparagina (10×) foram esterilizadas por filtração através de membranas de porosidade 0,45 mm. O meio-CL, contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de uma mistura de quatro (*Sm-s*, *Cm-s*, *Cp-s*, *Cm-g*) ou dos oito corantes em concentrações similares, foi utilizado na simulação de efluentes têxteis, permitindo o estabelecimento de estudos comparativos de descoloração. O meio sólido utilizado como fonte de inóculo para as experiências foi o meio de pré-adaptação, meio-PA (meio-CL com *Cm-s* 50 mg L<sup>-1</sup> e solidificado com agar 15 g L<sup>-1</sup>). TWAcélulose – Tape Water Agar (agar 15 g L<sup>-1</sup> em água, com uma tira de papel de celulose) foi utilizado como um meio de indução do sistema enzimático dos fungos em estudo.

### CONDIÇÕES DE CULTURA

Da periferia das colónias dos fungos em estudo, com 7 dias de incubação a 30°C em meio de TWAcélulose, com um fura-rolhas foi retirado um cilindro de 8 mm de diâmetro para inocular o centro de uma placa de cultura de meio-PA. Desta última placa saíram os inóculos para os ensaios em meio-CL. Nos ensaios, utilizaram-se Erlenmeyers de 250, 500 ou 1000 ml com 100, 200 ou 400 ml de meio-CL contendo, respectivamente, um, quatro ou oito corantes *azo* e foram inoculados, respectivamente, com cinco, dez ou vinte cilindros. As experiências de biodegradação dos corantes foram efectuadas em meio nutritivo de sacarose e com fonte de azoto limitada, em culturas líquidas agitadas, a 150 rpm, numa incubadora orbital Certomat a 30°C. Recolheram-se amostras ao fim de 1, 3, 5 e 7 dias de incubação, com o objectivo de determinar a concentração da biomassa, do corante e de sacarose. Os controlos decorreram sob as mesmas condições mas sem corantes ou inóculo.

### CONCENTRAÇÃO DOS CORANTES, DA BIOMASSA E DA SACAROSE

A concentração dos corantes foi determinada, ao longo do tempo, por espectroscopia de UV-visível pelo decréscimo da intensidade da banda de absorção no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) do corante ou grupo de corantes, fazendo sempre o varrimento entre 250 e 500 nm, utilizando um espectrofotómetro UV-Vis Jasco 7850. Estabeleceu-se que o valor da absorvância do meio-CL obtido com a concentração inicial do corante(s) correspondia a 100 por cento. Os espectros de absorção destes corantes dependem do valor de pH. Atendendo a isso, prepararam-se soluções tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio (Dawson *et al.*, 1986) de diferentes valores de pH (3,0 a 6,4) para seleccionar o valor de pH óptimo ao qual a intensidade de absorção no  $\lambda_{\max}$  é mais elevada (pH = 4,4). Os

espectros foram obtidos a partir de 1 ml das amostras do sobrenadante diluído em 2,5 ml da solução tampão adequada.

A concentração da biomassa foi determinada através do peso seco após filtração por membranas de porosidade 0,45 mm previamente pesadas, e colocadas na estufa a 105°C até se obter peso constante.

A concentração de sacarose foi determinada por um método colorimétrico, utilizando-se o Kit/teste Sacarose/D-glucose da Boehringer Mannheim (cat. N.º 139041), registrando-se os valores de absorvância a 340 nm. Este *kit* foi utilizado seguindo as recomendações do produtor com as seguintes modificações: i) o branco da amostra de sacarose contém a solução da amostra mas sem a suspensão enzimática do respectivo *kit*; ii) foi posto em prática um procedimento miniaturizado utilizando uma microplaca de 96 poços de 300 µl num espectrofotómetro ELISA – SLT Spectra; iii) para obter o valor da concentração de sacarose, foi previamente traçada a respectiva curva de calibração utilizando o mesmo açúcar. Estabeleceu-se que a concentração inicial de sacarose no meio-CL correspondia a 100 por cento.

## RESULTADOS

Em estudos preliminares estabeleceram-se condições experimentais optimizadas relativamente ao meio de pré-adaptação e foi possível estabelecer algumas correlações entre a estrutura química dos corantes e a sua biodegradação por *P. chrysosporium*. Cm-s foi seleccionado para ser utilizado no meio-PA dado que foi um dos 8 corantes que permitiu observar um nítida descoloração deste meio e o que apresentou as maiores percentagens de biodegradação no meio-CL, independentemente da pré-adaptação a que tinha sido sujeito o fungo. Ao utilizar-se este meio-PA, obtiveram-se percentagens de descoloração elevadas do meio-CL, contendo cada um dos corantes testados, tanto usando *P. chrysosporium* como *T. versicolor*. Decidiu-se, assim, estudar a degradação da mistura destes 8 corantes simulando um efluente. Para ambas as espécies, observou-se a descoloração do efluente, simulado pelo decréscimo da intensidade da banda de absorção no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{max}$ ) apresentado pela mistura dos corantes (figura 2).

O aumento da biomassa, mais ou menos acentuado, acompanhou o desaparecimento da sacarose e a descoloração do efluente simulado ao longo do tempo de incubação (figura 3).

Tal como se tinha observado no meio-CL com cada um dos corantes, *T. versicolor* foi capaz de descolorar o efluente simulado mais eficazmente do que *P. chrysosporium* tendo produzido menos biomassa (fig. 4).

Na tentativa de explicar as diferenças registadas entre as duas espécies, colòcaram-se diferentes hipóteses que foram testadas, com o intuito de aumentar a percenta-



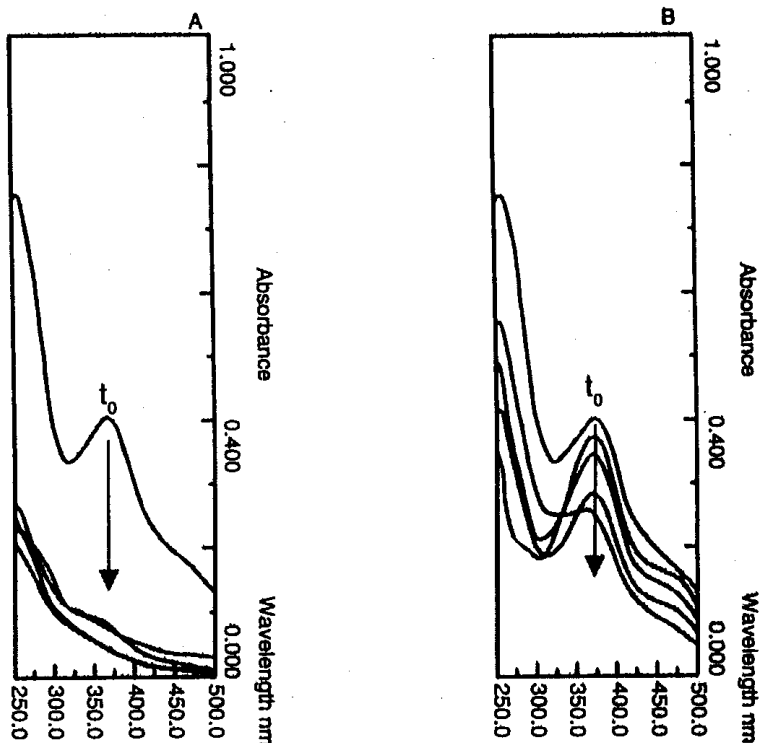


FIGURA 2 – Espectros de UV-vis relativos à descoloração do efluente simulado, por *T. versicolor* (A) e por *P. chrysosporium* (B), ao longo dos tempos de amostragem (1, 3, 5, 7 dias) a partir do tempo zero. A seta indica o decréscimo da intensidade de absorção no  $\lambda_{max}$  da mistura dos 8 corantes que constituíam o efluente.

FIGURE 2 – UV-vis spectra of decolourisation of the simulated effluent by *T. versicolor* (A) or *P. chrysosporium* (B) during the time course of assay (1, 3, 5 and 7 days). The arrows indicate the direction of spectrum change.

gem de biodegradação por *P. chrysosporium*, dos corantes presentes no efluente têxtil simulado:

- i) atendendo à possível influência da pré-adaptação do fungo na biodegradação dos corantes, para o mesmo efluente simulado, foi utilizado o mesmo fungo mas pré-adaptado ao Sm-g. Este corante, de acordo com resultados obtidos em diversos ensaios de biodegradação por *P. chrysosporium*, não era tão fácil de degradar quanto o corante Cm-s, mas quando utilizado no meio-PA tinha permitido percentagens elevadas de biodegradação dos 8 corantes azo isolados (Martins *et al.*, 2001).

Verificou-se que, neste caso, as percentagens de descoloração do efluente foram mais elevadas usando *Sm-g* no meio-PA, tendo-se passado de 35 por cento para 89 por cento, ao fim de 7 dias (fig. 5).

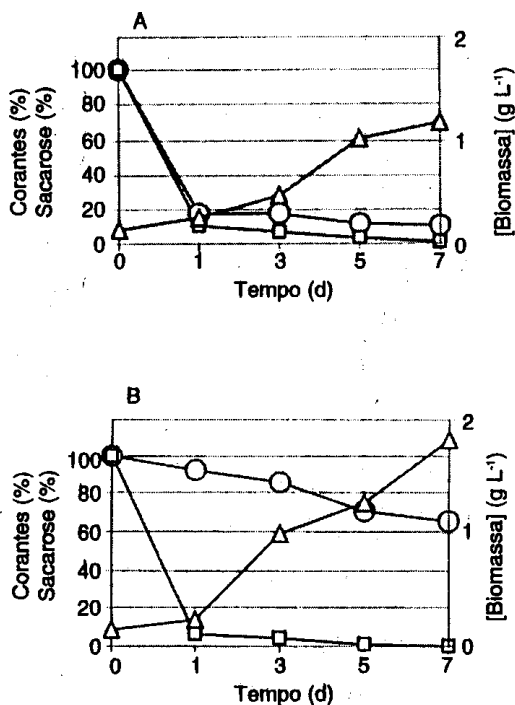


FIGURA 3 – Descoloração ao longo do tempo do efluente têxtil simulado com a mistura dos oito corantes azo (o), desaparecimento da sacarose (□) e aumento da biomassa (Δ) de *T. versicolor* (A) e de *P. chrysosporium* (B).

FIGURE 3 – Time courses of azo dyes (o), sucrose (□) and biomass (Δ) concentrations determined during the decolourisation assay of the simulated effluent by *T. versicolor* (A) or *P. chrysosporium* (B).

- ii) testando a importância da estrutura química dos corantes que se pretendiam degradar, utilizou-se o mesmo meio-PA inicial, com o corante *Cm-s* mas, foi simulado um novo efluente têxtil com um grupo seleccionado de 4 corantes. Estes corantes, com grupos substituintes ácidos na posição *meta* e o siringol como componente de acoplamento, individualmente apresentaram percentagens de descoloração mais elevadas/concentrações de biomassa mais reduzidas, tal como se pretendia obter no caso do efluente simulado,

Este efluente, relativamente ao constituído pelos oito corantes usando o mesmo meio-PA, mostrou um aumento da percentagem de descoloração de 35 por cento para 91 por cento (fig. 5).

- iii) atendendo a que se obtiveram melhores resultados de biodegradação com *T. versicolor*, decidiu-se testar também a influência de possíveis diferenças no sistema enzimático das duas espécies. Neste caso, nos ensaios de descoloração por *P. chrysosporium* utilizando o mesmo meio-PA com *Cm-s* e o mesmo efluente com quatro corantes, foi adicionado 0,5 ml de sobrenadante do meio-CL contendo as enzimas extracelulares produzidas num ensaio de biodegradação do corante *Cp-g* por *T. versicolor*.

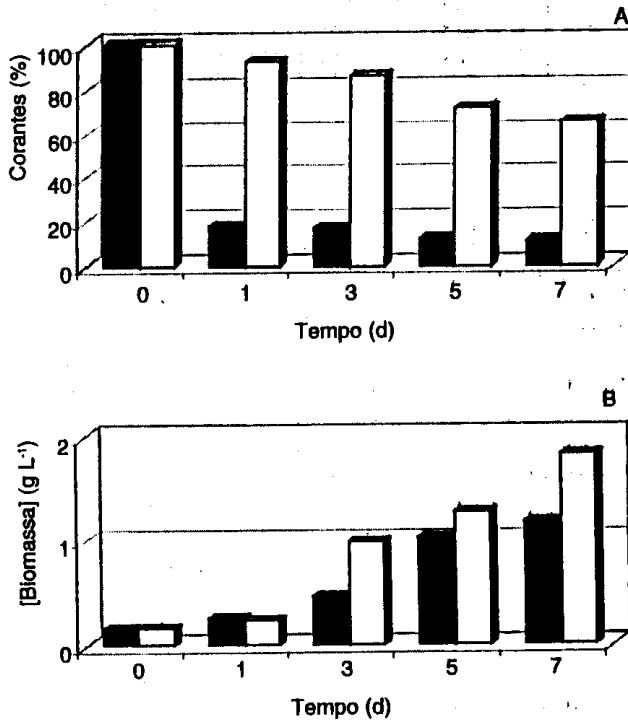
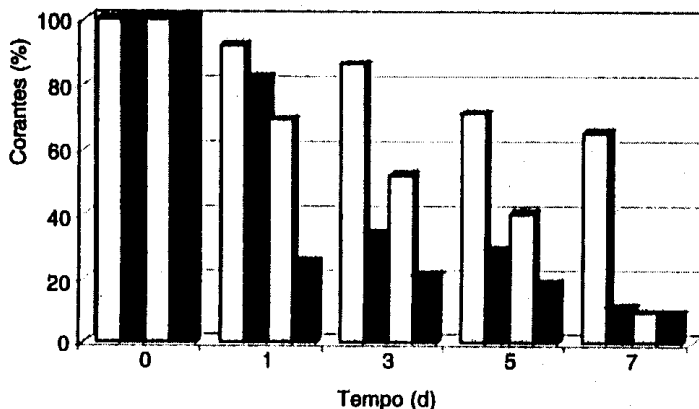


FIGURA 4 – Comparação da descoloração do efluente têxtil simulado usando a mistura dos oito corantes azo (A) e a biomassa produzida (B) entre *T. versicolor* (■) e *P. chrysosporium* (□)

FIGURE 4 – Comparison of decolourisation profile of the simulated textile effluent using a mixture of the eight azo dyes (A) and the biomass produced (B) between *T. versicolor* (■) and *P. chrysosporium* (□)

Neste caso, a percentagem de descoloração do efluente logo no primeiro dia foi de 75 por cento tendo sido a maior percentagem de descoloração registada em todos os ensaios efectuados com *P. chrysosporium* (fig. 5).



**FIGURA 5 – Descoloração por *P. chrysosporium* de efluentes têxteis simulados: com a mistura dos oito corantes azo, utilizando o fungo adaptado a Cm-s (□) ou Sm-g (■); com a mistura de quatro corantes, utilizando o fungo adaptado a Cm-s (□) ou Sm-g (■); num ensaio nas mesmas condições do anterior, mas com adição de sobrenadante de um ensaio de descoloração por *T. versicolor* (■)**

**FIGURE 5 – Comparison of decolourisation profile of the simulated textile effluent by *P. chrysosporium*: containing the mixture of the eight azo dyes, using the fungus pre-adapted to Cm-s (□) or Sm-g (■); containing the mixture of the four dyes, using the fungus pre-adapted to Cm-s (□) or Sm-g (■); in the same conditions of assay but adding the supernatant of a decolourisation assay using *T. versicolor* (■)**

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são indicadores da biodegradação dos corantes, o que é corroborado pelo facto de:

- i) não se ter registado, ao longo do tempo, qualquer variação significativa da concentração dos corantes no controlo do efluente não inoculado;
- ii) não ter ocorrido uma variação significativa da concentração dos corantes devido, meramente, à formação de complexos de adsorção corante/microrganismo, verificando-se que a biomassa permaneceu incolor;

iii) ter sido registado o aumento da biomassa ao longo do decréscimo da concentração dos corantes, mesmo após o desaparecimento da sacarose do meio-CL (fig. 3).

De acordo com os resultados obtidos, algumas diferenças no sistema enzimático dos fungos utilizados neste trabalho poderão explicar os diferentes padrões de biodegradação e aumento da biomassa observados. As maiores percentagens de biodegradação dos corantes, isolados ou misturados simulando efluentes têxteis, obtidas com *T. versicolor* (fig. 4), podem ser explicadas, devido, possivelmente, à presença de lacase no meio-CL, uma enzima extracelular que não é produzida pela estirpe de *P. chrysosporium* (Podgornik *et al.*, 2001).

## CONCLUSÕES

Em termos de conclusão, são de referir as potencialidades destes fungos na decoloração de efluentes têxteis e a relação da estrutura química dos corantes/extensão da biodegradação. De acordo com Galeno e Agosin (1990) os resultados obtidos com *T. versicolor*, percentagens de biodegradação mais elevadas com menor produção de biomassa, mostram que esta espécie pode ser adequada para um tratamento de efluentes têxteis. Assim, aumenta o interesse em continuar este trabalho, de forma a aprofundar o conhecimento sobre as enzimas envolvidas e os metabolitos resultantes deste processo de biodegradação, numa tentativa de criar perspectivas vantajosas para as indústrias têxteis na utilização de corantes que possuam na sua estrutura grupos bioacessíveis, e para o tratamento de efluentes usando microrganismos que evitem a produção de anilinas, tão nefastas ao meio ambiente e à saúde pública.

*Agradecimentos.* – Os autores agradecem à Mestre Isabel C. Ferreira pela síntese dos corantes azo, à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pela bolsa de doutoramento Praxis XXI/BD/15878/98 de M. Adosinda M. Martins e o apoio por parte do Instituto de Biotecnologia e Química Fina (IBQF), da Universidade do Minho, Portugal.

## REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.-H.; CAVACO-PAULO, A.; & GÜBITZ, G. M. (2000). Decolourisation and detoxification of textile dyes with laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied Environmental Microbiology*, **66**: 3357-3362.
- ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A. T. & MORTENSEN, E. (1991). Microbial degradation of mixtures of aromatic compounds at low concentrations under aerobic conditions. In: *Organic micropollutants in the aquatic environment. Proceedings of the sixth European symposium* (G. Angeletti & A. Bjørseth, eds), pp. 174-183. Lisboa, Portugal.
- BARR, D. P. & AUST, S. D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science Technology*, **28**: 79A-87A.

- BURDSALL JR., H. H. (1998). Taxonomy of industrially important white rot fungi. In: *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry* (R. A. Young & M. Akhtar, eds), pp. 259-272. New York.
- CHUNG, K.-T. & STEVENS JR., E. (1993). Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental Toxicology Chemistry*, **12**: 2121-2132.
- DAWSON, R. M. C.; ELLIOTT, D. C.; ELLIOTT, W. H. & JONES, K. M. (1986). *Data for Biochemical Research*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford Science Publications, Clarendon Press, pp. 427.
- FIELD, J. A.; DE JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G. & DE BONT, J. A. M. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnology*, **11**: 44-49.
- GALENO, D. G. & AGOSIN, T. E. (1990). Screening of white rot fungi for efficient decolourisation of bleach pulp effluents. *Biotechnology Letters*, **12**: 869-872.
- GOTTSCHALK, G. & KNACKMUSS, H.-J. (1993). Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally by combination or by construction. *Angew. Chemistry Int. Ed. Engl.*, **32**: 1398-1408.
- KIRBY, N.; MC MULLAN, G. & MARCHANT, R. (1995). Decolourisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, **17**: 761-764.
- KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S. & REECE, L. P. (1995). Decolourisation of dyes by wood rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microbiology Technology*, **17**: 664-669.
- MARTINS, M. A. M.; FERREIRA, I. C., SANTOS, I. M., QUEIROZ, M. J. & LIMA, N. (2001). Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, **89**: 91-98.
- OLLIKKA, P.; ALHONMAKI, K.; LEPPANEN, V.-L.; GLUMOFF, I.R. & SUOMINEN, I. (1993). Decolorization of azo, triphenyl methane heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, **59**: 4010-4016.
- PASTY-GRIGSBY, M. B.; PASZCZYNSKI, A.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D. L. & CRAWFORD, R. L. (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, **58**: 3605-3613.
- PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M. B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D. L. & CRAWFORD, R. L. (1991). New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbiology Technology*, **13**: 378-384.
- PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M. B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, R. L. & CRAWFORD, D. L. (1992). Mineralization of sulfanated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied Environmental Microbiology*, **58**: 3598-3604.
- PODGORNIK, H.; STEGU, E.; ZIBERT, E.; & PERDIH, A. (2001). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* – an artefact caused by Mn(III)? *Letters Applied Microbiology*, **32**: 407-411.
- ROCHKIND, M. L.; BLACKBURN, J. W. & SAYLER, G. S. (1986). *Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds* (US Environmental Protection Agency, eds), Hazardous Waste Engineering, Cincinnati.
- SPADARO, J. T.; GOLD, M. H. & RENGANATHAN, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, **58**: 2397-2401.
- STOLZ, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology Biotechnology*, **56**: 69-80.
- SWAMY, J. & RAMSAY, J. A. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decolouration of textile dyes. *Enzyme Microbiology Technology*, **24**: 130-137.
- THURSTON, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, **140**: 19-26.
- ZHOU, W. & ZIMMERMANN, W. (1993). Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, **107**: 157-162.