BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans*

ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA

Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. **ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Lima, André Oliveira de Souza

Biodegradação da vinhaça de cana-de-açúcar por linhagens de *Aspergillus nidulans* / André Oliveira de Souza Lima. - - Piracicaba, 1996.
102 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
1997.
Bibliografia.

1. Aspergilo 2. Biodegradação 3. Cana-de-açúcar - Subproduto 3. Vinhaça I.
Título

CDD 664.118

**BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR
POR LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans***

ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA

Aprovada em: 31.01.1997

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

ESALQ/USP

Profa. Dra. Dejanira Franceschi de Angelis

IB/UNESP

Profa. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Orientadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais
Luiz e Jurema, aos meus irmãos
Álvaro, Ligia e Artur, e à Ângela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, às professoras Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner (ESALQ-USP) e Dra. Dejanira F. de Angelis (UNESP - Rio Claro), pela orientação e apoio prestados no decorrer da execução deste trabalho.

Agradeço também aos professores: Dr. João Lúcio de Azevedo (ESALQ-USP), Dr. Isaias O. Geraldi (ESALQ- USP), Dr. Marcílio Dias Silveira da Mota (UNESP-Botucatu), Dr. Choiti Kiyan (UNESP-Rio Claro) e à Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona (UNESP-Rio Claro) pelo auxílio.

E, por fim, gostaria de agradecer a todos os colegas que, de alguma forma, participaram da concretização deste trabalho. São eles: José A. Silva, Carlos Aguilar, Humberto Gomes, Wellington de Araújo, Walter Maccheroni, Leandro do Carmo, Marcelo Valim, Renata Pascon, Valdenilson José A. de Oliveira, Chirlei Glienke, Margaret, Amadeu Ribeiro, Nelson, Raulindo Gardingo, Gilda Muhlen, Cleide Martins, Mário A. Tomazi, Alexandre de Souza, Keila, Luís, Cristiane, Juan, Salete, Carlos, Carmem, Bete, Silvana, Léia, Fernando, Joelma Marcon, Gislaine, Izabel, Rogério, Angela Célis, Rainério Meireles, Fábio Freitas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Vinhaça.....	3
2.1.1. Produção.....	3
2.1.2. Constituição.....	4
2.1.3. Efeitos ambientais.....	5
2.1.4. Despoluição via tratamento físico-químico.....	6
2.1.5. Utilização biológica da vinhaça.....	6
2.2. Biodegradação da vinhaça via conversão em biomassa fúngica..	7
2.2.1. Organismos.....	7
2.2.1.1. Leveduras.....	7
2.2.1.2. Fungos filamentosos.....	8
2.2.1.3. Cultura mista.....	9
2.2.1.4. Microbiota natural da vinhaça.....	9
2.2.1.5. Seleção de fungos.....	10
2.2.2. Condições do cultivo.....	11
2.2.2.1. Sistemas de fermentação.....	11
2.2.2.2. Tratamento do meio.....	11
2.2.2.3. Aeração e agitação.....	12

2.2.2.4.	Suplementação do meio.....	12
2.2.2.5.	pH do meio.....	14
2.2.3.	Dinâmica e eficiência do processo.....	15
2.2.3.1.	Consumo do meio.....	15
2.2.3.2.	Cinética do Crescimento.....	15
2.2.3.3.	Rendimento.....	16
2.3.	Melhoramento genético de espécies de <i>Aspergillus</i> de interesse industrial.....	18
2.3.1.	Melhoramento via diplóides e heterocários.....	18
2.3.2.	Melhoramento via segregantes recombinantes.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1.	Material.....	22
3.1.1	Linhagens.....	22
3.1.2.	Meios de cultura.....	25
3.1.2.1.	Meio Mínimo (MM).....	25
3.1.2.2.	Meio Completo (MC).....	25
3.1.2.3.	Solução de vitaminas.....	25
3.1.2.4.	MM líquido com 2% de MC.....	26
3.1.2.5.	Meio mínimo acetato de amônio	26
3.1.2.6.	Meio mínimo galactose	26
3.1.2.7.	Suplementos adicionados ao MM.....	26
3.1.2.8.	Meios seletivos utilizados na caracterização genética.....	27
3.1.3.	Soluções.....	27
3.1.3.1.	Solução NPK.....	27
3.1.3.2.	Meio vinhaça.....	28
3.1.3.3.	Solução de leite 5%.....	28
3.1.3.4.	Solução salina.....	28
3.1.3.5.	Solução tween.....	28
3.1.3.6.	Solução benlate.....	28
3.1.3.7.	Solução de bicromato de potássio 0,25N.....	29
3.1.3.8.	Solução ácido sulfúrico + sulfato de prata.....	29
3.1.3.9.	Solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25N (SFA).....	29
3.1.3.10.	Solução indicadora ferroim.....	29
3.1.3.11.	Solução de sulfato de magnésio.....	29

3.1.3.12.	Solução de cloreto de cálcio.....	29
3.1.3.13.	Solução de cloreto férrico.....	29
3.1.3.14.	Solução tampão fosfato pH 7,2.....	30
3.1.3.15.	Solução de sulfato de manganês.....	30
3.1.3.16.	Solução alcalina de iodeto e azida.....	30
3.1.3.17.	Solução de tiosulfato de sódio 0,025N.....	30
3.1.3.18.	Solução indicadora de amido.....	30
3.1.4.	Vinhaça.....	31
3.1.5.	Melaço.....	31
3.2.	Métodos.....	31
3.2.1.	Esterilização.....	31
3.2.2.	Estocagem.....	31
3.2.3.	Crescimento em meio sólido.....	32
3.2.4.	Produção de biomassa em meio líquido vinhaça.....	32
3.2.5.	Obtenção e isolamento de linhagens diplóides.....	33
3.2.6.	Obtenção de segregantes haplóides.....	33
3.2.7.	Caracterização genética das linhagens.....	34
3.2.8.	Determinação do diâmetro dos conídios.....	34
3.2.9.	Viabilidade dos esporos.....	34
3.2.10.	Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	34
3.2.11.	Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅ a 20°C).....	36
3.2.12.	Caracterização morfológica.....	37
3.2.13.	Análise dos resultados.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1.	Padronização do meio de cultivo.....	38
4.1.1.	Vinhaça suplementada com melaço.....	38
4.1.2.	Vinhaça suplementada com solução NPK.....	40
4.2.	Biodegradação da vinhaça por espécies do gênero <i>Aspergillus</i> ..	43
4.2.1.	Crescimento em meio sólido vinhaça a diferentes temperaturas.	43
4.2.2.	Produção de biomassa seca em meio líquido vinhaça.....	45
4.2.3.	Redução da carga poluente da vinhaça.....	48
4.2.3.1.	Redução da DQO.....	48
4.2.3.2.	Redução da DBO ₅ a 20°C.....	50
4.3.	Obtenção de linhagens diplóides e segregantes.....	52

4.4.	Cinética do crescimento de linhagens de <i>A. nidulans</i> cultivadas em meio vinhaça.....	55
4.4.1.	Crescimento em meio sólido em função do tempo.....	56
4.4.2.	Produção de biomassa em meio líquido em função do tempo.....	58
4.4.3.	Viabilidade dos esporos.....	61
4.5.	Avaliação de linhagens haplóides, diplóides e segregantes de <i>A. nidulans</i> em meio vinhaça.....	63
4.5.1.	Crescimento em meio sólido.....	63
4.5.2.	Produção de biomassa seca.....	65
4.5.3.	Redução da DQO.....	67
4.5.4.	Morfologia da colônia cultivada em meio vinhaça.....	71
4.5.5.	Caracterização genética das linhagens de <i>A. nidulans</i>	75
5.	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	APÊNDICE.....	87

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Representação parcial do mapa de ligação de *Aspergillus nidulans*, contendo as marcas genéticas utilizadas..... 24
- 2 Adição de melação à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM incubadas a 37°C. Resultados referentes aos valores médios de 10 repetições, em experimento inteiramente casualizado e subdividido no tempo (24 e 48 horas)..... 40
- 3 Adição da solução NPK à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM, incubadas a 37°C. Experimento I- os valores médios de 16 repetições em dois tempos de cultivo (43 e 67 horas), com delineamento inteiramente casualizado; para Experimento II: valores médios de 7 repetições incubadas por 68 horas, com delineamento inteiramente casualizado. As setas indicam o tamanho das colônias cultivadas no meio controle (6g NaNO₃ + 1,5g KH₂PO₄ + 0,5g KCl em 1 litro de vinhaça)..... 42
- 4 Efeito da temperatura (27, 32 e 37°C) de incubação no crescimento radial de espécies do gênero *Aspergillus*, cultivadas em meio vinhaça sólido. Os valores são médias de 6 repetições e de 2 leituras no tempo (35 e 70 horas), com o delineamento experimental inteiramente casualizado em fatorial (temperatura X espécies)..... 45

5	Produção de biomassa seca realizada por diferentes espécies do gênero <i>Aspergillus</i> , cultivadas por 38h em meio vinhaça a 32°C, 50mL de meio, agitação 120 rpm, inóculo $0,7 \times 10^7$ esporos. Valores médios de 3 repetições.....	46
6	Porcentagem de redução da poluição da vinhaça pelo cultivo de diferentes espécies do gênero <i>Aspergillus</i> . Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Em ambos experimentos os valores obtidos foram transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo. Para a DQO, os valores são médias referentes à digestão de 2 repetições por amostra composta e, para DBO ₅ , os valores são médias referentes à digestão de 4 repetições (2 por diluição) de cada amostra composta.....	51
7	Representação gráfica da filogenia das linhagens obtidas.....	53
8	Histograma da distribuição das linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> em função do diâmetro do conídio. Valores médios por conídio, obtidos a partir das leituras de 12 cadeias com 3 conídios cada, posteriormente transformados em μm	55
9	Cinética do crescimento radial de diferentes linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i> cultivadas em meio vinhaça a 37°C. Os resultados médios de 5 repetições foram ajustados pela regressão logística e o experimento teve delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo.....	58
10	Cinética da produção de biomassa seca por <i>Aspergillus nidulans</i> incubada em meio vinhaça. Cultivo em 100mL de meio, a 37°C, agitação 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos, por 60 horas com leituras a cada 12 horas. Os resultados médios (3 blocos) foram ajustados pela regressão logística e o experimento foi conduzido em blocos ao acaso.....	60

- 11** Porcentagem de viabilidade dos esporos de linhagens de *Aspergillus nidulans*, média de 3 experimentos. Valor obtido pela relação entre o número de esporos semeados e os que germinaram em MC..... 62
- 12** Gráfico de dispersão entre as variáveis produção de biomassa seca e redução da DQO realizadas por diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans*, cultivadas em 100mL de meio vinhaça, por 43 horas, a 37°C, agitação de 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos..... 69
- 13** Fotografia das colônias de *Aspergillus nidulans*, utilizadas como parentais e controle. Cultivo em meio vinhaça por 96 horas, a 37°C, sendo **A-** MSE, **B-** PPY, **C-** BM, **D-** VE..... 72
- 14** Fotografia das colônias diplóides de *Aspergillus nidulans*. Cultivo em meio vinhaça por 96 horas, a 37°C, sendo **A-** MSE//PPY, **B-** MSE//BM, **C-** PPY//BM..... 72
- 15** Fotografia das colônias recombinantes de *Aspergillus nidulans* obtidas. Cultivo em meio vinhaça por 96 horas, a 37°C, sendo **A-** Rec M//P 1; **B-** Rec M//P 2; **C-** Rec M//P 3; **D-** Rec M//P 4; **E-** Rec M//P 5; **F-** Rec M//P 7; **G-** Rec M//P 9; **H-** Rec M//P 10; **I-** Rec M//P 11; **J-** Rec M//P 12; **K-** Rec M//P 15; **L-** Rec M//P 16; **M-** Rec M//P 18; **N-** Rec M//P 19; **O-** Rec M//P 20; **P-** Rec P//B 4; **Q-** Rec P//B 6; **R-** Rec P//B 10; **S-** Rec M//B 4; **T-** Rec M//B 5; **U-** Rec M//B 6; **V-** Rec M//B 7..... 73~75

LISTA DE TABELAS

Página

- 1 Lista dos marcadores genéticos de *Aspergillus nidulans* contendo os respectivos grupos de ligação e fenótipo..... 23
- 2 Adição de melaço à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM incubadas a 37°C. Resultados médios referentes a 10 repetições. Experimento conduzido inteiramente casualizado e subdividido no tempo (24 e 48 horas)..... 39
- 3 Adição da solução NPK à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM incubadas a 37°C. Valores referentes ao diâmetro das colônias (cm), considerando para: experimento I- valores médios de 16 repetições com delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo (43 e 67 horas); experimento II- valores médios de 7 repetições com delineamento inteiramente casualizado e leitura após 68 horas de cultivo..... 41
- 4 Efeito da temperatura de incubação no crescimento radial de espécies do gênero *Aspergillus* cultivadas em meio vinhaça sólido. Os valores, expressos em centímetros, são os diâmetros médios de 6 repetições, com delineamento experimental inteiramente casualizado em fatorial (temperatura X espécies). Foram realizadas duas leituras no tempo, uma com 35 horas e outra com 70 horas..... 44

- 5 Produção de biomassa seca por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, cultivadas por 38h em meio vinhaça a 32°C, 50mL de meio, agitação 120 rpm e inóculo $0,7 \times 10^7$ esporos. Valores médios de 3 repetições..... 46
- 6 Teste de Tukey, considerando os valores obtidos com a produção de biomassa seca por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Experimento inteiramente casualizado, com 3 repetições e uma leitura no tempo (38h). As barras representam semelhança, à 5% de confiança, entre as médias dos tratamentos, e as letras **a**, **b** e **c** representam os grupos significativamente diferentes..... 47
- 7 Porcentagem de redução da DQO da vinhaça pelo cultivo de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Os valores são as médias referentes à digestão de 2 repetições por amostra composta, posteriormente transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo..... 49
- 8 Teste de Tukey, considerando os valores obtidos com a porcentagem de redução da DQO por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Os resultados analisados são referentes à digestão de 2 repetições por amostra composta e posterior transformação (porcentagem de redução) em função do meio isento de inóculo. As barras representam semelhança, à 5% de confiança, entre as médias dos tratamentos e as letras **a**, **b** e **c** representam os grupos significativamente diferentes..... 49

- 9 Porcentagem de redução da DBO (5dias, 20°C) da vinhaça pelo cultivo de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Os valores são as médias referentes à digestão de 4 repetições (2 por diluição) de cada amostra composta, posteriormente transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo..... 50
- 10 Diâmetro dos conídios das linhagens de *Aspergillus nidulans*, valores referentes ao diâmetro (μm) de um conídio, calculado a partir da média das leituras de 12 cadeias com 3 conídios cada..... 54
- 11 Diâmetro das colônias de *Aspergillus nidulans* em função do tempo de cultivo em meio vinhaça, a 37°C. Resultados médios em centímetros referentes a 5 repetições, com delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo (1 a 7 dias)..... 57
- 12 Produção de biomassa seca por *Aspergillus nidulans* em função do tempo de cultivo em meio líquido vinhaça. Cultivo em 100mL de meio, a 37°C, agitação 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos, por 60 horas com leituras a cada 12 horas. Resultados médios em gramas de biomassa seca por 100mL de meio, referentes a 3 repetições (blocos), de um experimento em fatorial com blocos ao acaso..... 59
- 13 Porcentagem de viabilidade dos esporos de linhagens de *Aspergillus nidulans*, média de 3 experimentos. Valor obtido pela relação entre o número de esporos semeados e os que germinaram em MC..... 62
- 14 Crescimento radial de linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio sólido vinhaça, a 37°C, sendo o diâmetro das colônias mensurado após 48 e 96 horas de incubação. Os resultados são expressos em centímetros e referentes à média de 3 repetições..... 64

- 15** Produção de biomassa seca por linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em 100mL de vinhaça, por 43 horas, a 37°C e agitadas a 150 rpm, sendo o inóculo de 9×10^6 esporos, em experimento conduzido em 4 blocos ao acaso. Os resultados são médias expressas em gramas de biomassa seca..... 66
- 16** Teste de Newman-Keuls aplicado aos dados obtidos no experimento de produção de biomassa seca por linhagens de *Aspergillus nidulans*, cultivadas em 100mL de meio vinhaça, por 43 horas, a 37°C, agitação 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos. Os grupos que variaram significativamente (5%) são representados por diferentes letras..... 67
- 17** Porcentagem de redução da DQO da vinhaça realizada por linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio vinhaça líquido, incubadas por 43 horas, a 37°C, inóculo 9×10^6 esporos e agitação de 150 rpm. Resultados referentes a 2 digestões por amostra mista (4 repetições), transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo..... 68
- 18** Morfologia das colônias de linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio vinhaça por 96 horas..... 71
- 19** Caracterização genética de diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans*. 76~77

RESUMO

BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR LINHAGENS DE *Aspergillus nidulans*

Autor: ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA

Orientadora: Profª. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

A vinhaça da cana de açúcar é um resíduo orgânico, formado durante a destilação do álcool. Atualmente no Brasil, sua produção é de 10¹¹ litros por ano e tem sido aplicada na lavoura como fertilizante. Desde a década dos 60, o emprego da vinhaça como substrato para o cultivo de microrganismos tem sido valorizado, pois permite, simultaneamente, a biodegradação da vinhaça e a conversão dela em biomassa (fonte de proteínas). Devido ao fato do gênero *Aspergillus* ter sido relatado como eficiente neste processo de fermentação, o presente trabalho objetivou avaliar o desempenho de linhagens diplóides e recombinantes de *A. nidulans* quanto à capacidade de converter a vinhaça, bem como biodegradá-la. Para isto, primeiramente foi padronizado o meio de cultivo em vinhaça suplementada com 2% de melaço. Em seguida, foi verificado, por análise comparativa, que *A. nidulans* era capaz de processar a vinhaça. Posteriormente, foram obtidas, linhagens diplóides e recombinantes de *A. nidulans*, feita sua avaliação quanto a capacidade de converter a vinhaça (biomassa seca), bem como biodegradá-la (redução da DQO), tendo sido verificado que estas são significativamente (1%) diferentes. Algumas linhagens diplóides e recombinantes foram superiores em relação a seus parentais originais. Por fim foi constatado, por ensaios de cultivo em meio vinhaça, que não há correlação entre o crescimento radial e a produção de biomassa e que a razão entre a biomassa produzida e a diminuição da carga poluidora é variável entre as linhagens.

SUMMARY

BIODEGRADATION OF SUGAR CANE VINASSE BY *Aspergillus nidulans* STRAINS

Author: ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA

Adviser: Profa. Dra. ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

Sugar cane vinasse is an organic waste formed during the alcohol distillation process. In Brazil, its production reaches 10^{11} liters per year and it has been applied as crop fertilizer. Since the 60's, the use of vinasse as substrate for growth of microorganisms is under evaluation, due to the simultaneous biodegradation of vinasse and its conversion into biomass (protein source). Considering that the genus *Aspergillus* has been related as efficient in this fermentation process, it was decided to evaluate in this research diploid and recombinant strains of *A. nidulans*. A growth media made of vinasse and 2% of molasse was standardized. Using this media, it was verified by comparative analysis that the *A. nidulans* is able to process vinasse as substrate for growth. Furthermore, diploid and recombinant strains of *A. nidulans* were obtained and evaluated by their capacity to convert (dry biomass) and biodegrade (DQO reduction) vinasse. These results showed significant differences between strains and some diploid and recombinant strains showed improved performance when compared to their parental strains. Finally, it was verified through growth assays using vinasse media that there is no correlation between the radial growth and biomass production, and that the ratio between biomass production and the pollution reduction is variable among the strains.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o álcool proveniente da cana de açúcar, é utilizado como combustível alternativo para automóveis. Dessa forma, a produção nacional, é considerada a maior mundialmente. Em 1996, somente na região centro-sul (ES, RJ, MG, GO, MT, MS, SP, RJ, PR, SC, RS) foram produzidos $1,2 \times 10^{10}$ litros, sendo 74% desse volume no estado de São Paulo¹. Entretanto, durante a fase final da destilação do álcool, ocorre a formação em larga escala de um subproduto chamado vinhaça ou vinhoto da cana de açúcar. Este é uma suspensão aquosa de matéria orgânica sólida e minerais contendo componentes do vinho não arrastados pela destilação, além de quantidades residuais de açúcar, álcool e componentes voláteis mais pesados (Medeiros, 1988).

Nos anos 60, foram desenvolvidas no Brasil, pesquisas objetivando, através de um tratamento microbiológico, conciliar a redução do potencial poluidor deste resíduo à conversão da energia nele contida, numa fonte de interesse econômico, como a proteína presente na biomassa microbiana.

Inicialmente, a produção de proteínas foi investigada em leveduras devido à prévia disponibilidade de padrões industriais. Posteriormente, fungos filamentosos foram valorizados quanto à facilidade de recuperação da massa celular, bem como em função da eficiência de adaptação à heterogeneidade da vinhaça. Dentre os organismos avaliados, algumas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. sulphureus*) foram eficientes no processo de conversão e biodegradação da vinhaça (Araújo *et al.*, 1977, 1978; De Lamo & Menezes, 1978; Venturini Filho & Camargo, 1987; Kiyan, 1988).

¹ FARHAT, M. Comunicação Pessoal, 1997.

O sistema de tratamento da vinhaça é baseado no crescimento microbiano, isto é, quanto maior a produção de biomassa, superior será a biodegradação do vinhoto, sendo esta proporção específica em relação ao organismo cultivado.

Considerando que a utilização de linhagens diplóides e recombinantes do gênero *Aspergillus* tem proporcionado bons resultados quanto à produção de ácido cítrico (Das & Roy, 1978; Kirimura *et al.*, 1988), celulasas (Ogawa *et al.*, 1993), proteases e glutaminases (Ushijima & Nakadai, 1987, 1990) etc. Decidiu-se por obter e avaliar a eficiência de conversão e biodegradação da vinhaça, por linhagens diplóides e recombinantes de *A. nidulans*. Esta espécie foi utilizada por possuir vários marcadores genéticos, o que facilita a obtenção das linhagens geneticamente modificadas.

Foram propostos como objetivos deste trabalho:

- determinar um meio de cultivo vinhaça padrão;
- avaliar a capacidade de *A. nidulans* em utilizar a vinhaça, através da análise comparativa com *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sulphureus*;
- obter e caracterizar linhagens haplóides, diplóides e recombinantes de *A. nidulans* quanto à conversão e biodegradação da vinhaça.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vinhaça

2.1.1. Produção

No Brasil, o álcool proveniente da fermentação do melaço da cana-de-açúcar é utilizado como combustível alternativo para automóveis, desde o início da década dos 80. Atualmente, o país possui a maior produção mundial de cana-de-açúcar sendo que, em 1994, uma área total de $4,2 \times 10^6$ hectares foi cultivada, produzindo $2,4 \times 10^8$ toneladas de cana-de-açúcar que, após processamento, resultaram em $9,5 \times 10^9$ litros de álcool (Orlando Filho *et al.*, 1995).

Na fase final da destilação do álcool é formado um subproduto chamado vinhaça ou vinhoto da cana-de-açúcar. Este se acumula em média na proporção de 10 a 15 por litro de álcool produzido. O vinhoto é um resíduo de alta toxicidade devido a sua composição orgânica, passível de ser oxidada. Ele apresenta altos valores para indicadores de poluição, como a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) e Demanda Química de Oxigênio (DQO), variando entre 7~20g O₂ l⁻¹ e 35~60g O₂ l⁻¹, respectivamente.

A vinhaça vem sendo produzida nas regiões sucro-alcooleiras do país num curto espaço de tempo (safra 150 dias), o que agrava o problema ambiental causado por esse resíduo.

Sendo assim, diferentes métodos de despoluição ou de apenas descarte da vinhaça foram analisados desde a década dos 60 no Brasil. Nesta revisão serão apresentados alguns pontos relacionados a sua composição, efeitos ambientais e alternativas de despoluição da mesma, merecendo especial atenção o processo de sua conversão em biomassa fúngica.

2.1.2. Constituição

A vinhaça é um resíduo ácido (pH 3~5) composto principalmente por sólidos orgânicos e minerais em diferentes proporções. Araújo *et al.* (1977), ressaltam que a heterogeneidade observada na composição do vinhoto resulta da grande variação existente na tecnologia alcooleira, com oscilações sensíveis no tocante à concentração e preparo dos mostos (adição de P e aumento de Ca, decorrentes do processo de clarificação), tipo de sementeira direta ou por meio de cortes, tempo de fermentação, nutrição artificial e outros parâmetros, tornando difícil determinar precisamente sua composição.

Entretanto, inúmeros componentes já foram estimados por diferentes metodologias. Foi verificado que o resíduo é pobre em açúcares, sendo o teor de açúcares totais cerca de um décimo do teor de matéria orgânica total. Os ensaios cromatográficos revelaram a presença de sacarose e de frutose, sendo a sacarose, provavelmente, o açúcar hidrolisável dosado. Glicose e pentoses não foram detectadas.

A cromatografia em papel do vinhoto revelou a presença de vários aminoácidos, principalmente leucina, isoleucina e valina. Ácidos aminados frequentemente estão presentes nos mostos fermentados. Sua desaminação e descarboxilação levam à formação de álcoois secundários de peso molecular elevado e que, em conjunto, constituem a "cauda" do destilado, conhecido como "óleo fúsel" (Martelli & Sousa, 1978).

A análise da vinhaça por cromatografia em coluna revelou a presença de ácidos orgânicos como o ácido láctico e o succínico, bem como de glicerol (Rotenberg *et al.*, 1979). Além destes constituintes, a espectroscopia associada à cromatografia de gás e líquida de alta performance indicou a presença também de etanol, entre outros 15 tipos de moléculas de baixo peso molecular quantificadas (Dowd *et al.*, 1994).

2.1.3. Efeitos ambientais

O potencial de oxidação da matéria orgânica presente no vinhoto é elevado. Desta forma, o descarte direto em rios, rapidamente retiraria o oxigênio livre na água, acarretando prejuízos inestimáveis à fauna e flora, bem como à população ribeirinha. Portanto, já na década dos 70, concluiu-se que os rios não seriam um destino apropriado para a vinhaça, mas somente no final dos 70, entrou em vigor a lei de proteção ambiental contra o descarte em rios.

Desde a década dos 70, a aplicação mais usual do resíduo é a sua utilização na irrigação e fertilização de culturas, principalmente de cana-de-açúcar. Este é o sistema mais utilizado tendo em vista a viabilidade econômica pois, com baixos custos, se obtém produtividade superior em cana-de-açúcar, provavelmente devido aos sais minerais (N, K) presentes na vinhaça.

Entretanto, Tauk & Ruegger (1987), verificaram que a adição da vinhaça ao solo de cerrado promove aumento do número de fungos capazes de utilizar carboximetil celulose, amido e sacarose como única fonte de carbono. Este efeito é sazonal e dependente do pH e umidade, além de outras características do solo. Martinez Cruz *et al.* (1987) registraram ainda, nos solos tratados com vinhaça, um aumento do número de microrganismos heterótrofos, principalmente actinomicetos e fungos, ocorrendo para os últimos, diminuição qualitativa, e predomínio de gêneros celulolíticos.

Tauk (1978b) concluiu que a vinhaça vem sendo utilizada como adubo por conter matéria orgânica e elementos minerais, com exceção do fósforo. Embora com algum sucesso, essa técnica não impede o forte odor que atinge as cidades na época da safra das regiões. A sua utilização para obtenção de biomassa microbiana poderia diminuir tal problema.

A análise dos efeitos da aplicação da vinhaça em função do tempo (0~15 anos), na composição química do solo e do lençol freático, apresentou tendência em manter a fertilidade do solo. Entretanto ocorre uma elevação na concentração de nitratos no lençol freático (Cruz *et al.*, 1991).

2.1.4. Despoluição via tratamento físico-químico

Vários tratamentos físico-químicos foram investigados visando a redução da carga poluente presente na vinhaça. A análise da desmineralização pela eletrodialise do resíduo permitiu a remoção de 70~85% das cinzas, sendo que o aumento da concentração da vinhaça diminui a eficiência do processo e a elevação da temperatura favorece o sistema de despoluição (Milewski & Lewicki, 1988).

Dhamankar *et al.* (1993) verificaram que a redução da coloração da vinhaça, apresenta correlação positiva com a diminuição da DQO, quando tratada com peróxido de hidrogênio, sendo o processo favorecido em pH alto.

2.1.5. Utilização biológica da vinhaça

Foi estudado o efeito de diferentes proporções da vinhaça na água consumida por aves domésticas. Verificou-se que o aumento da concentração, diminuía o ganho de peso, o consumo de alimento e a eficiência de conversão. Devido aos altos níveis eletrolíticos do subproduto, os animais consumiram mais líquido afim de regular seu metabolismo hídrico (Gallo *et al.*, 1986).

O cultivo da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, foi conduzido em meio contendo diferentes proporções do subproduto. Quando cultivadas em baixas concentrações foi constatado um aumento do número de pigmentos fotossintéticos e de células, sugerindo o possível uso deste organismo no processo de despoluição da vinhaça (Kadioglu & Algur, 1992).

Balaguer *et al.* (1992) empregaram sepiolita como suporte de fixação para microrganismos anaeróbios (lodo ativado). Os autores avaliaram a eficiência em reator fluido anaeróbio com suporte, visando o tratamento da vinhaça e obtiveram redução de 70~88% na DQO do vinhoto.

O uso de biodigestor anaeróbio termofílico em escala piloto, permitiu verificar a presença de duas culturas principais na produção do gás metano, uma composta por *Methanosarcina* sp e a outra formada pela co-cultura de *Clostridium* sp e *Methanobacterium* sp (Vazzoler *et al.*, 1995). Wiegant *et al.* (1985) utilizando reatores UASB (*Upflow anaerobic sludge blanket*), verificaram

que a toxicidade da vinhaça é mais importante na eficiência de conversão da vinhaça em metano, do que a taxa de entrada do resíduo no sistema.

O crescimento da cianobactéria *Spirulina maxima* foi avaliado por Ferraz *et al.* (1986), durante o cultivo em vinhaça diluída e sob luz artificial. Os autores observaram redução de 74 e 95% para a DQO e DBO₅, respectivamente, e produção de biomassa semelhante à cepa cultivada em meio mineral definido. Por outro lado, *Rhodopseudomonas palustris* não foi capaz de crescer em vinhaça com concentrações superiores a 10g O₂ l⁻¹ de DQO. Entretanto, com diluições maiores, este meio se apresentou como econômico para o cultivo destes organismos segundo Peres *et al.* (1986).

2.2. Biodegradação da vinhaça via conversão em biomassa fúngica

No Brasil, desde a década dos 60 são realizadas pesquisas visando determinar a viabilidade econômica do processo de conversão do vinhoto em biomassa fúngica (UM AVISO, 1965; Serzedello, 1966; Carneiro, 1967; Almeida, 1970). Atualmente há relatos de eficiência apreciável em escala laboratorial ou semi-piloto. O êxito de uma planta industrial seria de grande valia, uma vez que daria sustentabilidade ao sistema de tratamento biológico da vinhaça, pela comercialização da proteína contida na massa celular seca produzida. Selim *et al.* (1991) consideram a importância da reciclagem do subproduto como estratégia de diminuir os custos com a matéria-prima.

No presente trabalho, foi verificado que a eficiência deste processo está diretamente relacionada à interação do inóculo (levedura, fungo filamentoso ou cultura mista) com as condições de cultivo (composição da vinhaça, tipo de sistema fermentativo).

2.2.1. Organismos

2.2.1.1. Leveduras

As leveduras foram os primeiros organismos a serem avaliados quanto à biodegradação da vinhaça (Serzedello, et. al. 1970; Delgado *et al.*, 1975; Tauk, 1976), sendo que já na década dos 60 duas fábricas foram instaladas: uma anexa à Usina Serro Azul (PE) e outra à Destilaria Central de Alagoas (AL).

Estes pesquisadores se decidiram pela utilização das leveduras devido à existência de conhecimento a respeito da produção industrial de biomassa de levedura, também conhecida como SCP (*Single Cell Protein*), via os sistemas contínuos Penick & Ford-USA e o Pekilo Finlandês. Dentre os microrganismos, as leveduras têm sido priorizadas quanto ao potencial nutricional da biomassa, à velocidade e magnitude de produção da mesma (Tauk, 1978b).

Martini (1973) discutiu a possibilidade da utilização de proteína de leveduras na alimentação humana, devido ao efeito do ácido nucleico no teor de ácido úrico dos fluidos corporais. Araújo *et al.* (1977) cultivando *Torula* no resíduo verificaram que até 12%, da biomassa era constituída de ácidos nucleicos, o que poderia limitar o uso em rações.

Também consideraram que a quantidade de suplementos exigidos no preparo do meio, bem como a necessidade de centrífugas para separação das células, podem aumentar os custos do processo com leveduras (Araújo *et al.*, 1977).

2.2.1.2. Fungos filamentosos

De Lamo & Menezes (1978), verificaram que espécies de fungos filamentosos preenchem as exigências do processo de diminuição da carga orgânica, convertendo rapidamente a matéria dissolvida em biomassa com certo teor de proteína utilizável para alimentação animal.

Suas vantagens na produção industrial de biomassa, são relatadas por Solomons (1985), que consideram: a capacidade de catálise de uma gama de substratos complexos (celulose, hemicelulose, pectina etc); a tolerância à pH baixo (resistência à infecções); necessidade de poucos suplementos adicionados ao meio; fácil recuperação da biomassa via filtração; prático manuseio e secagem da biomassa; possibilidade de utilização da hifa como base na fabricação de alimentos.

Em meio vinhaça *A. oryzae* cresceu em forma de "*pellets*", o que facilitou sobremaneira sua recuperação e secagem (De Lamo & Menezes, 1978). Segundo Araújo *et al.* (1977), o mesmo organismo apresentou estabilidade durante a produção de biomassa, sendo pouco sensível a variações de

temperatura, pH, nutrientes e aeração, bem como na redução da poluição, quando cultivado em fermentador de 30 litros, por 96 horas (De Lamo & Menezes, 1978). Outros autores verificaram, que a composição de amino ácidos da biomassa é semelhante ao observado em farelo de soja (Araújo *et al.*, 1976).

O inóculo de leveduras, na maioria das pesquisas, tem sido realizado via suspensão pré-cultivada por 24~35 horas a 5% em relação ao volume do meio (v:v). Entretanto, a inoculação de esporos em fungos também tem sido investigada, sendo observado aumento de 14% no teor de proteína em relação ao uso de "*pellets*" e um decréscimo de 20% na produção de biomassa.

2.2.1.3. Cultura mista

A avaliação de culturas puras e mistas de diferentes espécies de leveduras crescendo em meio vinhaça permitiu a verificação que, em geral, a produção da biomassa é superior em culturas mistas, e que a produção de proteína total foi superior em ensaios puros (De Angelis *et al.*, 1979). A adição de H_3PO_4 em cultura mista de leveduras, não afetou diferentemente as culturas.(Tauk & Gambale, 1978).

Avaliando a composição dos aminoácidos presentes na biomassa da cultura mista de *Aspergillus niger* e *Cryptococcus laurenti*, constatou-se que, em geral, a concentração deles é razoável sendo, em sua maioria, deficientes para cisteína, ácido glutâmico, prolina e metionina (Ceccato-Antonini & Tauk, 1992; 1994).

2.2.1.4. Microbiota natural da vinhaça

Quando cultivada por 96 horas em agitador rotativo, a microbiota natural da vinhaça foi capaz de reduzir 56% da DBO (De Lamo & Menezes, 1978). A minuciosa investigação desse "*pool*" de organismos naturais da vinhaça permitiu a identificação de alguns grupos de bactérias. Em geral, eram organismos móveis, capazes de aderir à superfícies, e pleomórficos, apresentando os maiores formato de bastonete (forma vegetativa) e os menores com 0,5µm cocóides (forma parasitária) (Araújo *et al.*, 1978).

As parasitárias foram classificadas no grupo das "*gliding bacteria*", ocorrentes no solo e águas, apresentando mobilidade e capacidade de digerir aerobiamente a celulose, ágar e quitina. Araújo *et al.* (1978) verificaram que as células vegetativas bastonetiformes podem se modificar (*starvation*) em estruturas de resistência (células cocóides), as quais ficam em contato com a parede dos fungos, estabelecendo uma associação simbiótico-parasitária.

Os mesmos autores afirmam que as bactérias não produzem enzimas extracelulares solúveis e, provavelmente, a ação lítica das enzimas permanece ligada ao envelope celular bacteriano, obrigando a bactéria a aderir às superfícies dos substratos para poder digerí-los. As bactérias eram capazes de formar biofilme (camada de células) devido à alta viscosidade (grupo das *slimy bacteria*). Além disso, apresentou resistência a antibióticos e, quando associada em baixas concentrações aos fungos, não formam colônias mesmo em meios de crescimento enriquecidos, sendo, portanto, de difícil isolamento.

Por fim, especulou-se que *Saccharomyces cerevisiae* carregaria, em suas paredes, a bactéria para o interior do mosto. Araújo *et al.* (1978) consideram que os fungos são mais sensíveis às bactérias do que as leveduras, pois a última possui parede mais resistente e constituída essencialmente de manana e glucana (polissacarídeos diferentes da quitina). Os autores sugerem que, durante a evolução, as leveduras seriam fungos que se adaptaram gradativamente a ambientes onde proliferavam diferentes tipos de bactérias. Isto é, seriam fungos unicelulares que, por suas paredes resistentes e sua grande velocidade de multiplicação, conseguem competir eficientemente com as bactérias nos meios ricos e de baixa acidez.

2.2.1.5. Seleção de fungos

Araújo *et al.* (1977) consideram que fungos selecionados deveriam ser capazes de reduzir a poluição do resíduo via sua conversão em micélio, rico em proteínas. No mesmo sentido Martelli & Sousa, (1978) concluem que a limitação para que maior despoluição seja obtida é a presença de matéria orgânica não-fermentável pelo agente escolhido. Concluíram, que este processo depende da capacidade do organismo em utilizar a variedade de nutrientes presentes na vinhaça.

Tauk (1976) sugere que a obtenção de linhagens de leveduras adaptadas à vinhaça poderia facilitar o uso industrial desses microrganismos para a produção de massa protéica. E verifica que a adaptação de leveduras a diferentes concentrações de vinhaça favorece a produtividade de matéria seca. Entretanto, admite que o método de adaptação não pode ser entendido como adequado para o preparo do inóculo, devido ao tempo necessário à sua execução que é de 32 dias (Tauk, 1978b).

2.2.2. Condições do cultivo

2.2.2.1. Sistemas de fermentação

Em laboratórios, os experimentos são desenvolvidos em fermentadores com sistema contínuo e não-contínuo, entretanto, em nível industrial, somente do último tipo. Em sua maioria, as avaliações laboratoriais preliminares são desenvolvidas em batelada em agitador rotativo (*shaker*). Martelli & Sousa, (1978) ressaltam possíveis dificuldades na engenharia do processo em nível industrial, devido à necessidade de fermentadores muito grandes, com conseqüentes implicações quanto ao suprimento de oxigênio e à agitação.

2.2.2.2. Tratamento do meio

A vinhaça desponta com boas possibilidades de adequação ao tratamento fúngico em condições não-assépticas, principalmente por ser descartada a elevadas temperaturas e possuir pH baixo. Este fato pode ser justificado pela pequena quantidade de microrganismos contaminantes (bactérias) visualizados na microbiota natural da vinhaça. O tratamento não asséptico é de fundamental importância no contexto brasileiro uma vez que não requerem equipamentos de alto custo (aço inoxidável) (De Lamo & Menezes, 1978).

A observação da competitividade entre a microbiota natural da vinhaça e *Aspergillus oryzae* (Araújo *et al.*, 1977) ou *Candida utilis* (Martelli & Sousa, 1978), permitiu verificar que estes foram prejudiciais ao desenvolvimento

do fungo, causando rendimento irregular de biomassa e redução variável da poluição. Isto sugere que a fácil contaminação é devida ao fato da vinhaça conter açúcares simples, acessíveis ao desenvolvimento de leveduras já aclimatadas ao meio, bem como bactérias contaminantes.

Durante testes realizados em Campos - R.J. (1976), em escala de 1000 litros, a eficiência do pré-tratamento do vinhoto com argila ficou prejudicada por problemas na decantação do material. Os autores sugerem que para utilizar fungos filamentosos (*A. oryzae*), tão sensíveis aos contaminantes, seria necessário aumentar a eficiência do pré-tratamento a ponto de torná-lo antieconômico (Araújo *et al.*, 1978).

Verificou-se que o prévio tratamento da vinhaça com ácidos minerais (HNO_3 ou HCl) favorece o desenvolvimento de *Candida utilis*, pois precipita alguns elementos que interferem na adaptação do organismo ao meio de cultivo (Tauk, 1978a).

2.2.2.3. Aeração e agitação

A aeração pode ser responsável por cerca de 20% dos custos totais do processo de produção de biomassa fúngica (Martelli & Sousa, 1978). De Lamo & Menezes (1978), variando a velocidade de rotação de um fermentador de 7 litros, não observaram diferença significativa no rendimento do processo. Os autores relacionaram a baixa eficiência à insuficiente aeração e/ou agitação, bem como à qualidade do inóculo de *A. oryzae*.

Para Martelli & Sousa (1978), a velocidade de agitação apresentou importância no processo operacional, permitindo reduzir a taxa de aeração. Entretanto, relataram dificuldades operacionais com relação às espumas que surgiam e que dificilmente eram retiradas pelo antiespumante.

2.2.2.4. Suplementação do meio

As proteínas celulares de levedura são compostos nitrogenados cuja biosíntese está condicionada à riqueza em nitrogênio assimilável no substrato. As necessidades de *Torulopsis utilis* em compostos nitrogenados e

fosfatados, foram satisfeitas pela adição de fosfato de amônio à vinhaça (1g/ litro de vinhoto). Caso ocorra diminuição no pH durante o processo, pode-se adicionar NH_4OH (Serzedello, 1966).

A utilização de sais de baixo custo como a uréia, o sulfato de amônio e o superfosfato, deve ser considerada (Araújo *et al.*, 1977). Costa *et al.* (1992) cultivando *Cryptococcus laurentii*, em meio adicionado de uréia, verificaram que o suprimento de nitrogênio poderia limitar o crescimento.

Avaliando *Candida sp*, Delgado *et al.* (1975) relataram melhora de 20% na produção de biomassa quando o meio foi suplementado com uréia e fosfato básico de amônio. Aumento da produtividade também foi observado por Selim *et al.* (1991) quando adicionaram a uréia e o amônio e, também por Serzedello *et al.* (1970) que, adicionando $(\text{NH}_4) 2\text{HPO}_4$, obtiveram aumento de 66% e 37% para matéria seca e compostos nitrogenados, respectivamente.

Kiyan (1988) verificou que a suplementação única com MgSO_4 ou H_3PO_4 em meio vinhaça, foi menos eficiente do que a suplementação combinada (sais de Cochrane), quanto à produção de biomassa. Foi observado rendimento superior para a cultura mista de *A. niger* e *Cryptococcus laurentii* quando o meio foi otimizado em 20:3:0,1 para Carbono : Nitrogênio : Fósforo, 8g l⁻¹ de carboidrato (Ceccato-Antonini & Tauk, 1994).

A disponibilidade de fontes de carbono mais acessíveis aos microrganismos como, por exemplo, os açúcares, pode permitir o adiantamento do início da fase *log* de crescimento, bem como seu prolongamento, proporcionando melhor rendimento ao processo.

Selim *et al.* (1991) constataram que a adição de sacarose permitiu melhor desempenho de algumas leveduras em meio vinhoto. O mesmo foi observado por Delgado *et al.* (1975) cultivando *Candida* que, pela adição de até 2% de melaço, obtiveram melhor rendimento. Kiyan (1988) constatou melhora na produção biomassa, proteína bruta, lipídios e fósforo, além de maior redução na DBO, com a adição de melaço.

A influência da adição de fontes de carbono residuárias na produção de SCP foi investigada, e detectada uma melhora de até 10% na produtividade quando da utilização de licor do processamento de milho. Quanto à

suplementação com soro de leite, somente *Kluyveromyces fragilis* foi capaz de utilizar esta fonte. (Selim *et al.*, 1991).

Serzedello *et al.* (1970) concluíram que a adição de glicose à vinhaça não melhorou sua capacidade de fornecer proteína, mas sim sua capacidade de fornecer massa celular. Além disso, quando se deseja somente o tratamento biológico, a suplementação do meio torna-se desnecessária. Por outro lado, quando se visa o aproveitamento da biomassa, a suplementação adequada do meio otimiza o desenvolvimento fúngico (Kiyon, 1988).

2.2.2.5. pH do meio

Tauk (1978a) verificou pequena alcalinização do meio vinhaça quando cultivou *Candida utilis*. O mesmo organismo não variou a produção de biomassa quando foi cultivado em meio com pH inicialmente ajustado entre 5~6, mantendo-se em 4 durante todo o processo (Martelli & Sousa, 1978).

O cultivo de *Cryptococcus laurentii* em meio vinhoto, implicou numa variação do pH inferior ao observado em meio definido (Costa *et al.*, 1992). Variação não significativa do pH também foi constatada por Tauk (1978b) após o cultivo de diferentes leveduras. De Lamo & Menezes (1978) trabalhando com *A. oryzae*, em condições não assépticas e pH inicial 3, verificaram que, no final do processo, o pH se estabilizava em 5.

Martelli & Sousa (1978) e Costa *et al.* (1992) justificam que a pequena variação observada no pH do meio, é devida à composição de sais do vinhoto, que garantem um meio bem tamponado. Sendo assim, sugeriam a utilização do meio com pH ácido para evitar o desenvolvimento de bactérias contaminantes (Tauk, 1978b; De Lamo & Menezes, 1978).

2.2.3. Dinâmica e eficiência do processo

2.2.3.1. Consumo do meio

Quando o organismo aeróbio exclusivo, *Cryptococcus laurentii*, foi cultivado em temperaturas mais amenas, sua biomassa foi indiretamente favorecida, devido à maior solubilidade do meio e conseqüente disponibilidade de oxigênio (Ceccato-Antonini & Tauk, 1994)

Martelli & Sousa (1978) verificaram que, após o cultivo de *Candida utilis*, os ácidos aminados e os açúcares redutores da vinhaça desapareceram, sendo que 90% dos açúcares totais, 70% do ácido succínico e 50% da proteína foram utilizados, bem como praticamente todo o fosfato. Apesar de não ter havido preocupação de equilibrar o teor de carbono, nitrogênio e fósforo, parece que a quantidade desses nutrientes é suficiente em relação ao material fermentável, pois não foram totalmente consumidos.

Os mesmos autores observaram diauxia na utilização dos componentes da vinhaça por *C. utilis*, pois os açúcares foram consumidos durante a fase de indução (*lag*) e no decorrer da fase de crescimento logarítmico (*log*). Seu esgotamento coincidiu com o início da fase estacionária, na qual o organismo iniciou o metabolismo de outras substâncias componentes do vinhoto.

A existência, no substrato, de nutrientes em quantidades superiores ao que a levedura é capaz de assimilar, principalmente fonte de carbono possibilita que estes sejam utilizados na formação de etanol e CO₂, ocorrendo perda de energia, em detrimento do processo de produção celular (Serzedello, 1966; Ceccato-Antonini & Tauk, 1994).

2.2.3.2. Cinética do Crescimento

Kiyan (1988) verificou que a produção de proteína bruta foi inversamente proporcional ao tempo de cultivo e justificou tal fato baseando-se na morfologia dos "*pellets*". Segundo esta, nas primeiras 24 horas, as hifas são finas e totalmente cheias de protoplasma; posteriormente ocorre a formação de plastos, as

paredes das hifas ficam mais grossas e com aspecto de células mortas, diminuindo assim o teor protéico.

A porcentagem de proteína variou de acordo com o tamanho dos "*pellets*" que, por sua vez, dependem dos nutrientes do meio. "*Pellets*" pequenos proporcionaram teores protéicos superiores em meios ricos em N e P, enquanto que os "*pellets*" maiores apresentaram células altamente vacuolizadas, com baixo conteúdo de proteína (Kiyan, 1988).

Cultivando *Candida utilis* em meio vinhaça, Martelli & Sousa (1978) observaram que o tempo de geração deste organismo é semelhante ao observado em meios definidos, entretanto com fase *log* curta. Os autores expõem a teoria de Williamson e Scopes, em que a divisão celular é dependente de um fator F , presente na parede celular e, que a divisão se inicia quando a concentração C do referido F atinge um valor crítico (g/g de células). Neste ponto, terminaria a fase de indução e iniciaria a fase exponencial, durante a qual a velocidade de síntese de F se mantém constante.

Foi observado que os açúcares são os únicos substratos a serem consumidos durante a fase de indução, o que indica que estes participam prioritariamente da síntese de F . O tempo de geração das células permite concluir que a conversão em biomassa é eficiente durante a fase exponencial porém, devido à curta duração desta, a produtividade média não é alta (Martelli e Sousa, 1978).

2.2.3.3. Rendimento

Venturini Filho & Camargo (1987) verificaram efeito benéfico dos sólidos em suspensão da vinhaça na produção de biomassa fúngica. Sugerem que o aumento de produção observado, se deve às interações de absorção metabólica e adsorção física, existentes entre as hifas do fungo e as partículas em suspensão. Entretanto consideram difícil quantificar a contribuição individual de cada uma dessas interações.

No caso do crescimento, é difícil aplicar os conceitos cinéticos correntes para relacionar multiplicação celular e consumo de substrato, pois este não é um composto definido e sim, uma mistura de substâncias que constituem a

fração fermentável da matéria orgânica do vinhoto. Assim, deve-se calcular o fator de rendimento pela relação entre o peso de células obtido e o peso do substrato consumido (Martelli & Sousa, 1978).

O cálculo do rendimento em leveduras seca, no caso de resíduos como a vinhaça, não deve ser feito em relação apenas aos açúcares invertidos e, sim, referir esse rendimento ao total de compostos carbonados, pois inúmeros compostos orgânicos não-açúcares são assimilados pelo organismo, aumentando o rendimento (Serzedello, 1966).

No Brasil, para que um resíduo possa ser descartado em efluentes, ele deve apresentar o índice de DBO inferior a $0,6\text{g O}_2\text{l}^{-1}$. Neste caso, 95% da vinhaça deveria ser degradada.

Entretanto, já se considera adequada a redução de 80%, obtida após 72 horas pelo cultivo misto de *Aspergillus niger* e *Cryptococcus laurenti*, e conseqüente produção de biomassa com 40% de proteína (Ceccato-Antonini & Tauk, 1994). Cultivando por mais tempo (108 horas), Venturini Filho & Camargo (1987) conseguiram com *A. oryzae* a redução de 84,4% na DBO₅ do vinhoto.

C. utilis cultivada em vinhoto, sem qualquer adição, converteu somente 50% da matéria redutora em células, o que obrigaria um tratamento adicional à vinhaça (Martelli & Sousa, 1978). A mesma espécie, em sistema contínuo, consumiu 50 a 75% das substâncias redutoras (Delgado *et al.*, 1975). E, por fim, *S. cerevisae* foi capaz de produzir 12,75g biomassa/litro de meio em fermentador contendo 3,5 litros de vinhoto (Selim *et al.*, 1991).

— Foi observado que, a concentração da vinhaça como meio de cultura diminui a porcentagem protéica da biomassa, mas aumenta a produção de biomassa. Logo, a relação proteína produzida e vinhaça consumida seria estável (Venturini Filho & Camargo, 1987).

2.3. Melhoramento genético de espécies de *Aspergillus* de interesse industrial

2.3.1. Melhoramento via diplóides e heterocários

Devido ao interesse econômico em alguns metabólitos e enzimas produzidas por fungos, a técnica da obtenção de diplóides e heterocários têm sido investigada quanto à melhoria destes processos.

Num estudo modelo Moscoso & Rosato (1987), utilizando 11 linhagens auxotróficas haplóides (8 morfológicas) de *A. nidulans*, obtiveram 10 linhagens diplóides e 10 heterocários. Todas foram avaliadas quanto à produção de enzimas extracelulares (lipase, amilase, protease), pela determinação do halo de atividade enzimática, diâmetro da colônia e índice enzimático (razão entre o halo e o diâmetro).

Considerando o índice enzimático, verificou-se que este era superior para os mutantes compactos bem como para alguns heterocários. Este resultado foi atribuído à superior densidade micelial dos compactos e, também, à possibilidade dos mutantes morfológicos utilizados nos heterocários possuírem permeabilidade diferenciada em relação ao normal, como já relatado para a protease e glucoamilase em *Aspergillus* (Kvesitadz *et al.*, 1981; Koide *et al.*, 1979 apud Moscoso & Rosato, 1987).

Os autores observaram a complementação entre linhagens parentais quanto à produção de amilase e protease, pois alguns diplóides e heterocários apresentaram halo maior do que seus ascendentes. Verificaram também que, dependendo dos parentais, a complementação poderia ser obtida somente no estado diplóide ou heterocário. Sendo assim, concluíram que a utilização de mutantes morfológicos, especialmente em determinadas combinações, poderia melhorar a produtividade enzimática, evitando, assim, estratégias de melhoramento via cruzamento intergenérico (Moscoso, 1987).

Objetivando o melhoramento da produção de ácido cítrico por diplóides de *A. niger*, Das & Roy (1978) inicialmente obtiveram alguns mutantes auxotróficos a partir de uma linhagem produtora de ácido cítrico (CGU 87). Estas

linhagens foram cruzadas, permitindo a obtenção de heterocários e diplóides. Dentre as combinações estabelecidas, todas foram superiores aos seus parentais, entretanto, somente uma das combinações diplóide foi capaz de superar a produtividade da linhagem CGU 87. Os autores atribuem esta melhora à eficiente adaptação da linhagem ao ambiente da fermentação.

A síntese de ácido cítrico é sensível as condições do ambiente. Sendo assim, a produtividade é influenciada pela adaptação ao ambiente, e esta por sua vez é controlada pelo genótipo. Nesse sentido argumentam que o fato de possuírem 2 genomas diferentes, como nos heterocário e diplóide, poderia conferir a estas linhagens vantagens em adaptar-se ao ambiente fermentativo, quando comparadas ao seus parentais haplóides (Das & Roy, 1978).

Também estudando a síntese de ácido cítrico em *A. niger*, Bonatelli (1981) obteve via ciclo parassexual linhagens diplóides e seus segregantes. Verificou que estes não aumentaram a produção em relação a linhagem parental prototrófica, e que os diplóides apresentaram inferior variação na produtividade.

Kirimura *et al.* (1988) avaliaram linhagens diplóides de *A. niger* quanto à produção de ácido cítrico. Estas foram obtidas por fusão de protoplasto entre 2 linhagens de *A. niger* hiper-produtoras de ácido cítrico, sendo uma delas para cultura sólida e outra para o cultivo sob agitação. A partir das produtoras obtiveram mutantes auxotróficos, que foram utilizadas nos cruzamentos.

A produção do ácido foi avaliada nas linhagens diplóides obtidas. No experimento em meio sólido, este índice foi superior ao apresentado pelos parentais (produtores), porém no cultivo sob agitação, nenhuma linhagem superou a parental hiper-produtora nestas condições. O melhor diplóide produziu 1,2 vezes mais ácido cítrico do que o parental para cultura sólida (Kirimura *et al.*, 1988)

Com a finalidade de produzir uma linhagem que melhor degradasse os resíduos da destilaria de "*shochu*" (bebida japonesa) ricos em celulose, Ogawa *et al.* (1993) pela fusão de protoplastos, obtiveram diplóides interespecíficos a partir dos parentais *A. niger* (hiper-produtor de celulasas) e *A. kawachii* (hiper-produtor de ácido cítrico).

Para o cruzamento, foram obtidos mutantes auxotróficos e submetidos à fusão. Diplóides estáveis foram isolados após o tratamento dos heterocários em meio contendo 0,1% de cânfora. O estado diplóide foi confirmado pela mensuração dos conídios, quantificação do DNA e capacidade de germinar. Uma das linhagens obtidas apresentou produtividade superior para celulase, ácido cítrico, mesmo nível para amilase, esporulação semelhante à *A. kawachii*, e capacidade de degradar o resíduo. Foi verificado que as linhagens diplóides germinavam mais rapidamente do que os parentais e concluíram que é possível pela fusão de protoplastos, realizar a transferência da capacidade de produzir celulasas entre estes organismos (Ogawa *et al.*, 1993).

O melhoramento dos chamados *koji-molds*, grupo constituído por diferentes espécies do gênero *Aspergillus* envolvidas no processo de produção do "sake", "shochu" e "shoyu" japoneses, têm sido investigado principalmente no oriente por indústrias e universidades.

Ushijima & Nakadai (1987), trabalhando com *A. sojae* (produção de "shoyu"), obtiveram e avaliaram várias linhagens diplóides. Para isso, utilizaram linhagens parentais hiper-produtoras para protease e glutaminase e, a partir destas, obtiveram mutantes auxotróficos. Os mutantes foram então submetidos à fusão de protoplastos e linhagens diplóides estáveis foram isoladas. Nenhum dos produtos da fusão produziu mais que as linhagens parentais, entretanto algumas foram capazes de apresentar excelente atividade para ambas enzimas.

Em trabalho posterior, estas linhagens diplóides foram utilizadas para obtenção de segregantes haplóides, bem como mutantes diplóides induzidos por U.V.. Na avaliação quanto à atividade de protease e glutaminase, verificou-se que os mutantes diplóides eram capazes de melhorar ambas enzimas até determinado ponto e um recombinante haplóide foi capaz de produzir a mesma quantidade de protease e quatro vezes mais glutaminase do que a linhagem protease hiper-produtora (Ushijima *et al.*, 1987).

2.3.2. Melhoramento via segregantes recombinantes

Visando a obtenção de novos *koji-molds*, envolvidos na produção de "*shoyu*", foram obtidos recombinantes entre *A. oryzae* e *A. sojae*. Para isto, linhagens auxotróficas de ambas espécies foram submetidas a fusão de protoplasto, sendo posteriormente isolado um diplóide estável. O diplóide, quando cultivado em meio contendo benomil, produziu setores haplóides os quais foram purificados e avaliados quanto à produção de proteinases alcalinas extracelulares. Os autores verificaram que a linhagem diplóide, bem como os segregantes produzem somente as proteinases de um dos parentais, nunca de ambos (Ushijima *et al.*, 1990).

Em um experimento de hibridação interespecífica entre *A. usamii* mut. *shirousamii* (hiper-produtor de uma amilase ácida) e *A. niger* (hiper-produtor ácido cítrico), via fusão de protoplastos, foram isoladas colônias diplóides a partir de mutantes auxotróficos. As linhagens diplóides foram então cultivadas em meio contendo benomil e setores haplóides puderam ser obtidos. Os segregantes eram isolados prototróficos e auxotróficos simples e duplos.

Os segregantes foram avaliados quanto à produção de ácido cítrico e amilase. Um recombinante prototrófico apresentou produtividade superior para ambos parâmetros em relação às linhagens hiper-produtoras. Os resultados indicam que os segregantes induzidos pelo benomil sofreram modificações genéticas, que interferiram na produção de ácido cítrico e amilase (Ogawa *et al.*, 1989).

Também foi realizada a hibridização intergenérica entre *Monascus anka* e *A. oryzae*, com objetivo de melhorar os padrões industriais de *Monascus anka*, que possui crescimento lento e é produtora de pigmento vermelho. Para isto, Kiyohara *et al.* (1990) submeteram mutantes auxotróficas à fusão de protoplasto e alguns heterocários prototróficos foram isolados. Estes eram instáveis e formavam setores morfologicamente semelhantes a uma das linhagens parentais. Posteriormente, linhagens diplóides estáveis foram obtidas após indução dos heterocários com luz UV à 50% de sobrevivência. Os autores verificaram que a produção de amilase, protease e ácido kojic pelos diplóides foi intermediária em relação aos parentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Linhagens

As linhagens de *Aspergillus nidulans* utilizadas, são provenientes de Glasgow (Escócia) e estocadas no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ-USP. As demais espécies de *Aspergillus* avaliadas, são provenientes do Instituto Zimotécnico (IZ) "Prof. Jayme Rocha de Almeida" (ESALQ-USP).

- *A. niger* - IZ 9
- *A. oryzae* - IZ 133
- *A. sulphureus* - IZ 1774
- *A. nidulans* - linhagens:
 - a) Master Strain E - MSE: *suA1 adeE20 yA2 adeE20; wA3; galA1; pyroA4; facA303; sB3: nicB8; riboB2*. (McCully & Forbes, 1965);
 - b) A: *proA1 pabaA6 T (I→II)* (Nga & Roper, 1968);
 - c) Abnc: *proA1 pabaA6 T (I→II); bncA*;
 - d) PPY: *proA1 pabaA6 yA*;
 - e) BM: *biA1; methG1*;
 - f) VE: *veA1* (Käfer & Chen, 1964).

Tabela 1. Lista dos marcadores genéticos de *Aspergillus nidulans* contendo os respectivos grupos de ligação e fenótipo.

marcador	grupo de ligação	fenótipo
<i>suA1 adeE20</i>	I	supressor da mutação <i>adeE20</i>
<i>proA1</i>	I	auxotrofia para prolina
<i>pabaA6</i>	I	auxotrofia para ácido p-aminobenzóico
<i>yA2</i>	I	conídios amarelos
<i>adeE20</i>	I	auxotrofia para adenina
<i>biA1</i>	I	auxotrofia para biotina
<i>wA3</i>	II	conídios brancos - epistáticos a <i>y</i> e <i>y</i> ⁺
<i>galA1</i>	III	incapaz de utilizar galactose (como fonte de carbono)
<i>methG1</i>	IV	auxotrofia para metionina
<i>pyroA4</i>	IV	auxotrofia para piridoxina
<i>facA303</i>	V	incapaz de utilizar acetato (como fonte de carbono)
<i>sB3</i>	VI	auxotrofia para tiosulfato
<i>nicB8</i>	VII	auxotrofia para ácido nicotínico
<i>riboB2</i>	VIII	auxotrofia para riboflavina
<i>veA1</i>	VIII	conidiação independe de luz

Figura 1. Representação parcial do mapa de ligação de *Aspergillus nidulans*, contendo as marcas genéticas utilizadas.

3.1.2. Meios de cultura

3.1.2.1. Meio Mínimo (MM)

- segundo Pontecorvo *et al.* (1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
CuSO ₄ *	0,01 g
Glicose	10,0 g
Ágar Difco®	15,0 g
Água destilada	1000 mL

* adicionado ao meio original

pH ajustado para 6,8 com NaOH 1N

3.1.2.2. Meio Completo (MC)

- segundo Pontecorvo *et al.* (1953) modificado por Azevedo & Costa (1973). Foram adicionados ao meio mínimo:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de leveduras	2,0g
Solução de vitaminas	1 mL

pH ajustado para 6,8 com NaOH 1N

3.1.2.3. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> - aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Água destilada esterilizada	100,0 mL

A solução foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e, depois de colocado clorofórmio, foi conservada em frasco escuro a 4^o C.

3.1.2.4. MM líquido com 2% de MC

Ao MM líquido (3.1.2.1., sem o ágar) adicionou-se 2% de MC líquido (3.1.2.2., sem o ágar). A solução resultante foi distribuída no volume de 2,5 mL por tubo de ensaio.

3.1.2.5. Meio mínimo acetato de amônio

- O meio foi preparado segundo Apirion (1962).

CH ₃ COONH ₄	12,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	2,0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

pH ajustado para 6,1 com NaOH 1N.

3.1.2.6. Meio mínimo galactose

Galactose	10,0 g
Meio Mínimo sem glicose	1000 mL

pH ajustado para 6,5 com NaOH 1N

3.1.2.7. Suplementos adicionados ao MM

Soluções de aminoácidos e vitaminas foram preparadas pela adição de água destilada esterilizada a cada um deles. Posteriormente, as soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas em frasco escuro, a 4º C.

produto químico	concentração final no meio de cultura (µg/mL)
Ácido nicotínico	0,5
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,25
Adenina	25
Biotina	0,2
Metionina	50
Piridoxina	0,25
Prolina	50
Riboflavina	0,5
Tiossulfato de Sódio	100

3.1.2.8. Meios seletivos utilizados na caracterização genética

Para a caracterização genética, as linhagens de *A. nidulans* foram cultivadas nos seguintes meios: MM (3.1.2.1.); MC (3.1.2.2.); mínimo acetato (3.1.2.5); mínimo galactose (3.1.2.6.); mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais presentes no item 3.1.2.7 exceto ácido nicotínico (MM+T-nic); MM+T-ácido *p*-aminobenzóico; MM+T-adenina; MM+T-biotina; MM+T-metionina; MM+T-piridoxina; MM+T-prolina; MM+T-riboflavina; MM+T-tiossulfato de sódio. Para a transferência das colônias, foi utilizado um replicador multifio de níquel-cromo com 26 pontos.

3.1.3. Soluções

3.1.3.1. Solução NPK

O NPK, é um fertilizante comercial composto por nitrogênio, fósforo e potássio. Neste trabalho utilizou-se o produto constituído de 10% de cada um destes elementos, isto é NPK 10:10:10.

A solução NPK foi obtida através da solubilização de 100g de NPK (10:10:10) em água destilada (100mL), sendo posteriormente filtrada (papel de filtro), autoclavada e armazenada a 4°C. Tendo como base a composição destas fontes no MC (3.1.2.2.), determinou-se que 9mL da solução seriam suficientes para 1 litro de meio.

destas fontes no MC (3.1.2.2.), determinou-se que 9mL da solução seriam suficientes para 1 litro de meio.

3.1.3.2. Meio Vinhaça

A composição do meio vinhaça foi determinada durante o trabalho. Foi otimizada em vinhaça (3.1.4.) suplementada com melaço (3.1.5.) numa concentração final de 2g de melaço em 100mL de vinhoto. Para o meio sólido, o mesmo volume foi adicionado de 1,5g de ágar. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4N.

3.1.3.3. Solução de leite 5%

A solução de leite foi obtida pela solubilização de 5g de leite em pó desnatado em 100mL de água destilada, sendo posteriormente autoclavada e armazenada a 4°C.

3.1.3.4. Solução salina

A solução salina foi obtida pela dissolução de 8,5g de cloreto de sódio em 1 litro de água destilada, sendo posteriormente autoclavada e conservada a 4°C.

3.1.3.5. Solução tween

Foi obtida uma solução 0,1% de Tween 80 em água destilada, sendo posteriormente autoclavada e conservada a 4°C.

3.1.3.6. Solução benlate

Inicialmente o benlate foi dissolvido em acetona e a seguir, diluído em água destilada (20g benlate 50% em 400mL de água), filtrado e autoclavado. A solução foi utilizada na concentração final de 1 miligrama de benomil por mililitro de meio de cultura, esta concentração elevada, foi necessária para compensar a perda de atividade ocasionada durante o preparo da solução.

3.1.3.7. Solução de bicromato de potássio 0,25N

A solução foi obtida pela dissolução de 12,259g de $K_2Cr_2O_7$ em 1 litro de água destilada, resultando uma solução 0,25N.

3.1.3.8. Solução ácido sulfúrico + sulfato de prata

A solução foi obtida pela dissolução de 13,33g de $AgSO_4$ em 1 litro de H_2SO_4 (concentrado-PA).

3.1.3.9. Solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25N (SFA)

A solução SFA foi obtida pela dissolução de 98g de sulfato ferroso amoniacal $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ em água destilada e posterior adição de 20mL de ácido sulfúrico concentrado. Foi deixada esfriar e seu volume completado para 1 litro (água destilada) em balão volumétrico. Esta solução deve ser padronizada sempre que for utilizada.

3.1.3.10. Solução indicadora ferroim

A solução ferroim foi obtida pela dissolução de 1,485g de 1,10 fenantrolina monohidratada ($C_{12}H_6N_2 \cdot H_2O$) e 0,695g de sulfato de ferro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) em 50mL de água destilada, sendo, posteriormente, o volume ajustado para 100mL.

3.1.3.11. Solução de sulfato de magnésio

A solução foi obtida pela dissolução de 22,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em 1 litro de água destilada.

3.1.3.12. Solução de cloreto de cálcio

A solução foi obtida pela dissolução de 27,5g de $CaCl_2$ em 1 litro de água destilada.

3.1.3.13. Solução de cloreto férrico

A solução foi obtida pela dissolução de 0,25g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ em 1 litro de água destilada.

3.1.3.14. Solução tampão fosfato pH 7,2

KH_2PO_4	8,4 g
K_2HPO_4	21,75 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{KCl}$	33,4 g
NH_4Cl^-	1,7 g
água destilada	1000 mL
- o pH desta solução deverá ser de 7,2 sem nenhum ajuste.	

3.1.3.15. Solução de sulfato de manganês

A solução foi obtida pela adição 364g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ à água destilada (1000mL), sendo posteriormente filtrada.

3.1.3.16. Solução alcalina de iodeto e azida

NaOH	500g
NaI	135g

A solução foi obtida pela dissolução dos componentes em 1000mL de água destilada, e posterior acréscimo de 10g de azida de sódio (NaN_3) dissolvida em 40mL de H_2O destilada.

3.1.3.17. Solução de tiosulfato de sódio 0,025N

A solução foi padronizada com biiodato de potássio ($\text{KH}(\text{IO}_3)_2$). Para a padronização do tiosulfato, foram dissolvidos 0,8214g do sal em 1 litro de água destilada.

3.1.3.18. Solução indicadora de amido

Foram dissolvidas 5~6g de amido em água fria até formar uma pasta. Posteriormente foram adicionados 300 a 400mL de água a 100°C e o volume ajustado para um litro. Após 10 horas o sobrenadante foi eliminado.

3.1.4. Vinhaça

A vinhaça utilizada no trabalho provem da usina piloto do Departamento de Tecnologia do Açúcar e Alcool (ESALQ/USP), tendo sido armazenada a 1°C, em tambores (plástico) de 20 litros.

3.1.5. Melaço

O melaço utilizado no trabalho foi obtido na Usina Iracema, da Companhia Industrial e Agrícola Ometto de Iracemápolis/SP. Este foi mantido a 4 °C, em frasco de aço-inox de 3 litros.

3.2. Métodos

3.2.1. Esterilização

O processo de esterilização empregado foi o mesmo, tanto para os meios de cultura quanto para algumas soluções, isto é, foram levados à autoclave por 20 minutos sob 1 atmosfera de pressão, exceção feita às soluções em que se utilizou água destilada pré-esterilizada. A esterilização das placas de Petri foi realizada em estufa aquecida a 150°C, por 4,5 horas.

3.2.2. Estocagem

A preservação das culturas foi realizada em MM (3.1.2.1.) ou MC (3.1.2.2.), bem como em sílica gel. Para a última, foi obtida uma suspensão concentrada de conídios, numa solução de leite à 5% (item 3.1.3.3.). Esta foi filtrada (lã de vidro), colocada (0,1-0,3 mL dependendo da quantidade de sílica) num tubo de cultura com rosca (ou *eppendorf*) contendo sílica gel pré-esterilizada, e conservada em ambiente seco.

3.2.3. Crescimento em meio sólido

As linhagens foram repicados por ponto em placas de Petri contendo meio sólido. A avaliação do crescimento foi baseada na mensuração do diâmetro da colônia visto pela parte inferior da placa. No caso de substratos escuros, a leitura foi realizada com auxílio de uma lupa com luz inferior.

3.2.4. Produção de biomassa em meio líquido vinhaça

A avaliação da produção de biomassa seca foi realizada seguindo as seguintes etapas:

- *produção de conídios* - foi cultivado em meio sólido MC (3.1.2.2.) ou MM (3.1.2.1.), até a colônia esporular;
- *preparo do inóculo* - foi feita uma suspensão de conídios em tween (3.1.3.5.), e filtrada em lã de vidro;
- *cálculo e ajuste da concentração da suspensão de esporos* - primeiramente foi estimada, em câmara de Neubauer, a quantidade de esporos na solução, sendo em seguida esta concentração ajustada de acordo com o experimento. A solução resultante foi, então, novamente submetida a 4 leituras do número de esporos;
- *inoculação* - a partir da concentração média (4 leituras), foi feita a inoculação do volume referente ao número de conídios utilizados no experimento;
- *cultivo* - posteriormente foram cultivados em agitador rotativo (shaker), com as condições de cultivo (meio, agitação, tempo, temperatura) ajustadas segundo o experimento;
- *recuperação da biomassa* - após o período de cultivo, a biomassa foi filtrada à vácuo com uma tela de 95 mesh e, em seguida, lavada com água (10 vezes o volume de meio utilizado) e transferida para um disco de papel de filtro previamente pesado (balança analítica).
- *secagem da biomassa* - o conjunto (papel contendo a massa celular) foi secado em estufa. Foram utilizadas duas condições de secagem (10 dias a 56 °C e 24 horas a 83°C) de acordo com o experimento;
- *determinação da biomassa seca* - após o período de secagem, o conjunto foi mantido à temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente, pesado.

Finalmente a biomassa seca produzida foi determinada pela diferença entre o peso do papel e o peso do conjunto.

3.2.5. Obtenção e isolamento de linhagens diplóides

A obtenção de linhagens diplóides foi realizada via ciclo parassexual (Pontecorvo *et al.*, 1953) com algumas adaptações. Aproximadamente 10^6 conídios de 2 linhagens parentais, com marcas genéticas diferentes, foram transferidos para um tubo contendo MM líquido acrescido de 2% de MC (3.1.2.4.). O tubo foi agitado e incubado por 72 horas a 37^o C. Ao fim do período de incubação, a película formada na superfície do meio de cultura foi removida e colocada em placa de Petri contendo MM (3.1.2.1.). Essa película foi cortada em 4 ou 5 pedaços que foram dispostos na placa de forma a ficarem equidistantes. A placa foi novamente levada a incubação por aproximadamente 10 dias.

Após este período, o micélio foi lavado várias vezes com 10mL da solução tween (3.1.3.5.), a fim de obter uma suspensão de conídios. Esta foi filtrada 2 vezes em lâ de vidro para evitar a passagem de hifas heterocarióticas e, 0,1mL da suspensão, foi semeada em 6~10 placas contendo MM (3.1.2.1.).

As colônias formadas no MM foram purificadas por estria em MM e, em seguida, repicadas por ponto em MM. Após a incubação foi feita uma nova suspensão, que foi filtrada (lâ de vidro) e semeada de maneira a se obter colônia monospórica em MM. Esta foi então considerada a linhagem diplóide heterozigota resultante do cruzamento.

3.2.6. Obtenção de segregantes haplóides

As linhagens diplóides, obtidas no item anterior, foram utilizadas na obtenção de isolados haplóides recombinantes. Para isso, cada diplóide foi inoculado, por ponto, no centro de 5 placas de MC (3.1.2.2.) contendo a solução benlate (3.1.3.6.). As placas foram incubadas por 7-10 dias a 37^o C. O benomil, princípio ativo do fungicida comercial benlate, interfere na mitose e, portanto, favorece a haploidização com a formação de setores vigorosos (Hastie, 1970). Os setores foram purificados por estria em MC e isolados.

3.2.7. Caracterização genética das linhagens

A caracterização genética das linhagens de *A. nidulans* foi realizada por meio da análise do crescimento ou ausência de crescimento em meios seletivos. Sendo assim, estas foram incubadas em placas mestras (26 pontos) contendo MC (3.1.2.2.) por 50~70 horas a 37°C. Posteriormente, com o auxílio de um replicador multifio de 26 pontos, fez-se a repicagem das colônias nos meios seletivos (3.1.2.8.). Após 48 horas de cultivo a 37°C, fez-se a leitura do crescimento ou não de cada linhagem nos diferentes meios.

3.2.8. Determinação do diâmetro dos conídios

A determinação do diâmetro dos conídios de *A. nidulans*, foi realizada sob microscópio óptico (400x), com a utilização de uma câmara micrométrica. Foram mensuradas 12 cadeias de 3 conídios para cada linhagem e os resultados corrigidos para μm .

As lâminas foram montadas colocando-se uma gota de corante lactofenol e, sobre este, alguns esporos. Por fim foi fixada sobre o sistema, uma lâminula contendo uma gota de resina (Polivinil).

3.2.9. Viabilidade dos esporos

A viabilidade dos esporos foi determinada pela relação entre o número estimado de conídios, em câmara de Neubauer, e o número de colônias desenvolvidas em MC (3.1.2.2.). As suspensões foram semeadas em placas contendo MC, após 2~3 dias de incubação foi feita a contagem do número de colônias, permitindo assim determinar a porcentagem relativa de esporos viáveis.

3.2.10. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO é um teste que indica, através de reações químicas de oxidação, a quantidade de oxigênio que seria consumida por diversos compostos orgânicos sem a intervenção de microrganismos, indicando assim, de maneira direta, a quantidade de matéria orgânica presente na amostra. Na maioria das amostras, a concentração de compostos oxidáveis quimicamente é maior do que a

daqueles que podem sofrer oxidação biológica. Assim sendo a DQO é maior que a DBO (3.2.11.).

A metodologia se baseia na utilização de um composto químico fortemente oxidante que, em meio ácido, reage com a matéria orgânica passível de oxidação transformando-a em dióxido de carbono e água. A determinação da DQO foi realizada segundo Silva & Osvaldo (1977):

- *obtenção da amostra* - durante a recuperação da biomassa (3.2.4.), foram coletados 5mL do meio de cultura (filtrado). Nestes experimentos o trabalho foi feito com amostras compostas, isto é, as amostras de repetições de um mesmo tratamento foram misturadas e quantificadas como uma só;
- *armazenamento* - antes da sua digestão, a amostra, pode ser armazenada em freezer;
- *diluição* - para a amostra isenta de cultivo, foi realizada diluição à 3% e, para as demais, à 5% com água destilada;
- *preparo para digestão* - foram colocados em balão de fundo chato e boca esmerilhada: pérolas de vidro; 5mL da amostra de vinhaça diluída; 5mL de água destilada; 10mL de bicromato de potássio (3.1.3.7.); 15mL solução de ácido sulfúrico + sulfato de prata (3.1.3.8.);
- *digestão* - o balão foi conectado a um condensador, e aquecido a 100°C com o refluxo mantido por 1 hora;
- *titulação* - após a digestão e, já com os frascos em temperatura ambiente, foi feita a titulação com SFA (3.1.3.9.), utilizando-se 3 gotas da solução ferroim (3.1.3.10.) como indicadora;
- *branco e normalidade do SFA* - para o cálculo da normalidade do SFA, foi feita a titulação da amostra SFA (pérolas de vidro; 50mL água destilada; 5mL $K_2Cr_2O_7$; 15mL H_2SO_4). Também foi necessária a digestão e titulação da amostra branco (pérolas de vidro; 10mL água destilada; 10mL $K_2Cr_2O_7$ (3.1.3.7.); 15mL H_2SO_4);
- *cálculos* - inicialmente foi determinada a normalidade para o SFA e, posteriormente, a DQO para cada amostra de vinhaça.

Normalidade do SFA = $1,25 / \text{SFA}$

$$\text{DQO} = \frac{(\text{branco} - \text{amostra}) \times \text{Normalidade SFA} \times 8000}{\text{concentração da amostra} \times 5}$$

Legenda: - SFA - volume titulado para a amostra SFA
 - branco - volume titulado para a amostra branco
 - amostra - volume titulado para a amostra vinhaça
 - concentração da amostra - volume utilizado da amostra original de vinhaça

A porcentagem de redução dos índices de DQO e DBO₅ foi calculada em relação à vinhaça não submetida ao tratamento microbiano (controle).

3.2.11. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅ a 20°C)

A DBO₅, em termos práticos, é representada pela quantidade de oxigênio consumido por determinado volume de um resíduo, em condições de metabolização da matéria biodegradável por microrganismos vivos e suas enzimas. A determinação da DBO₅ foi realizada segundo Silva & Osvaldo (1977):

- *preparo da água de diluição* - a água deionizada utilizada foi saturada de oxigênio e, posteriormente acrescida de 1mL das soluções de sulfato de magnésio (3.1.3.11.), cloreto de cálcio (3.1.3.12.), cloreto férrico (3.1.3.13.) e tampão fosfato 7,2 (3.1.3.14.);
- *volume dos frascos e diluição* - depois de previamente determinado o volume que comportava cada um dos frascos (específicos para DBO), foram preparados 2 frascos com água de diluição e 2 frascos com água de esgoto. A diluição utilizada para a vinhaça submetida ao cultivo foi de 5%. Foram colocados 2mL em dois frascos e 3mL em mais 2 frascos, isto é, foram dosados 2 repetições em 2 diluições. Para a amostra controle (sem inóculo) procedeu-se igualmente, entretanto com uma solução a 3% e foram colocados 2 e 4mL nos frascos;
- *incubação e preparo para leitura* - o volume da amostra foi determinado e colocado no frasco DBO, sendo este posteriormente completado com água de

diluição. Os frascos foram mantidos por 5 dias a 20°C. Passada a incubação, foram retirados 6,5mL de cada frasco, e adicionados 2mL da solução de sulfato de manganês (3.1.3.15.), 2mL solução azida sódica (3.1.3.16.) e 2mL de ácido sulfúrico concentrado (P.A.). Após a colocação de cada reagente foi necessário agitar o frasco algumas vezes por inversão;

- **titulação** - 200mL do frasco foram transferidos para um erlenmeyer e titulados com tiossulfato de sódio 0,025N (3.1.3.17.) sob agitação magnética utilizando a solução de amido (3.1.3.18.) como indicadora. O volume de tiossulfato utilizado foi, então, submetido aos cálculos;
- **cálculos** - primeiramente foi determinado o valor A, que é o quanto da amostra está presente nos 200mL titulados. Para isso foi considerada a diluição utilizada, qual o seu volume e qual o volume do frasco. Considerando-se que cada mililitro da solução de tiossulfato possui 0,2mL de O₂, a quantidade de oxigênio titulado foi calculada da seguinte maneira:

(volume titulado para água de diluição - volume titulado para a amostra) x 0,2 = valor B

Para o cálculo da DBO₅, uma regra de três:

valor A	-----	valor B
1000	-----	DBO ₅

3.2.12. Caracterização morfológica

Após o cultivo por 96 horas em meio vinhaça (3.1.3.2.), as colônias das linhagens de *A. nidulans* foram fotografadas e posteriormente analisadas quanto à sua morfologia.

3.2.13. Análise dos resultados

Os resultados quantitativos provenientes dos diferentes ensaios foram submetidos a análise estatística. As análises foram realizadas nos programas Excel, SAS e Ajuste (Unicamp), sendo que as marchas analíticas foram conduzidas diferentemente segundo o delineamento e o objetivo do experimento. Os resultados brutos, bem como as análises de variâncias são apresentados no apêndice deste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronização do meio de cultivo

Com o objetivo de determinar uma composição padrão a ser utilizada como meio vinhaça, foi feita a adequação desta às condições de superior produtividade para a linhagem BM de *A. nidulans*. Para isto, foi considerada a influência da composição do meio de cultura no crescimento radial das colônias cultivadas em meio sólido.

Numa primeira etapa, foi realizada a avaliação da suplementação da vinhaça (3.1.4.) com melaço de cana-de-açúcar (3.1.5.). O melaço, que é predominantemente composto por sacarose, já foi relatado como capaz de suprir a deficiência em açúcares apresentada pelo vinhoto e assim proporcionar produtividade superior ao processo de conversão em biomassa (Delgado *et al.*, 1975; Kiyan, 1988; Selim *et al.*, 1991).

Posteriormente foi avaliada a suplementação da vinhaça com solução NPK (3.1.3.1.). Como já apresentado no item 2.2.2.4., suprimentos de nitrogênio e fósforo também podem ser benéficos ao processo de cultivo (Serzedello, 1966, 1970; Delgado *et al.*, 1975; Araújo *et al.*, 1977; Selim *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 1992).

4.1.1. Vinhaça suplementada com melaço

Primeiramente foi avaliado o crescimento de colônias (3.2.3.) da linhagem BM de *A. nidulans*, incubadas a 37°C em placas contendo meio de cultura vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%), suplementado de doses crescentes de melaço (3.1.5.). O experimento teve delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo. Foram avaliadas 10 repetições de cada tratamento com 24 e 48h de cultivo. Os resultados médios estão apresentados na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2. Adição de melaço à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM incubadas a 37°C. Resultados médios referentes a 10 repetições. Experimento conduzido inteiramente casualizado e subdividido no tempo (24 e 48 horas).

melaço adicionado (g) em 100mL de vinhaça	diâmetro médio das colônias (cm)	
	24 horas	48 horas
0	0,41	0,79
1	0,51	1,12
2	0,54	1,29
3	0,58	1,34
4	0,59	1,42
5	0,60	1,44

Coeficiente de Variação (CV) = 44,0 %

A análise de variância dos resultados, referentes ao crescimento das diferentes colônias, permitiu verificar que a variação entre os meios é significativa à 1% de confiança, bem como a interação deles com o tempo, apresentando valores de $F=179$ e 54 , respectivamente.

O aumento da concentração de melaço apresentou correlação de $0,92$ com o diâmetro da colônia. Diante deste dado, foi decidido adicionar 2g de melaço (3.1.5.) para cada 100mL de vinhaça (3.1.4.), valor este semelhante ao verificado na literatura. A significância da interação entre os meios e o tempo é justificada pela importância dos açúcares nas primeiras horas do cultivo (Martelli & Sousa, 1978).

Figura 2. Adição de melaço à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM incubadas a 37°C. Resultados referentes aos valores médios de 10 repetições, em experimento inteiramente casualizado e subdividido no tempo (24 e 48 horas).

4.1.2. Vinhaça suplementada com solução NPK

Visando determinar a possível necessidade de suplementar a vinhaça com sais de NPK, foi avaliado, em dois testes, o crescimento radial (3.2.3.) de colônias de *A. nidulans* BM incubadas a 37°C em vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e suplementadas com diferentes concentrações da solução NPK (3.1.3.1.). Como controle, foi utilizado o vinhoto adicionado das fontes de NPK empregadas no MC (3.1.2.2.), isto é, 6g NaNO₃ + 1,5g KH₂PO₄ + 0,5g KCl para cada litro de vinhaça.

No primeiro ensaio, foram avaliadas doses de 0~12% da solução NPK na vinhaça, em um experimento inteiramente casualizado, subdividido no tempo (43 e 67 horas), com 16 repetições. No segundo teste, realizado com 7 repetições e também inteiramente casualizado, o intervalo de análise foi de 0~2,5% da solução NPK no meio, com a leitura após 68 de incubação. Os resultados médios de ambos os ensaios estão apresentados na Tabela 3 e Figura 3.

Tabela 3. Adição da solução NPK à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM incubadas a 37°C. Valores referentes ao diâmetro das colônias (cm), considerando para: experimento I- valores médios de 16 repetições com delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo (43 e 67 horas); experimento II- valores médios de 7 repetições com delineamento inteiramente casualizado e leitura após 68 horas de cultivo.

diâmetro da colônia (cm)				
experimento I			experimento II	
	cultivo (horas)			cultivo (horas)
NPK (%)	43	67	NPK (%)	68
0 + ∇	0,74	1,52	0 + ∇	0,73
0	1,03	1,62	0	0,69
2	0,72	1,37	0,5	0,78
4	0,65	1,26	1	0,61
6	0,51	1,04	1,5	0,69
8	0,49	1,07	2	0,74
10	0,47	1,02	2,5	0,67
12	0,50	0,93		

▽- 6g NaNO₃ + 1,5g KH₂PO₄ + 0,5g KCl em 1 litro de meio de cultivo

experimento I - CV=39,7%

experimento II - CV= 13,6%

Em ambos experimentos, a análise do diâmetro das colônias permitiu verificar que é significativo (1%) o efeito da variação da concentração de NPK, tendo apresentado valores de F= 240 e de 3,4 para os experimentos I e II, respectivamente. Entretanto, a correlação entre o crescimento radial e o aumento da solução NPK no meio foi de -0,91 e -0,15, respectivamente para os ensaios I e II.

O tratamento controle proporcionou desempenho semelhante à vinhaça pura. Assim sendo, foi decidido não suplementar o vinhoto com NPK e considerado que, possivelmente, o efeito observado se deveu ao fato da vinhaça ser proveniente de uma destilaria piloto (ESALQ), onde são frequentes as variações na composição da vinhaça.

Por fim, para os experimentos subsequentes foi padronizado que o meio líquido vinhaça (3.1.3.2.) seria obtido pela suplementação de 2g de melaço em 100mL de vinhoto (pH 6,8 ajustado com NaOH 4N), e adicionado de ágar (1,5%) no caso de meios sólidos.

Figura 3. Adição da solução NPK à vinhaça (pH 6,8 + ágar 1,5%) e seus efeitos no crescimento radial das colônias de *Aspergillus nidulans* BM, incubadas a 37°C. Experimento I- os valores médios de 16 repetições em dois tempos de cultivo (43 e 67 horas), com delineamento inteiramente casualizado; para Experimento II: valores médios de 7 repetições incubadas por 68 horas, com delineamento inteiramente casualizado. As setas indicam o tamanho das colônias cultivadas no meio controle (6g NaNO₃ + 1,5g KH₂PO₄ + 0,5g KCl em 1 litro de vinhaça).

4.2. Biodegradação da vinhaça por espécies do gênero *Aspergillus*

O objetivo desta segunda etapa do trabalho, foi determinar por meio de uma avaliação comparativa, se *A. nidulans* (Abnc) poderia ser considerada uma espécie capaz de converter e biodegradar a vinhaça. Para isto, seu desempenho foi comparado ao das espécies *A. niger*, *A. oryzae* e *A. sulphureus*, já citadas como apreciáveis para este processo (2.2.1.2.).

Objetivando determinar uma temperatura comum favorável às 4 espécies, primeiramente foi feita a avaliação do crescimento radial destas sob diferentes temperaturas de cultivo. Uma vez obtido este valor, o mesmo foi utilizado para os experimentos subseqüentes de produção de biomassa seca e de redução da poluição (DQO, DBO₅).

4.2.1. Crescimento em meio sólido vinhaça a diferentes temperaturas

Foi realizada a avaliação do crescimento radial (3.2.3.) das espécies (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. sulphureus*), quando cultivadas em meio vinhaça (3.1.3.2.) sob diferentes temperaturas de incubação (27°C, 32°C e 37°C). O experimento teve seu delineamento inteiramente casualizado em fatorial (espécies X temperatura), com 6 repetições de cada tratamento. Foram realizadas 2 leituras no tempo (35 e 70 horas) e os resultados médios são apresentados na Tabela 4 e Figura 4.

A análise de variância dos valores obtidos para o crescimento radial das colônias permitiu verificar que, em ambas leituras (35 e 70 horas), os fatores temperatura, espécie, bem como a interação entre eles são significativos ao nível de 1% de confiança.

Estes resultados permitiram sugerir a(s) temperatura(s) mais apropriada(s) ao cultivo de cada espécie. Para *A. sulphureus*, foi verificado um desenvolvimento superior a 32°C, enquanto que seu desempenho foi similar nas outras temperaturas. Para *A. nidulans*, a melhor condição foi a 37°C (pouco superior a 32°C). Para *A. oryzae* a 32°C e para *A. niger*, o resultado da temperatura a 32°C foi igual a 37°C. A conclusão foi que a temperatura de 32°C era a mais favorável ao desenvolvimento das espécies avaliadas e que os próximos experimentos envolvendo as mesmas seriam realizados a 32°C.

Neste experimento de crescimento radial, ficaram distintos dois grupos: um, formado pelas espécies de micélio aéreo *A. niger* e *A. oryzae*, que obtiveram os maiores índices de crescimento (salvo *A. oryzae* a 37°C); o outro, o grupo de micélio do tipo "normal", representado por *A. nidulans* e *A. sulphureus*, que apresentaram desempenho inferior. A conclusão foi de que o crescimento em placas não poderia ser um dos parâmetros comparativos entre as espécies, uma vez que elas não apresentam o mesmo tipo de micélio.

Tabela 4. Efeito da temperatura de incubação no crescimento radial de espécies do gênero *Aspergillus* cultivadas em meio vinhaça sólido. Os valores, expressos em centímetros, são os diâmetros médios de 6 repetições, com delineamento experimental inteiramente casualizado em fatorial (temperatura X espécies). Foram realizadas duas leituras no tempo, uma com 35 horas e outra com 70 horas.

temperatura (°C)	diâmetro da colônia (cm)							
	<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>A. sulphureus</i>	
	cultivo (horas)		cultivo (h)		cultivo (h)		cultivo (h)	
	35	70	35	70	35	70	35	70
27	0,63	1,96	1,56	4,26	1,70	4,19	0,49	1,24
32	0,70	2,15	1,72	4,66	1,87	4,47	0,56	1,27
37	0,76	2,35	1,90	5,05	2,04	4,75	0,62	1,26

CV=185,0%

Figura 4. Efeito da temperatura (27, 32 e 37°C) de incubação no crescimento radial de espécies do gênero *Aspergillus*, cultivadas em meio vinhaça sólido. Os valores são médias de 6 repetições e de 2 leituras no tempo (35 e 70 horas), com o delineamento experimental inteiramente casualizado em fatorial (temperatura X espécies).

4.2.2. Produção de biomassa seca em meio líquido vinhaça

Levando em consideração que a biomassa seca é o principal produto final do processo da bioconversão do vinhoto e que esta poderia ser utilizada como parâmetro de comparação entre as diferentes espécies de *Aspergillus*, foi dado prosseguimento à avaliação da produção da mesma em meio líquido vinhaça (3.1.3.2.).

A determinação da produção de biomassa seca (3.2.4.) foi feita por meio de um experimento, inteiramente casualizado, com 3 repetições e uma única leitura no tempo (38 horas). As condições de cultivo foram: agitação 120 rpm, a 32°C (valor determinado no item 4.2.1.), inóculo de $0,7 \times 10^7$ esporos e 50mL de meio (erlenmeyer 250mL). Os resultados médios são apresentados na Tabela 5 e graficamente na Figura 5.

Tabela 5. Produção de biomassa seca por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, cultivadas por 38h em meio vinhaça a 32°C, 50mL de meio, agitação 120 rpm e inóculo $0,7 \times 10^7$ esporos. Valores médios de 3 repetições.

espécies	<i>A. sulphureus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
biomassa seca (g)	0,40794	0,50744	0,36920	0,49381

CV = 14,9%

Figura 5. Produção de biomassa seca realizada por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, cultivadas por 38h em meio vinhaça a 32°C, 50mL de meio, agitação 120 rpm, inóculo $0,7 \times 10^7$ esporos. Valores médios de 3 repetições.

Pela análise de variância dos valores obtidos com a produção de biomassa seca foi verificado que é significativa (1%) a variação entre a produtividade das 4 espécies. Entretanto, esta diferença não é tão abrupta quanto aquela que ocorre no experimento em placas a 32°C, bem como parece não obedecer à mesma ordem de "desempenhos". Sendo assim, pode ser inferido que o tipo de micélio não influencia tanto neste parâmetro (biomassa) quanto o faz no crescimento em placas.

Também foi feita a comparação entre as médias das espécies pelo teste de Tukey à 5% de confiança (Tabela 6). Foi verificado que *A. nidulans* e *A. niger* apresentaram o melhor desempenho sendo, porem, significativamente igual entre elas.

A conclusão foi de, que a produção de biomassa seca pode ser utilizada como parâmetro de comparação entre as 4 espécies de *Aspergillus*, e que o desempenho apresentado por *A. nidulans*, nestas condições (meio de cultivo, tempo de incubação, e inóculo), foi apreciável quando comparado ao relatado na literatura.

Tabela 6. Teste de Tukey, considerando os valores obtidos com a produção de biomassa seca por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Experimento inteiramente casualizado, com 3 repetições e uma leitura no tempo (38 horas). As barras representam semelhança, à 5% de confiança, entre as médias dos tratamentos, e as letras **a**, **b** e **c** representam os grupos significativamente diferentes.

espécies	
<i>A. nidulans</i>	
<i>A. niger</i>	a
<i>A. sulphureus</i>	b
<i>A. oryzae</i>	c

4.2.3. Redução da carga poluente da vinhaça

Objetivando à comparação das espécies de *Aspergillus* quanto à capacidade de biodegradar a vinhaça, foi dado prosseguimento à avaliação destas quanto à redução dos índices de DQO (3.2.10.) e DBO₅ (3.2.11.) da vinhaça.

Nestes experimentos foram utilizadas amostras do meio de cultura vinhaça (3.1.3.2.), que havia sido usado no ensaio de produção de biomassa seca (4.2.2.), isto é, o meio de cultura foi coletado durante a filtração da biomassa e estocado como prescrito no item 3.2.10.. Foram coletados 5mL desse resíduo de cada repetição que foram misturados compondo uma amostra mista. Esta amostra mista foi submetida à determinação dos índices de poluição. Como controle, foi utilizada a amostra composta por vinhaça submetida ao cultivo, mas isenta de inóculo. A amostra controle apresentou respectivamente DQO e DBO₅ igual a 53,25 e 13,81 gramas de oxigênio por litro de meio.

4.2.3.1. Redução da DQO

Para a determinação da DQO (3.2.10.), foi realizada a digestão com leitura de 2 repetições provenientes da diluição de cada amostra composta. Uma vez obtidos os valores referentes à DQO das diferentes amostras, estes foram transformados em percentual de redução em relação ao meio controle. Os resultados médios são apresentados na Tabela 7 e graficamente, na Figura 6.

Através da análise de variância, foi verificada ser significativa (1%) a diferença entre as 4 espécies de *Aspergillus*, quanto à capacidade de reduzir (percentual) a DQO da vinhaça (F=106). O teste de Tukey (Tabela 8) posicionou *A. nidulans* como a pior redutora da DQO, agrupando-a (à 5% de confiança) somente com *A. sulphureus*.

Tabela 7. Porcentagem de redução da DQO da vinhaça pelo cultivo de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Os valores são as médias referentes à digestão de 2 repetições por amostra composta, posteriormente transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo.

espécies	<i>A. sulphureus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
redução DQO (%)	34,73	31,125	43,425	48,27
CV=18,6%				

Tabela 8. Teste de Tukey, considerando os valores obtidos com a porcentagem de redução da DQO por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Os resultados analisados são referentes à digestão de 2 repetições por amostra composta e posterior transformação (porcentagem de redução) em função do meio isento de inóculo. As barras representam semelhança, à 5% de confiança, entre as médias dos tratamentos e as letras a, b e c representam os grupos significativamente diferentes.

espécies	
<i>A. niger</i>	a
<i>A. oryzae</i>	b
<i>A. sulphureus</i>	
<i>A. nidulans</i>	c

4.2.3.2. Redução da DBO₅ a 20°C

A determinação da porcentagem de redução da DBO₅ foi efetuada conforme prescrito no item 3.2.11. Para cada amostra composta, foram avaliadas 2 diferentes diluições, cada uma com 2 repetições. Uma vez obtidos os valores referentes à DBO₅ das diferentes amostras, estes foram transformados em percentual de redução em relação ao meio controle (não inoculado). Os resultados médios são apresentados na Tabela 9 e na Figura 6.

A análise de variância foi significativa ($F=18$ a 1% de confiança) entre as linhagens quanto à capacidade de reduzirem a DBO₅ da vinhaça. Entretanto, as linhagens não foram diferenciadas pelo Teste de Tukey (5%).

Tabela 9. Porcentagem de redução da DBO (5 dias, 20°C) da vinhaça pelo cultivo de diferentes espécies do gênero *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Os valores são as médias referentes à digestão de 4 repetições (2 por diluição) de cada amostra composta, posteriormente transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo.

espécies	<i>A. sulphureus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
redução DBO ₅ (%)	50,51	55,85	57,96	61,88

CV = 10,5%

Figura 6. Porcentagem de redução da poluição da vinhaça pelo cultivo de diferentes espécies de *Aspergillus*. Amostra composta (3 repetições) coletada após incubação por 38h, a 32°C, agitação 120 rpm, em 50mL de meio líquido vinhaça. Em ambos experimentos os valores obtidos foram transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo. Para a DQO, os valores são médias referentes à digestão de 2 repetições por amostra composta e, para DBO₅, os valores são médias referentes à digestão de 4 repetições (2 por diluição) de cada amostra composta.

Considerando os resultados observados na produção de biomassa seca e biodegradação da vinhaça (DQO e DBO₅), foi verificado que, realmente, estas espécies variam significativamente quanto aos parâmetros avaliados. Entretanto, a espécie *A. nidulans* apresentou resultados satisfatórios quanto à produção de biomassa e redução da DBO₅. Assim *A. nidulans* foi considerada como capaz de converter e biodegradar a vinhaça.

4.3. Obtenção de linhagens diplóides e segregantes

A terceira etapa deste trabalho, teve como propósito a obtenção de linhagens diplóides e haplóides recombinantes de *A. nidulans*, para serem posteriormente avaliadas quanto à capacidade de utilizar a vinhaça, bem como biodegradá-la.

A obtenção de linhagens diplóides e segregantes seguiu a metodologia apresentada nos itens 3.2.5. e 3.2.6., respectivamente. Iniciando com as linhagens MSE, A, PPY, BM, foram obtidos alguns diplóides e, posteriormente as linhagens recombinantes, como representado na Figura 7.

Para certeza de que as linhagens isoladas eram diplóides, foi verificada a sua capacidade de crescer em MM, a propriedade de formar setores quando induzidas por benomil, bem como o diâmetro dos conídios.

Figura 7. Representação gráfica da filogenia das linhagens obtidas

Com o objetivo de determinar a ploidia das diferentes linhagens de *A. nidulans* obtidas, foi feita a determinação do diâmetro dos conídios como descrito no item 3.2.8.. Os valores médios obtidos estão apresentados na Tabela 10 e o histograma dos mesmos, na Figura 8.

Todas as linhagens diplóides foram capazes de crescer em MM, bem como formar setores quando cultivadas em meio contendo benomil. A determinação do diâmetro dos conídios permitiu a discriminação de duas classes, uma constituída pelas linhagens haplóides (parentais, controle, recombinantes) e outra formada pelas linhagens diplóides. Assim como relatado por Clutterbuck (1968) em *A. nidulans* e por Kirimura *et al.* (1988) em *A. niger*, o diâmetro dos conídios diplóides foi 20~25% maior que o dos haplóides.

Tabela 10. Diâmetro dos conídios das linhagens de *Aspergillus nidulans*, valores referentes ao diâmetro (μm) de um conídio, calculado a partir da média das leituras de 12 cadeias com 3 conídios cada.

linhagem	diâmetro (μm)	linhagem	diâmetro (μm)
MSE	2,91	Rec M//P 11	2,83
PPY	3,30	Rec M//P 12	3,28
BM	3,24	Rec M//P 15	2,89
VE	3,26	Rec M//P 16	3,29
PPY//BM	4,09	Rec M//P 18	3,01
MSE//BM	4,15	Rec M//P 19	3,06
MSE//PPY1	4,11	Rec M//P 20	2,94
Rec M//P 1	3,35	Rec M//B 4	3,19
Rec M//P 2	3,25	Rec M//B 5	3,27
Rec M//P 3	3,06	Rec M//B 6	3,13
Rec M//P 4	3,28	Rec M//B 7	3,02
Rec M//P 5	3,30	Rec P//B 4	3,26
Rec M//P 7	3,30	Rec P//B 6	3,41
Rec M//P 9	3,20	Rec P//B 10	3,17
Rec M//P 10	3,14		

CV= 10,7%

Figura 8. Histograma da distribuição das linhagens do gênero *Aspergillus nidulans* em função do diâmetro do conídio. Valores médios por conídio, obtidos a partir das leituras de 12 cadeias com 3 conídios cada, posteriormente transformados em µm.

4.4. Cinética do crescimento de linhagens de *A. nidulans* cultivadas em meio vinhaça

O objetivo desta quarta etapa do trabalho foi determinar:

- a cinética de crescimento de linhagens haplóides e diplóides de *A. nidulans*, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre elas.

- a relação existente entre o diâmetro da colônia e a produção de biomassa, com intuito de verificar se os resultados obtidos com experimentos em placas podem ser extrapolados para a biomassa;
- o tempo médio de cultivo necessário para atingir o final da fase *log* de crescimento, com o intuito realizar um novo experimento com mais linhagens neste tempo determinado.

Para isso, foi avaliado o crescimento de algumas linhagens haplóides e diplóides em meio vinhaça (líquido e sólido) em função do tempo de cultivo. Uma vez obtidos os resultados, a média destes foi ajustada segundo o modelo logístico como proposto por Prosser (1995) e Solomons (1985), utilizando para tanto, o programa Ajuste da UNICAMP (3.2.13.).

Para a transformação dos dados originais e a obtenção da curva de crescimento, foi necessário o cálculo da equação logística para cada linhagem. Para tal fim foi determinada a assintótica da equação que melhor se ajustava aos dados originais, através do coeficiente de correlação entre eles (equação e dados originais).

4.4.1. Crescimento em meio sólido em função do tempo

O diâmetro das diferentes colônias foi mensurado como prescrito no item (3.2.3.). As linhagens MSE, A, PPY, BM, MSE//A, MSE//PPY1 e MSE//BM foram cultivadas a 37°C em meio vinhaça (3.1.3.2.), por 7 dias, sendo realizada uma leitura a cada 24 horas. O experimento teve delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo. Os resultados médios de 5 repetições são apresentados na Tabela 11 e as curvas de crescimento, obtidas à partir dos dados ajustados pela equação logística, estão na Figura 9.

A análise de variância dos resultados obtidos possibilitou determinar variação significativa entre as linhagens, os tempos, bem como a interação entre estes parâmetros, apresentando $F=824$, 5876 , e 49 , respectivamente.

Foi verificado que a linhagem MSE e as diplóides apresentaram melhor desempenho e foram capazes de iniciar a fase *log* do crescimento mais rapidamente do que as demais haplóides, que apresentaram produtividade bem inferior. Além disso, ficou evidente a influência das diferentes marcas genéticas no crescimento.

Tabela 11. Diâmetro das colônias de *Aspergillus nidulans* em função do tempo de cultivo em meio vinhaça, a 37°C. Resultados médios em centímetros referentes a 5 repetições, com delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo (1 a 7 dias).

linhagens	tempo de cultivo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
MSE	1,16	2,72	4,48	6,22	7,82	8,63	8,77
A	0,63	1,32	2,48	3,57	4,64	5,68	5,84
PPY	0,55	1,55	1,84	3,28	4,06	4,56	4,67
BM	0,51	1,88	3,23	4,57	5,65	6,54	6,99
MSE//A	1,20	2,92	4,68	6,53	8,11	8,87	8,86
MSE//PPY1	1,15	2,88	5,01	6,85	8,74	8,90	8,88
MSE//BM	1,34	2,71	5,01	6,81	8,37	8,75	8,69

CV=57,1%

Figura 9. Cinética do crescimento radial de diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio vinhaça a 37°C. Os resultados médios de 5 repetições foram ajustados pela regressão logística e o experimento teve delineamento inteiramente casualizado e subdividido no tempo.

4.4.2. Produção de biomassa em meio líquido em função do tempo

A produção de biomassa seca (3.2.4.) foi determinada em função do tempo de cultivo para diferentes linhagens de *A. nidulans* (MSE, A, PPY, BM, MSE//A, MSE//PPY1, MSE//BM) incubadas em 100mL de meio vinhaça líquido, a 37°C, agitação 150 rpm e inóculo 9×10^6 esporos. O experimento foi conduzido em fatorial com blocos ao acaso, utilizando-se 3 blocos contendo todos os tratamentos. Os resultados médios são apresentados na Tabela 12 e as curvas de crescimento, obtidas a partir dos dados ajustados pela equação logística, estão na Figura 10.

Tabela 12. Produção de biomassa seca por *Aspergillus nidulans* em função do tempo de cultivo em meio líquido vinhaça. Cultivo em 100mL de meio, a 37°C, agitação 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos, por 60 horas com leituras a cada 12 horas. Resultados médios em gramas de biomassa seca por 100mL de meio, referentes a 3 repetições (blocos), de um experimento em fatorial com blocos ao acaso.

linhagens	tempo de cultivo (horas)				
	12	24	36	48	60
MSE	0,00732	0,20459	0,84202	1,00424	1,07977
A	0,00424	0,19270	0,71052	0,71911	0,87624
PPY	0,00406	0,15739	0,60403	0,67245	0,79182
BM	0,01973	0,26612	0,52611	0,85975	0,94570
MSE//A	0,06970	0,72385	1,01227	1,01369	1,06220
MSE//PPY1	0,04952	0,50692	0,88247	0,98113	1,04416
MSE//BM	0,07640	0,67216	0,77982	0,95568	1,02993

CV=64,12%

Figura 10. Cinética da produção de biomassa seca por *Aspergillus nidulans* incubada em meio vinhaça. Cultivo em 100mL de meio, a 37°C, agitação 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos, por 60 horas com leituras a cada 12 horas. Os resultados médios (3 blocos) foram ajustados pela regressão logística e o experimento foi conduzido em blocos ao acaso.

Assim como no experimento de crescimento radial em meio sólido, a produção de biomassa seca foi significativamente (1%) diferente para as fontes de variação linhagens, tempos e interação ($F= 18; 263; 2,65$, respectivamente). Neste experimento, ficou mais evidente a tendência dos diplóides em apresentarem uma fase de adaptação (*lag*) mais curta que as demais linhagens haplóides. Entretanto, com relação à produção final, a linhagem MSE ainda foi semelhante às diplóides.

Comparando o desempenho relativo das linhagens nos dois experimentos, foi possível verificar que os parâmetros ensaiados apresentam tendência de se correlacionarem. Entretanto, deve ser considerada a diferença na magnitude do F observado para ambos, isto é, as linhagens variam menos quanto à produção de biomassa seca, do que em relação ao crescimento radial.

Foi também determinada a equação logística média para todas as linhagens no experimento de produção de biomassa. À partir da assintótica desta regressão média, foi calculado o tempo de cultivo necessário para que as linhagens produzissem 90% do seu máximo (assintótica), sendo este tempo de 43 horas de incubação.

4.4.3. Viabilidade dos esporos

Objetivando constatar se o fato dos diplóides iniciarem antes a fase *log*, ocorre pela viabilidade superior de seus conídios, o passo seguinte foi a avaliação da viabilidade esporos. A determinação da viabilidade dos esporos utilizados nos 3 blocos do ensaio de cultivo das linhagens em meio líquido (4.4.2.), foi efetuada como prescrito no item 3.2.9., com 2 a 4 repetições por experimento. Os resultados médios são apresentados na Tabela 13 e, graficamente, na Figura 11.

A partir da análise de variância conjunta (3 blocos), foi possível verificar que as linhagens variam significativamente (1%) quanto à viabilidade dos esporos, apresentando $F=16$. A correlação entre a viabilidade dos esporos e a produção de biomassa seca após 12 e 60 horas de cultivo, foi de 0,044 e 0,017, respectivamente. Foi constatado então que não existe relação entre a produtividade observada nos diplóides e a viabilidade de seus esporos e, além disso, a linhagem que pior produziu biomassa, foi a que apresentou melhor viabilidade.

Desta forma, o fato das linhagens diplóides tenderem a iniciar antes a fase *log*, foi atribuído a sua superior capacidade em se adaptar ao meio vinhaça, em relação às haplóides. Isto já foi sugerido por Das & Roy (1978) no caso da produção de ácido cítrico em *A. niger*.

Tabela 13. Porcentagem de viabilidade dos esporos de linhagens de *Aspergillus nidulans*, média de 3 experimentos. Valor obtido pela relação entre o número de esporos semeados e os que germinaram em MC.

linhagens	viabilidade (%)
MSE	49,14
A	38,95
PPY	54,30
BM	42,83
MSE//A	51,44
MSE//PPY1	37,17
MSE//BM	47,75

Figura 11. Porcentagem de viabilidade dos esporos de linhagens de *Aspergillus nidulans*, média de 3 experimentos. Valor obtido pela relação entre o número de esporos semeados e os que germinaram em MC.

4.5. Avaliação de linhagens haplóides, diplóides e segregantes de *A. nidulans* em meio vinhaça

Na última etapa deste trabalho, foram avaliadas algumas linhagens haplóides, diplóides e recombinantes de *A. nidulans*, quanto à capacidade de converter a vinhaça, bem como biodegradá-la. A linhagem haplóide prototrófica VE de *A. nidulans* foi utilizada como controle em todos os ensaios.

Primeiramente, as linhagens foram cultivadas em meio vinhaça com o intuito de determinar o crescimento radial, a produção de biomassa e a redução da DQO da vinhaça. Em seguida, foram realizados ensaios qualitativos de caracterização genética e morfológica, com o intuito de verificar possíveis relações entre os parâmetros quantitativos e qualitativos.

4.5.1. Crescimento em meio sólido

Diferentes linhagens de *A. nidulans* foram submetidas ao cultivo em meio sólido vinhaça (3.1.3.2.) e avaliadas quanto ao diâmetro das colônias (3.2.3.) com 48 e 96 horas de incubação a 37°C. A condução do experimento foi inteiramente casualizada. Os resultados médios de 3 repetições, bem como a relação das linhagens avaliadas são apresentados na Tabela 14.

A análise de variância foi feita separadamente para cada tempo. Foi constatada que é significativa, a 1% de confiança, a variação entre as linhagens, apresentando para o cultivo por 48 e 96 horas, F igual a 98 e 207 respectivamente. A correlação entre as duas leituras no tempo foi de 0,97.

A análise variância, permitiu também verificar que não foi significativa a diferença entre os 3 grupos de recombinantes, isto é, entre os Rec M//P, Rec M//B e Rec P//B.

Além disso, foi constatada significância (5%) quanto à variação entre os tipos de tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes), apresentando $F = 3,45$ para incubação por 48 horas. O teste de Tukey foi significativo (5%) entre as médias apresentadas pelos tratamentos diplóides e recombinantes quando cultivadas por 48 horas, não sendo porem significativo com 96 horas de incubação.

Estes dados levam a concluir que existe variação significativa entre as linhagens, pois embora não seja significativa entre os tipos de recombinantes, ela o é entre este grupo e os diplóides.

Tabela 14. Crescimento radial de linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio sólido vinhaça, a 37°C, sendo o diâmetro das colônias mensurado após 48 e 96 horas de incubação. Os resultados são expressos em centímetros e referentes à média de 3 repetições.

diâmetro das colônias (cm)					
linhagens	cultivo (horas)		linhagens	cultivo (horas)	
	48	96		48	96
MSE	2,53	6,27	Rec M//P 11	1,22	3,44
PPY	1,43	3,52	Rec M//P 12	1,27	3,87
BM	2,13	5,15	Rec M//P 13	3,18	6,98
VE	3,02	6,67	Rec M//P 15	1,28	3,08
MSE//PPY1	3,19	6,95	Rec M//P 16	1,20	2,97
MSE//PPY2	3,11	6,65	Rec M//P 17	3,19	6,85
MSE//PPY3	3,34	7,07	Rec M//P 18	2,63	6,23
MSE//BM	2,95	6,82	Rec M//P 19	2,41	6,45
PPY//BM	2,38	6,57	Rec M//P 20	1,50	3,74
Rec M//P 1	2,27	5,73	Rec M//B 4	1,65	3,77
Rec M//P 2	2,63	6,05	Rec M//B 5	2,17	5,77
Rec M//P 3	2,67	6,45	Rec M//B 6	1,60	3,45
Rec M//P 4	3,33	7,50	Rec M//B 7	1,77	4,85
Rec M//P 5	1,32	3,59	Rec P//B 4	0,80	2,89
Rec M//P 7	1,25	3,48	Rec P//B 6	2,70	6,40
Rec M//P 9	1,42	3,53	Rec P//B 10	2,62	6,33
Rec M//P 10	1,45	3,62			

CV=45,4%

4.5.2. Produção de biomassa seca

Foi avaliada a produção de biomassa seca (3.2.4.) por diferentes linhagens de *A. nidulans*, incubadas a 37°C em 100mL de meio vinhaça líquido (3.1.3.2.). As linhagens foram cultivadas por 43 horas, tempo este determinado no item 4.4.2., como suficiente para que, em média, linhagens haplóides e diplóides atinjam o final da fase *log* de crescimento. O experimento foi conduzido em 4 blocos ao acaso, contendo cada bloco uma amostra de cada tratamento. Como inóculo foram utilizados $9,0 \times 10^6$ esporos e agitados a 150 rpm. Os resultados médios são apresentados na Tabela 15 e sua relação com a redução da DQO são apresentados item 4.5.3. na Figura 12.

A análise de variância dos resultados obtidos mostrou ser significativa (1%) a variação entre a produtividade das linhagens, e que também foi significativa (5%) a variação entre os blocos, com $F=3,09$.

Quando foram considerados, como fonte de variação, os vários tipos de tratamentos (controle, parentais, haplóides, diplóides), foi verificado que estes se diferenciam significativamente (1%), apresentando $F=7,39$. Entretanto quando realizado o teste desta fonte, sem o efeito dos blocos, a variação não foi significativa ($F=0,50$). A significância entre as médias dos tipos de tratamentos foi analisada pelo teste de Tukey e Newman-Keuls, sendo somente significativa (5%) a diferença para o segundo teste, onde houve a formação de 2 grupos: um de produção inferior, formado pelos recombinantes, e outro, pelos demais tratamentos (controle, parentais, diplóides).

Foi também observada diferença significativa (1%) entre tipos de recombinantes (Rec M//P, Rec M//B, Rec P//B), com $F=27$. Os testes de Tukey e Newman-Keuls apresentaram diferença significativa (5%) entre a média de todos os tipos de recombinantes (Tabela 16).

Desta forma, a conclusão foi de que a variação entre as linhagens é significativa, sendo somente distinto, entre os tipos de tratamentos, o grupo dos recombinantes em relação aos demais. E, entre os tipos de recombinantes, todos foram distintos, demonstrando a importância do genótipo de suas linhagens parentais.

Considerando que a correlação estabelecida entre a produção de biomassa e o crescimento radial foi de 0,20, também pode ser concluído que não é possível extrapolar os resultados obtidos em ensaios com meio sólido para aqueles sob agitação, quando da avaliação do desenvolvimento de linhagens de *A. nidulans* em meio vinhaça.

Tabela 15. Produção de biomassa seca por linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em 100mL de vinhaça, por 43 horas, a 37°C e agitadas a 150 rpm, sendo o inóculo de 9×10^6 esporos, em experimento conduzido em 4 blocos ao acaso. Os resultados são médias expressas em gramas de biomassa seca.

linhagem	biomassa seca (g/100mL)	linhagem	biomassa seca (g/100mL)
MSE	0,50906	Rec M//P 18	0,54629
PPY	0,54942	Rec M//P 20	0,46496
BM	0,54227	Rec M//B 4	0,39674
VE	0,55516	Rec M//B 5	0,34431
MSE//PPY1	0,68441	Rec M//B 6	0,48291
MSE//BM	0,33512	Rec M//B 7	0,27135
PPY//BM	0,61687	Rec P//B 4	0,55908
Rec M//P 11	0,53884	Rec P//B 6	0,60450
Rec M//P 15	0,46982	Rec P//B 10	0,56054

CV=20,8%

Tabela 16. Teste de Newman-Keuls aplicado aos dados obtidos no experimento de produção de biomassa seca por linhagens de *Aspergillus nidulans*, cultivadas em 100mL de meio vinhaça, por 43 horas, a 37°C, agitação 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos. Os grupos que variaram significativamente (5%) são representados por diferentes letras.

agrupamento	média	tipo de recombinante
A	0,57471	Rec P//B
B	0,50498	Rec M//P
C	0,37383	Rec M//B

4.5.3. Redução da DQO

Foi avaliada a redução da DQO da vinhaça, realizada por linhagens haplóides, diplóides e recombinantes de *A. nidulans*. Para isso, foram analisadas amostras dos meios utilizados no experimento de produção de biomassa seca, item 4.5.2. O resíduo do cultivo foi submetido à análise de DQO como prescrito no item 3.2.10., sendo os valores transformados em porcentagem de redução em função do meio isento de inóculo ($DQO = 33,41 \text{ g O}_2 / \text{litro}$). Para cada amostra mista (4 repetições) foram realizadas duas digestões. Os resultados médios destas são apresentados na Tabela 17 e a relação destes com a produção de biomassa, na Figura 12.

Pela análise de variância dos resultados obtidos com a porcentagem de redução da DQO, foi constatado que é significativa (1%) a variação entre as linhagens ($F=33$). Também foi verificado que é significativa (5%) a variação entre os tipos de tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes), apresentando $F=4,02$. O teste de Tukey foi significativo (5%) para a variação entre os tratamentos diplóides e recombinantes. A análise de variância para os diferentes grupos de recombinantes não foi significativa, apresentando $F=2,99$.

Tabela 17. Porcentagem de redução da DQO da vinhaça realizada por linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio vinhaça líquido, incubadas por 43 horas, a 37°C, inóculo 9×10^6 esporos e agitação de 150 rpm. Resultados referentes a 2 digestões por amostra mista (4 repetições), transformados em porcentagem de redução em relação ao meio isento de inóculo.

linhagem	redução DQO (%)	linhagem	redução DQO (%)
MSE	36,14	Rec M//P 18	32,53
PPY	30,86	Rec M//P 20	21,79
BM	32,29	Rec M//B 4	31,05
VE	36,14	Rec M//B 5	23,83
MSE//PPY1	45,38	Rec M//B 6	26,42
MSE//BM	32,13	Rec M//B 7	26,31
PPY//BM	39,59	Rec P//B 4	33,42
Rec M//P 11	31,59	Rec P//B 6	34,39
Rec M//P 15	29,97	Rec P//B 10	32,62

CV= 13,90%

Figura 12. Gráfico de dispersão entre as variáveis produção de biomassa seca e redução da DQO realizadas por diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans*, cultivadas em 100mL de meio vinhaça, por 43 horas, a 37°C, agitação de 150 rpm, inóculo de 9×10^6 esporos.

A correlação entre os resultados obtidos para os experimentos de produção de biomassa e redução da DQO foi de 0,71. O rendimento apresentado pelas linhagens foi calculado pela razão entre a produção de biomassa e a redução da DQO. Este índice apresentou um CV= 17%, o que prova que o parâmetro biomassa seca não corresponde a um valor fixo para DQO, isto é, para sintetizarem a mesma quantidade de biomassa as linhagens podem reduzir diferentemente a vinhaça, sendo o inverso também válido. Por exemplo, linhagens podem degradar igualmente e produzirem quantidades diferentes de biomassa. Isto permite concluir que é possível a obtenção de linhagens de *A. nidulans* com rendimentos variáveis quanto à síntese de biomassa e consumo da matéria orgânica presente na vinhaça.

Analizando a Figura 12, foi possível identificar alguns pontos importantes, relacionados abaixo:

- as linhagens parentais e controle apresentam resultados semelhantes para os parâmetros produção de biomassa e redução da DQO;
- as linhagens diplóides MSE//PPY1 e PPY//BM foram as melhores linhagens quanto à produção de biomassa e redução da DQO. A primeira apresentou, em relação a linhagem parental MSE, melhora de 25% na DQO e 36% para a biomassa e, em relação a linhagem PPY, reduziu 50% mais a DQO e produziu 25% mais biomassa;
- todas as linhagens que possuem pelo menos parte do genótipo da linhagem PPY, apresentaram boa capacidade de produzir biomassa;
- as linhagens Rec P//B variaram pouco quanto aos parâmetros avaliados e foram superiores em relação a seus ascendentes. Por exemplo, a linhagem Rec P//B 6 cresceu 11% a mais que as linhagens PPY e BM e reduziu respectivamente 6 e 13% mais a DQO em relação a estas;
- as linhagens Rec M//B foram as piores e variaram muito quanto à produção de biomassa (77%), sendo que as linhagens Rec M//P variaram quanto à redução da DQO (47%);

Sendo assim, a conclusão foi de que com a utilização de linhagens diplóides e recombinantes de *A. nidulans* é possível melhorar a capacidade desta espécie em produzir biomassa seca e biodegradar a vinhaça, sendo o sucesso do melhoramento, dependente das linhagens envolvidas no cruzamento ou na obtenção do diplóide.

4.5.4. Morfologia da colônia cultivada em meio vinhaça

A caracterização das colônias foi realizado com o intuito de verificar se existe relação entre algum tipo morfológico e linhagens de alta produtividade (biomassa) ou eficiente capacidade de biodegradar a vinhaça.

As linhagens de *A. nidulans* foram submetidas ao cultivo em meio vinhaça (3.1.3.2.), como previsto no item 3.2.12., apresentando 4 tipos diferentes de colônia: normal, compacta, difusa, residual. Os resultados estão apresentados na Tabela 18. As fotografias das linhagens haplóides parentais e controle estão na Figura 13, das diplóides na Figura 14, e dos recombinantes obtidos na Figura 15.

A respeito da morfologia, foi verificado que as linhagens como colônia do tipo residual, são as menos eficientes quanto à produção de biomassa e biodegradação da vinhaça. Além disso, foi constatado que todas as linhagens que apresentam colônia do tipo difusa possuem os marcadores genéticos *pro* e *paba*.

Tabela 18. Morfologia das colônias de linhagens de *Aspergillus nidulans* cultivadas em meio vinhaça por 96 horas.

linhagens	morfologia da colônia	linhagens	morfologia da colônia
MSE	normal	Rec M//P 9	difusa
PPY	difusa	Rec M//P 10	difusa
BM	normal	Rec M//P 11	difusa
A	normal	Rec M//P 12	difusa
VE	normal	Rec M//P 15	difusa
MSE//A	normal	Rec M//P 16	difusa
MSE//PPY1	normal	Rec M//P 18	normal
MSE//PPY2	normal	Rec M//P 19	normal
MSE//PPY3	normal	Rec M//P 20	difusa
MSE//BM	normal	Rec M//B 4	compacta
PPY//BM	normal	Rec M//B 5	residual
Rec M//P 1	normal	Rec M//B 6	compacta
Rec M//P 2	normal	Rec M//B 7	residual
Rec M//P 3	normal	Rec P//B 4	difusa
Rec M//P 4	normal	Rec P//B 6	normal
Rec M//P 5	difusa	Rec P//B 10	normal
Rec M//P 7	difusa

Figura 13. Fotografia das colônias de *Aspergillus nidulans*, utilizadas como parentais e controle. Cultivo em meio vinhaça por 96 horas, a 37°C, sendo A- MSE, B- PPY, C- BM, D- VE .

Figura 14. Fotografia das colônias diplóides de *Aspergillus nidulans*. Cultivo em meio vinhaça por 96 horas, a 37°C, sendo A- MSE//PPY, B- MSE//BM, C- PPY//BM.

Figura 15. Fotografia das colônias recombinantes de *Aspergillus nidulans* obtidas. Cultivo por 96 horas em meio vinhaça, sendo A- Rec M//P 1; B- Rec M//P 2; C- Rec M//P 3; D- Rec M//P 4; E- Rec M//P 5; F- Rec M//P 7; G- Rec M//P 9; H- Rec M//P 10; I- Rec M//P 11; J- Rec M//P 12; K- Rec M//P 15; L- Rec M//P 16; M- Rec M//P 18; N- Rec M//P 19; O- Rec M//P 20; P- Rec P//B 4; Q- Rec P//B 6; R- Rec P//B 10; S- Rec M//B 4; T- Rec M//B 5; U- Rec M//B 6; V- Rec M//B 7.

4.5.5. Caracterização genética das linhagens de *A. nidulans*

A caracterização genéticas das diferentes linhagens, foi realizada para verificar se existe relação entre os marcadores genéticos e a produtividade e ou capacidade de biodegradar a vinhaça. Além disso, houve o propósito de determinar a correlação entre o número de auxotrofia e a produção de biomassa e redução da DQO, com intuito de verificar se a superior eficiência dos diplóides é devida à prototrofia.

Para tanto, foi realizada a caracterização genética das linhagens de *A. nidulans* como prescrito no item 3.2.7., cujos resultados estão apresentados na Tabela 19. Com relação aos diplóides, somente a linhagem MSE//PPY apresentou o alelo *yA* em homozigose, as demais possuíam suas marcas genéticas em heterozigose.

Analisando conjuntamente a caracterização genética e os resultados quantitativos (biomassa e DQO), foi observado que não existe relação entre as marcas genéticas avaliadas e a produção de biomassa seca ou capacidade de reduzir a DQO.

Entretanto, foi determinada a correlação de -0,44 e -0,48 entre o número de auxotrofias e a produção de biomassa e redução da DQO, respectivamente. Estes valores sugerem que existe uma tendência das linhagens com menos auxotrofias apresentarem superior eficiência quanto aos parâmetros avaliados.

Tabela 19. Caracterização genética de diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans*.

Linhagens	grupos de ligação e respectivo marcador genético											
	I	I	I	I	II	III	IV	IV	V	VI	VII	VIII
	<i>proA</i>	<i>pabaA</i>	<i>yA</i>	<i>biA</i>	<i>wA</i>	<i>galA</i>	<i>metG</i>	<i>pyroA</i>	<i>facA</i>	<i>sB</i>	<i>nicB</i>	<i>riboB</i>
parentais (haplóides)												
MSE												
A												
PPY												
BM												
controle												
Recombinantes MSE X BM												
Rec M//B 4												
Rec M//B 5												
Rec M//B 6												
Rec M//B 7												
Recombinantes PPY X BM												
Rec P//B 4												
Rec P//B 6*												
Rec P//B 10												

* não cresce em MM

Linhagens	grupos de ligação e respectivo marcador genético											
	I	I	I	I	II	III	IV	IV	V	VI	VII	VIII
	<i>proA</i>	<i>pabaA</i>	<i>yA</i>	<i>biA</i>	<i>wA</i>	<i>galA</i>	<i>metG</i>	<i>pyroA</i>	<i>facA</i>	<i>sB</i>	<i>nicB</i>	<i>riboB</i>
Recombinantes MSE//PPY												
Rec M/P 1												
Rec M/P 2												
Rec M/P 3												
Rec M/P 4												
Rec M/P 5												
Rec M/P 7												
Rec M/P 9												
Rec M/P 10												
Rec M/P 11												
Rec M/P 12												
Rec M/P 15												
Rec M/P 16												
Rec M/P 18												
Rec M/P 19												
Rec M/P 20												

5. CONCLUSÕES

Pelo presente trabalho foi possível concluir que:

- *Aspergillus nidulans* é capaz de crescer melhor no substrato vinhaça suplementado com melaço do que na vinhaça pura.
- *Aspergillus nidulans* é capaz de biodegradar a vinhaça da cana-de-açúcar, pela utilização do resíduo como fonte de nutrientes para a síntese celular.
- o crescimento radial de *Aspergillus nidulans* em meio sólido vinhaça não apresenta correlação com a produção de biomassa seca em meio líquido vinhaça.
- é possível melhorar linhagens de *Aspergillus nidulans* quanto à capacidade de biodegradar a vinhaça, bem como converte-la em biomassa seca, pela obtenção de linhagens diplóides e recombinantes. Porém, deve ser considerado como fundamental o efeito da interação entre os genomas parentais utilizados.
- a relação entre biomassa produzida e o consumo do substrato vinhaça (redução da DQO) é variável entre as linhagens de *Aspergillus nidulans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. Vinhaça: fonte de proteína. **Brasil Açucareiro**, v. 76, p. 23-24, 1970.

APIRION, D. A general system for automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in micro-organisms. **Nature**, v. 195, p. 959-961, 1962.

ARAÚJO, N. Q.; VISCONTI, A. S.; CASTRO, H. F.; SILVA, H. G. B.; FERRAZ, M. H. A.; SALLES FILHO, M. Produção de biomassa fúngica de vinhoto. **Brasil Açucareiro**, v. 88, p. 35-45, 1976.

ARAÚJO, N. Q.; VISCONTI, A. S.; CASTRO, H. F.; SILVA, H. G. B.; FERRAZ, M. H. A.; SALLES FILHO, M. Produção de biomassa fúngica do vinhoto. **Informativo do INT**, v. 10, p. 12-19, 1977.

ARAÚJO, N. Q.; VISCONTI, A. E. S.; ESTEVES, A. M. L.; BAGGIO, C. A.; CASTRO, H. F.; SILVA, H. G. B.; FERRAZ, M. H. A.; SALLES FILHO, M.; REIS, R. F.; SCHNEIDERMAN, V. M. S.; ALMEIDA, W. R. Novas perspectivas para o tratamento microbiológico do vinhoto. **Informativo do INT**, v. 11, p. 3-8, 1978.

AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1973. 288p.

BALAGUER, M. D.; VICENT, M. T.; PARIS, J. M. Anaerobic fluidized bed reactor with sepiolite as support for anaerobic treatment of vinasse.

Biotechnology Letters, v. 14, p. 433-438, 1992.

BONATELLI JUNIOR, R. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1981. 91p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CARNEIRO, W. A indústria de proteínas no Brasil. **Brasil Açucareiro**, v. 69, p. 34-39, 1967.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; TAUKE, S. M. Amino acid composition of single and mixed fungal cultures grown in sugar cane vinasse. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 43-47, 1992.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Optimal coonditions for SCP production by mixed cultures of *A. niger* e *Cr. Laurentii* grown in sugar cane vinasse medium. **Revista de Microbiologia**, v. 25, p. 129-135, 1994.

CLUTTERBUCK, A. J. Cell volume per nucleous in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 55, p. 291-299, 1969.

COSTA, A. C. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Nutritional requeriments of *Cryptococcus laurentii* in sugar cane vinasse medium. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, p. 575-584, 1992.

CRUZ, R. L.; RIGHETTO, A. M.; NOGUEIRA, M. A. Experimental investigation of soil and groundwater impacts caused by vinasse disposal. **Water Science and Technology**, v. 24, p. 77-85, 1991.

- DAS, A.; ROY, P. Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 622-62, 1978.
- DE ANGELIS, D. F.; KIYAN, C.; CORSO, C. R.; TAUKE, S. M. Emprego de leveduras em culturas puras e mistas objetivando o aproveitamento de vinhaça. **Brasil Açucareiro**, v. 94, p. 17-22, 1979.
- DE LAMO, P. R.; MENEZES, T. J. B. Bioconversion of stillage for fungal biomass production. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 9, p. 281-312, 1978.
- DELGADO, R.; JIMÉNEZ, R.; LINARES, H.; GUTIÉRREZ, C. Cultivo de levadura forrajera en mezclas de vinaza y melaza final de caña. **Annales de Technologie Agricole**, v. 24, p. 287-295, 1975.
- DHAMANKAR, V. S. ; ZENDE, N. A.; HAPASE, D. G. A method for colour removal from vinasse. **International Sugar Journal**, v. 95, p. 89-91, 1993.
- DOWD, M. K.; JOHANSEN, S. L.; CANTARELLA, L.; REILLY, P. J. Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 42, p. 283-88, 1994.
- FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of *Spirulina maxima*. Part II use of molasse alcohol destillate waste. **Revista de Microbiologia**, v. 17, p. 15-21, 1986.
- GALLO, J. D. B.; OSPINA, H. P.; SANTOS, E. V. Evaluacion preliminar de la vinaza, un desecho de destileria, como posible fuente de nutrientes en la alimentacion de aves. **Acta Agronomica**, v. 36, p. 207-220, 1986.

HASTIE, A. C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. **Nature**, v. 226, p. 771, 1970.

KADIOGLU, A.; ALGUR, Ö. F. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. **Bioresource Tecnhonology**, v. 42, p. 1-5, 1992.

KÄFER, E.; CHEN, T. L. Translocation and recessive lethal induced in *Aspergillus nidulans* by ultraviolet light and gamma rays. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 6, p. 249-254, 1964.

KIOHARA, H.; WATANABE, T.; IMAI, J.; TAKIZAWA, N.; HATTA, T.; NAGAO, K.; YAMAMOTO, A. Intergeneric hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 671-676, 1990.

KIRIMURA, K.; NAKAJIMA, I.; LEE, S. P.; KAWABE, S.; USAMI, S. Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 504-506, 1988.

KIYAN, C. Utilização de vinhaça de cana para produção de biomassa de *Aspergillus niger* e *A. oryzae*. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 7, p. 55-58, 1988.

MARTELLI, H. L.; SOUSA, N. O. Obtenção de biomassa de *Candida utilis* crescendo em vinhoto de cana. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 9, p. 157-164, 1978.

MARTINEZ CRUZ, A.; ALEMÁN, I.; BACH, T.; CALERO, B. J. Effects of irrigation with sugar factory waste water. II. Microflora associated to the carbon cycle. **Ciencias de la Agricultura**, v. 30, p. 118-127, 1987.

MARTINI, A. Yeast single cell protein in human nutrition. **Science & Technologie Alimentaire**, v. 3, p. 203-207, 1973.

Mc CULLY, K. S.; FORBES, E. The use of *p*-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes of linkage groups. **Genetical Research**, v. 6, p. 352-359, 1965.

MEDEIROS, A. P. Composição química dos diferentes tipos de vinhaça nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. **Saccharum**, v. 12, p. 26-40, 1988.

MILEWSKI, J. A.; LEWICKI, P. P. Demineralisation of vinasse by electrodialysis. **Journal of Food Engineering**, v. 7, p. 177-196, 1988.

MOSCOSO, I. L. **Produção de Enzimas Extracelulares em Haplóides, Heterocários e Diplóides de *Aspergillus nidulans***. Campinas, 1987. 93p. Dissertação (M.S.) - Universidade de Campinas.

MOSCOSO, I. L.; ROSATO, Y. B. Extracellular enzyme production by haploids, heteerocaryons and diploids of *Aspergillus nidulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.365-368, 1987.

NGA, B. H. & ROPER, J. A. Quantitative intrachromosomal changes arising at mitosis in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 58, p. 193-209, 1968.

OGAWA, K.; TSUCHIMUCHI, M.; TANIGUCHI, K.; NAKATSU, S. Interspecific hybridization of *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* and *Aspergillus niger* by protoplast fusion. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2873-2880, 1989.

- OGAWA, K.; FUJII, N.; FURUKAWA, K.; ASHADI, R. W.; THAYANANUPHAT, P.; TANAKA, K. Transfer of cellulolytic character of *Aspergillus niger* into *Aspergillus kawachii* by their protoplast fusion. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 39, p. 443-452, 1993.
- ORLANDO FILHO, J.; BITTENCOURT, V. C.; ALVES, M. C. Vinasse application in a Brazilian sandy soil and nitrogen watertable pollution. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 13, p. 9-13, 1995.
- PERES, C. S.; FIGUEIREDO, M. G.; VITORATTO, E.; PEREGO JUNIOR, L. Growth of anaerobic photosynthetic bacteria in vinasse medium. **Revista de Microbiologia**, v. 17, p. 1-9, 1986.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; McDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulas*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- PROSSER, J. I. Mathematical modelling of fungal growth. In: GOW, N. A. R.; GAAD, G. M. **The growing fungus**. London: Chapman & Hall, 1995. cap. 15, p.319-334.
- ROTEMBERG, B.; ANTONACCIO, L. D.; LACHAN, A. Determinação da constituição química do vinhoto do melaço de cana-de-açúcar. **Informativo do INT**, v. 12, p. 25-28, 1979.
- SELIM, M. H.; ELSHAFEI, A. M.; EL-DIWANY, A. I. Production of single cell protein from yeast strains grown in egyptian vinasse. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 157-160, 1991.
- SERZEDELLO, A. Vinhaça como substrato para produção de proteínas alimentar. In: **Semana de Fermentação Alcoólica**, 3., Piracicaba, 1962. Piracicaba; Instituto Zimotécnico, 1966. v. 2, p. 384-393.

- SERZEDELLO, A.; MIGUEL, A. P. N.; CARMO, I. J. B.; BARBIERI, G.
Estudos sobre a obtenção de levedura alimentar. **Revista de Agricultura**, v. 45, p. 22-27, 1970.
- SILVA, S. A.; OSVALDO, M. **Análise físico química para controle das estações de tratamento de esgoto**. São Paulo: CETESB, 1977. 225p.
- SOLOMONS, G. L. Production of biomass by filamentous fungi. In: MOO-YOUNG, M.; BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C., (Ed.) **Comprehensive biotechnology the principles, applications and regulations of biotechnology in Industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 483-505.
- TAUK, S. M. Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 7, p. 92-97, 1976.
- TAUK, S. M. Effect of the minerals acids treatments in vinasse in growth of the *Candida utilis*. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 350-353, 1978a.
- TAUK, S. M. Adaptation of yeast to vinasse and vinasse supplemented with molasses. **Ciência e Cultura**, v. 31, p. 522-530, 1978b.
- TAUK, S. M. & GAMBALE, V. Efeito da adição de H_3PO_4 em culturas mista de levedura em vinhaça. **Brasil Açucareiro**, v. 91, p. 9-14, 1978.
- TAUK, S. M.; RUEGGER, M. S. Aspects of microflora in soil under "cerrado" vegetation, treated with vinasse in Corumbatai, São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 18, p. 67-76, 1987.
- UM AVISO aos homens da agroindustria. **Brasil Açucareiro**, v. 66, p. 16-23, 1965.

- USHIJIMA, S.; NAKADAI, T. Breeding by protoplast fusion of *koji* mold *Aspergillus sojae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 1051-1057, 1987.
- USHIJIMA, S.; NAKADAI, T.; UCHIDA, K. Improvement of enzyme productivities through mutation or haploidization of heterozygous diploids obtained by protoplast fusion of *Aspergillus sojae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 2781-2786, 1987.
- USHIJIMA, S.; NAKADAI, T.; UCHIDA, K. Breeding of new koji-molds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 1667-1676, 1990.
- VAZOLLER, R. F. Microbial aspects of thermophilic anaerobic biodigestion of vinasse. In: **International Symposium on Microbial Ecology**, 7., Santos, 1995. Abstracts. p. 5.
- VENTURINI FILHO, W. G.; CAMARGO, R. Produção de biomassa de *Aspergillus oryzae* utilizando vinhaça como substrato de fermentação. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 5, p. 38-41, 1987.
- WIEGANT, W. M.; CLAASSEN, J. A.; LETTINGA, G. Thermophilic anaerobic digestion of high strength wastewaters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1374-1381, 1985.

APÊNDICE

1- Vinhaça suplementada com melaço - dados referentes ao diâmetro das colônias em centímetros.

Tempo I						Tempo II					
Melaço (g/100mL de vinhaça)						Melaço (g/100mL de vinhaça)					
0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
0,400	0,550	0,550	0,550	0,550	0,600	0,850	1,150	1,350	1,300	1,375	1,375
0,450	0,550	0,550	0,500	0,600	0,600	0,800	1,100	1,350	1,325	1,350	1,400
0,400	0,475	0,600	0,550	0,550	0,575	0,750	1,100	1,300	1,325	1,400	1,425
0,500	0,550	0,550	0,650	0,500	0,675	0,800	1,125	1,375	1,350	1,450	1,375
0,400	0,500	0,500	0,675	0,650	0,625	0,725	1,175	1,275	1,425	1,400	1,550
0,400	0,550	0,475	0,575	0,625	0,600	0,875	1,075	1,275	1,300	1,450	1,400
0,450	0,500	0,525	0,575	0,650	0,700	0,750	1,100	1,275	1,325	1,375	1,450
0,425	0,425	0,600	0,575	0,600	0,600	0,800	1,050	1,225	1,375	1,425	1,450
0,350	0,500	0,525	0,550	0,600	0,550	0,850	1,175	1,225	1,325	1,375	1,375
0,325	0,450	0,500	0,550	0,525	0,500	0,700	1,150	1,200	1,300	1,550	1,550

• ANAVA:

FV	GL	SQ	QM	F
Meios	5	2,463167	0,492633	179,8205**
Tempo	1	14,45602	14,45602	5276,722**
Interação	5	0,748667	0,149733	54,65551**
Erro	108	0,295875	0,00274	
Total	119	17,96373		

- Correlação entre o diâmetro da colônia e a concentração de melaço no meio de cultivo.

correlação= 0,92

2- Vinhaça suplementada com NPK - dados referentes ao diâmetro das colônias em centímetros.

Considerar: ∇ = 6g NaNO_3 + 1,5g KH_2PO_4 + 0,5g KCl em 1litro de meio

- Experimento I

Tempo I

% solução NPK							
0	2	4	6	8	10	12	∇
1,000	0,775	0,600	0,500	0,475	0,500	0,500	0,800
1,000	0,750	0,625	0,500	0,475	0,500	0,400	0,750
0,950	0,750	0,700	0,550	0,525	0,575	0,550	0,825
1,000	0,675	0,600	0,500	0,600	0,450	0,550	0,700
0,925	0,750	0,650	0,475	0,500	0,475	0,575	0,800
1,025	0,675	0,650	0,550	0,400	0,500	0,475	0,675
0,950	0,700	0,675	0,525	0,500	0,400	0,425	0,700
1,075	0,725	0,700	0,525	0,475	0,500	0,450	0,700
1,050	0,725	0,625	0,450	0,500	0,425	0,575	0,825
1,125	0,725	0,600	0,475	0,550	0,400	0,525	0,700
1,125	0,750	0,675	0,550	0,550	0,475	0,575	0,775
1,125	0,675	0,700	0,600	0,500	0,425	0,550	0,700
1,050	0,750	0,650	0,500	0,450	0,500	0,475	0,775
1,050	0,725	0,625	0,450	0,400	0,425	0,500	0,700
0,975	0,650	0,625	0,525	0,475	0,500	0,500	0,750
1,025	0,675	0,625	0,525	0,500	0,425	0,425	0,700

TempoII

% solução NPK							
0	2	4	6	8	10	12	∇
1,600	1,300	1,250	1,000	1,100	0,800	0,900	1,500
1,750	1,450	1,300	1,000	1,250	0,950	0,900	1,450
1,550	1,500	1,300	1,150	0,850	1,025	0,800	1,625
1,550	1,450	1,150	1,100	1,200	1,000	0,950	1,450
1,650	1,400	1,350	0,900	1,000	1,150	0,800	1,625
1,700	1,350	1,350	0,900	1,050	0,900	1,050	1,550
1,550	1,300	1,300	1,200	0,850	1,200	0,800	1,525
1,550	1,325	1,200	1,100	1,200	1,100	1,000	1,550
1,600	1,300	1,250	0,950	1,150	0,900	0,800	1,500
1,600	1,350	1,250	1,000	1,100	0,900	1,025	1,375
1,625	1,500	1,150	1,100	1,100	1,100	0,900	1,500
1,600	1,350	1,225	1,000	1,250	1,150	1,000	1,500
1,700	1,400	1,250	0,950	1,100	1,050	1,050	1,600
1,700	1,275	1,400	0,900	0,900	0,800	1,100	1,500
1,600	1,375	1,200	1,200	1,100	1,200	0,900	1,600
1,600	1,225	1,200	1,200	0,950	1,150	0,825	1,475

• ANAVA:

FV	GL	SQ	QM	F
Meios	6	9,283002	1,547167	240,8586**
Tempo	1	17,73282	17,73282	2760,595**
Interação	6	0,256462	0,042744	6,654215**
Erro	210	1,348945	0,006424	
Total	223	28,62122		

- Correlação entre o diâmetro da colônia e a concentração da solução NPK no meio de cultivo.
correlação= -0,90953

• Experimento II

% NPK						
0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	∇
0,725	0,800	0,600	0,500	0,600	0,650	0,900
0,800	0,750	0,600	0,700	0,650	0,775	0,800
0,650	0,775	0,500	0,750	0,800	0,600	0,725
0,600	0,725	0,650	0,650	0,925	0,800	0,700
0,700	0,850	0,750	0,700	0,700	0,700	0,700
0,700	0,800	0,575	0,700	0,700	0,650	0,625
0,675	0,775	0,600	0,800	0,812	0,500	0,675

• ANAVA:

FV	GL	SQ	QM	F
Meios	5	0,123411	0,024682	3,433466**
Erro	36	0,258795	0,007189	
Total	41	0,382206		

- Correlação entre o diâmetro da colônia e a concentração da solução NPK no meio de cultivo.
correlação= -0,15592

3- Crescimento radial de espécies de *Aspergillus* em meio vinhaça sob diferentes temperaturas
 - dados referentes ao diâmetro das colônias em centímetros. Considerar para: 1- *A. nidulans*,
 2- *A. niger*, 3- *A. oryzae*, 4- *A. sulphureus*

	35 horas				70 horas			
	1	2	3	4	1	2	3	4
27°C	0,600	1,600	1,650	0,450	1,875	4,150	4,250	1,250
	0,625	1,525	1,675	0,500	1,900	4,250	4,200	1,275
	0,625	1,500	1,700	0,525	2,025	4,200	4,150	1,275
	0,625	1,575	1,775	0,500	2,025	4,350	4,150	1,200
	0,675	1,625	1,725	0,500	1,975	4,375	4,200	1,200
	0,650	1,550	1,675	0,475				
32°C	0,950	2,375	2,500	0,800	2,850	6,150	5,650	1,400
	0,925	2,450	2,525	0,775	2,900	6,200	5,625	1,250
	0,925	2,425	2,525	0,800	2,950	6,150	5,650	1,350
	1,025	2,450	2,375	0,750	3,000	6,250	5,600	1,325
	0,950	2,400	2,400	0,775	2,800	6,100	5,625	1,375
	0,900	2,300	2,450	0,700				
37°C	1,150	2,600	0,625	0,600	3,175	6,100	1,900	1,200
	1,025	2,500	0,675	0,650	3,225	5,800	2,325	1,200
	1,000	2,475	0,575	0,675	3,275	6,000	1,875	1,350
	1,125	2,525	0,650	0,600	3,300	6,000	1,800	1,275
	1,150	2,475	0,625	0,625	3,150	5,850	1,950	1,250
	1,125	2,600	0,750	0,675				

•Tempo I (35 horas)

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Temperatura	2	3,912344	1,956172	820,0546**
Espécies	3	26,09559	8,69853	3646,545**
Interação	6	10,22613	1,704355	714,4893**
Erro	60	0,143125	0,002385	
Total	71	40,37719		

•Tempo II (70 horas)

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Temperatura	2	13,76369	6,881844	861,9139**
Espécies	3	142,7409	47,58029	5959,175**
Interação	6	35,43823	5,906372	739,7412**
Erro	48	0,38325	0,007984	
Total	59	192,326		

4- Produção de biomassa seca por diferentes espécies de *Aspergillus* cultivadas em vinhaça
- dados referentes a produção de biomassa seca em gramas.

<i>A. sulphureus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
0,39836	0,48123	0,37321	0,46233
0,36776	0,52748	0,37054	0,53662
0,45771	0,5136	0,36385	0,48248

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Espécies	3	0,038943	0,012981	13,11475**
Erro	8	0,007918	0,00099	
Total	11	0,046861		

5- Redução da DQO da vinhaça por diferentes espécies de *Aspergillus* - dados referentes à
porcentagem de redução da DQO.

<i>A. sulphureus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
34,73	31,42	43,6	49,75
34,73	30,83	43,25	46,79

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Espécies	3	370,3228	123,4409	106,966**
Erro	4	4,6161	1,1540	
Total	7	374,9389		

6- Redução da DBO₅ da vinhaça por diferentes espécies de *Aspergillus* - dados referentes à
porcentagem de redução da DBO₅.

Amostra	<i>A. sulphureus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
0,1%	47,87	55,06	56,26	67,37
	42,79	57,21	56,62	66,49
0,15%	57,26	56,76	61,92	55,44
	54,15	54,38	57,05	58,25

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Diluição	1	1,918225	1,918225	0,3920 ^{ns}
Espécies	3	269,4461	89,81536	18,3572**
Interação	3	217,0208	72,34029	14,7855**
Erro	8	39,1412	4,89265	
Total	15	527,5264		

7- Diâmetro dos conídios das linhagens de *A. nidulans* - dados referentes ao diâmetro do conídio em unidades da câmara micrométrica.

	repetição											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MSE	0,69	0,67	0,67	0,68	0,72	0,68	0,63	0,68	0,67	0,7	0,65	0,62
PPY	0,78	0,75	0,78	0,76	0,74	0,76	0,79	0,77	0,75	0,75	0,78	0,73
BM	0,73	0,78	0,76	0,71	0,74	0,77	0,78	0,73	0,75	0,73	0,76	0,74
VE	0,78	0,73	0,76	0,81	0,74	0,78	0,72	0,75	0,72	0,71	0,78	0,75
MSE//PPY1	0,96	0,92	0,94	0,9	0,95	0,96	0,96	0,97	0,89	1,00	0,94	0,93
MSE//BM	1,00	1,00	0,94	0,93	0,9	0,92	0,95	1,00	1,01	0,96	0,94	0,93
PPY//BM	0,94	0,91	0,99	0,98	0,92	0,98	1,00	0,88	0,92	0,96	0,91	1,00
Rec M//P 1	0,8	0,78	0,75	0,76	0,8	0,72	0,75	0,76	0,77	0,81	0,79	0,8
Rec M//P 2	0,75	0,76	0,76	0,71	0,78	0,75	0,7	0,73	0,73	0,79	0,76	0,78
Rec M//P 3	0,74	0,72	0,74	0,66	0,69	0,69	0,66	0,75	0,74	0,69	0,66	0,73
Rec M//P 4	0,72	0,76	0,72	0,8	0,78	0,77	0,71	0,72	0,76	0,83	0,78	0,72
Rec M//P 5	0,8	0,78	0,74	0,73	0,72	0,82	0,77	0,77	0,76	0,74	0,76	0,75
Rec M//P 7	0,8	0,75	0,81	0,8	0,77	0,73	0,7	0,73	0,75	0,76	0,79	0,75
Rec M//P 9	0,72	0,77	0,7	0,71	0,8	0,74	0,71	0,73	0,76	0,73	0,75	0,75
Rec M//P 10	0,71	0,73	0,7	0,69	0,7	0,73	0,74	0,73	0,77	0,7	0,75	0,75
Rec M//P 11	0,68	0,66	0,61	0,67	0,67	0,66	0,66	0,64	0,68	0,65	0,63	0,62
Rec M//P 12	0,69	0,73	0,75	0,83	0,81	0,73	0,78	0,75	0,72	0,78	0,77	0,73
Rec M//P 15	0,7	0,65	0,7	0,67	0,68	0,69	0,66	0,64	0,65	0,65	0,64	0,67
Rec M//P 16	0,76	0,81	0,77	0,72	0,74	0,78	0,76	0,77	0,73	0,75	0,76	0,77
Rec M//P 18	0,77	0,67	0,63	0,67	0,7	0,68	0,74	0,69	0,67	0,75	0,71	0,65
Rec M//P 19	0,7	0,65	0,71	0,71	0,8	0,73	0,66	0,65	0,69	0,77	0,65	0,76
Rec M//P 20	0,74	0,67	0,68	0,72	0,67	0,65	0,63	0,68	0,64	0,72	0,65	0,7
Rec M//B 4	0,73	0,81	0,8	0,74	0,74	0,69	0,69	0,71	0,71	0,73	0,72	0,77
Rec M//B 5	0,78	0,73	0,8	0,73	0,76	0,77	0,75	0,78	0,76	0,75	0,71	0,74
Rec M//B 6	0,71	0,69	0,74	0,69	0,75	0,76	0,69	0,74	0,69	0,73	0,71	0,76
Rec M//B 7	0,65	0,72	0,69	0,67	0,7	0,71	0,65	0,69	0,73	0,74	0,74	0,67
Rec P//B 4	0,78	0,76	0,76	0,75	0,71	0,71	0,76	0,8	0,75	0,8	0,73	0,73
Rec P//B 6	0,81	0,77	0,82	0,81	0,86	0,8	0,81	0,8	0,74	0,75	0,73	0,75
Rec P//B 10	0,73	0,74	0,77	0,77	0,7	0,69	0,75	0,78	0,72	0,7	0,72	0,7

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Rep	11	0,013968	0,00127	1,227559ns
Trat	28	1,937815	0,069208	66,90534**
Haplo	25	0,391689	0,015668	15,14634**
Diplo	2	0,001072	0,000536	0,518276ns
H vs D	1	1,545054	1,545054	1493,655**
Residuo	308	0,318599	0,001034	
Total	347	2,270382		

8- Crescimento radial de linhagens de *A. nidulans* em função do tempo de cultivo - dados referentes ao diâmetro das colônias em centímetros.

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
MSE	0,900	2,600	4,300	6,050	7,925	8,300	8,950
	1,000	2,300	4,050	5,950	7,325	8,750	8,500
	1,025	2,725	5,050	6,350	7,850	8,750	8,600
	1,375	3,300	4,500	6,175	8,000	8,850	8,900
	1,500	2,675	4,500	6,550	8,000	8,500	8,900
A	0,475	1,250	2,600	3,450	4,550	6,000	5,850
	0,625	1,350	2,100	3,600	4,950	5,800	5,800
	0,725	1,300	2,400	3,400	4,600	5,500	6,000
	0,675	1,250	2,750	3,750	4,400	5,700	5,850
	0,650	1,450	2,550	3,650	4,700	5,400	5,700
PPY	0,725	1,450	1,500	3,600	4,250	4,800	4,950
	0,475	1,425	1,900	3,400	3,850	4,750	4,400
	0,450	1,425	1,800	3,100	4,450	4,350	4,500
	0,600	1,800	2,000	3,050	3,900	4,500	5,000
	0,500	1,625	2,000	3,250	3,850	4,400	4,500
BM	0,450	2,000	3,025	4,650	5,700	6,900	7,100
	0,475	1,875	3,025	4,450	5,700	6,250	6,600
	0,525	1,700	3,150	4,700	5,500	6,450	7,000
	0,500	1,775	3,450	4,250	5,500	6,900	7,350
	0,600	2,050	3,500	4,800	5,850	6,200	6,900
MSE//A	0,850	2,750	4,200	6,500	8,100	8,900	9,000
	1,250	2,900	4,750	6,525	8,250	8,800	8,800
	1,275	2,975	4,700	6,325	8,200	8,900	8,900
	1,300	2,950	4,825	6,700	8,250	9,000	8,700
	1,325	3,000	4,925	6,600	7,750	8,750	8,900
MSE//PPY1	1,175	2,900	4,950	6,925	8,775	8,750	8,900
	1,200	2,850	4,975	6,850	8,800	8,900	8,850
	1,075	2,850	5,000	6,600	8,800	8,900	9,000
	0,975	3,000	4,700	6,750	8,700	8,950	8,950
	1,300	2,800	5,400	7,100	8,600	9,000	8,700
MSE//BM	1,600	2,550	4,850	6,950	8,800	9,000	8,950
	1,050	2,625	4,750	6,700	8,200	8,800	8,200
	1,275	2,650	5,225	7,050	8,450	8,300	8,700
	1,425	2,825	5,200	6,450	7,975	8,850	8,800
	1,325	2,900	5,000	6,900	8,400	8,800	8,800

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	6	367,3454	61,22424	824,2007**
Erro a	28	2,079929	0,074283	
Tempo	6	1426,653	237,7755	5876,121**
L x T	36	71,93218	1,998116	49,37923**
Erro b	168	6,798071	0,040465	
Total	244	1874,809		

• equação logística

Linhagens

Assintótica

	min	máx	média	coef. correl.	equação logística
MSE	8,91	9,08	8,995	-0,9970	$Y = 8,995 / (1+17,03937)^* \text{EXP} (-0,9507433)^* X$
A	6,07	6,43	6,25	-0,9960	$Y = 6,25 / (1+19,71371)^* \text{EXP} (-0,8301764)^* X$
PPY	4,76	4,86	4,81	-0,9940	$Y = 4,81 / (1+18,82504)^* \text{EXP} (-0,9333753)^* X$
BM	7,15	7,33	7,24	-0,9940	$Y = 7,24 / (1+24,0265)^* \text{EXP} (-0,9207473)^* X$
MSE//A	9,13	9,23	9,18	-0,9900	$Y = 9,18 / (1+14,85704)^* \text{EXP} (-0,9239621)^* X$
MSE//PPY1	8,97	9,05	9,01	-0,9780	$Y = 9,01 / (1+20,7232)^* \text{EXP} (-1,142357)^* X$
MSE//BM	8,91	9,03	8,97	-0,9820	$Y = 8,97 / (1+13,90599)^* \text{EXP} (-0,9632609)^* X$
Todas (média)	7,60	7,75	7,675	-0,9990	$Y = 7,675 / (1+16,96824)^* \text{EXP} (-0,9213265)^* X$

9- Produção de biomassa por linhagens de *A. nidulans* em função do tempo de cultivo - dados referentes a produção de biomassa seca (g).

	Tempo de cultivo (horas)											
	12				24				36			
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1
MSE	0,01360	0,00078	0,00757	0,08845	0,15173	0,37358	0,80696	0,77573	0,94338	1,03176	1,11626	0,8647
A	0,00574	0,00006	0,00691	0,09226	0,17699	0,30884	0,61732	0,65013	0,86410	0,68445	0,82821	0,64468
PPY	0,00212	0,00355	0,00650	0,01866	0,20770	0,24581	0,52989	0,62297	0,65922	0,50584	0,85029	0,66123
BM	0,01556	0,00372	0,03992	0,25812	0,28420	0,25605	0,67725	0,38647	0,51461	0,88627	0,88497	0,808
MSE//A	0,09346	0,04213	0,07350	0,72816	0,67477	0,76861	0,90953	1,09601	1,03127	1,01740	1,19179	0,83188
MSE//PPY1	0,04852	0,03492	0,06511	0,55197	0,32651	0,64227	0,78140	1,07116	0,79486	0,86947	1,08344	0,99047
MSE//BM	0,11983	0,03645	0,07292	0,72004	0,64451	0,65192	0,90652	0,62087	0,81206	0,88859	1,16058	0,81787
												1,09316
												0,9696
												1,02704

• equação logística

Linhagens

Assintótica

	min	máx	média	coef. correl.	equação logística
MSE	1,0813	1,0846	1,08295	-0,990	$Y = 1,08295 / (1+1159,771)^* \text{EXP} (-0,2136552)^* X$
A	0,8785	0,8794	0,87895	-0,967	$Y = 0,87895 / (1+1179,071)^* \text{EXP} (-0,2082499)^* X$
PPY	0,7941	0,796	0,79505	-0,977	$Y = 0,79505 / (1+1162,016)^* \text{EXP} (-0,2054082)^* X$
BM	0,9545	0,9606	0,95755	-0,993	$Y = 0,95755 / (1+243,7332)^* \text{EXP} (-0,1634213)^* X$
MSE//A	1,0631	1,0644	1,06375	-0,965	$Y = 1,06375 / (1+58,26888)^* \text{EXP} (-0,1718907)^* X$
MSE//PPY1	1,0476	1,0512	1,0494	-0,987	$Y = 1,0494 / (1+89,07333)^* \text{EXP} (-0,1611071)^* X$
MSE//BM	1,0358	1,0409	1,03835	-0,973	$Y = 1,03835 / (1+39,22506)^* \text{EXP} (-0,1376622)^* X$
Todas (média)			0,98085	-0,986	$Y = 0,98085 / (1+143,0154)^* \text{EXP} (-0,165482)^* X$

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	6	367,3454	61,22424	824,2007**
Erro a	28	2,079929	0,074283	
Tempo	6	1426,653	237,7755	5876,121**
L x T	36	71,93218	1,998116	49,37923**
Erro b	168	6,798071	0,040465	
Total	244	1874,809		

10- Viabilidade dos esporos de linhagens de *A. nidulans* - dados referentes a porcentagem de viabilidade dos esporos.

- Ensaio I

	Repetição 1	Repetição 2
MSE	56,06	54,39
A	35,71	34,82
PPY	67,12	77,98
BM	22,88	27,28
MSE//A	45,05	38,46
MSE//PPY1	35,02	26,57
MSE//BM	46,92	43,01

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	6	3109,82798	518,3046643	26,77595588**
Resíduo	19	135,49965	19,35709286	
Total	13	3245,327636		

- Ensaio II

	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4
MSE	31,40	36,36	32,23	32,23
A	28,68	27,72	30,59	25,81
PPY	46,22	48,00	49,70	53,33
BM	41,32	58,67	53,71	54,54
MSE//A	42,37	50,84	48,30	50,00
MSE//PPY1	34,68	35,42	45,01	34,68
MSE//BM	50,32	54,98	41,93	40,07

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	6	2014,37524	335,729207	14,3556**
Resíduo	21	491,120425	23,3866869	
Total	27	2505,495668		

- Ensaio III

	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
MSE	51,96	65,68	59,8
A	46,34	56,91	56,91
PPY	40,78	38,23	44,18
BM	49,54	51,37	53,21
MSE//A	61,76	67,64	64,7
MSE//PPY1	47,3	44,52	38,03
MSE//BM	53,67	53,67	47,08

• ANAVA

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	6	1231,56818	205,261363	10,0725**
Resíduo	14	285,2986	20,3784714	
Total	20	1516,86678		

• ANAVA CONJUNTA- (ensaio I, II e III)

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	18	6355,771	353,0983	16,16**
Resíduo	42	911,9187	21,7123	
Total	60			

• Correlação: viabilidade e biomassa produzida após 12 horas de cultivo

correlação = 0,04391

• Correlação: viabilidade e biomassa produzida após 60 horas de cultivo

correlação = 0,01725

11- Crescimento radial de linhagens haplóides, diplóides e recombinantes de *A. nidulans* em meio vinhaça, valores expressos em centímetros - dados referentes ao diâmetro das colônias em centímetros.

Linhagem	tempo de cultivo (horas)					
	48			96		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
MSE	2,45	2,55	2,60	6,25	6,20	6,35
PPY	1,40	1,45	1,45	3,43	3,50	3,63
BM	2,05	2,25	2,10	5,25	5,00	5,20
VE	3,00	2,95	3,10	6,50	6,70	6,80
MSE//PPY1	3,30	3,05	3,23	7,10	6,70	7,05
MSE//PPY2	3,13	3,10	3,10	6,70	6,50	6,75
MSE//PPY3	3,40	3,38	3,25	7,15	7,05	7,00
MSE//BM	2,75	3,13	2,98	6,50	6,85	7,10
PPY//BM	2,15	2,28	2,70	6,30	6,20	6,60
REC M//P 1	2,25	2,20	2,35	5,60	5,80	5,80
REC M//P 2	2,60	2,75	2,55	6,00	5,95	6,20
REC M//P 3	2,90	2,55	2,55	6,55	6,35	6,45
REC M//P 4	3,40	3,30	3,30	7,40	7,50	7,60
REC M//P 5	1,35	1,40	1,20	3,43	3,53	3,80
REC M//P 7	1,20	1,40	1,15	3,45	3,53	3,45
REC M//P 9	1,35	1,60	1,30	3,45	3,50	3,65
REC M//P 10	1,50	1,50	1,35	3,76	3,60	3,50
REC M//P 11	1,35	1,00	1,30	3,10	3,50	3,73
REC M//P 12	1,25	1,30	1,25	3,95	3,70	3,97
REC M//P 13	3,20	3,25	3,10	7,15	6,80	7,00
REC M//P 15	1,40	1,20	1,23	2,70	3,38	3,15
REC M//P 16	1,15	1,30	1,15	2,78	3,32	2,80
REC M//P 17	3,35	3,13	3,10	6,85	6,70	7,00
REC M//P 18	2,80	2,45	2,63	6,30	6,15	6,25
REC M//P 19	2,33	2,45	2,45	6,75	6,30	6,30
REC M//P 20	1,35	1,45	1,70	3,98	3,63	3,60
REC M//B 4	1,55	1,65	1,75	3,85	3,90	3,55
REC M//B 5	2,20	2,00	2,30	5,70	5,75	5,85
REC M//B 6	1,50	1,75	1,55	3,45	3,30	3,60
REC M//B 7	1,70	1,60	2,00	4,50	5,00	5,05
REC P//B 4	0,80	0,60	1,00	2,90	3,10	2,66
REC P//B 6	2,50	2,75	2,85	6,25	6,50	6,45
REC P//B 10	2,60	2,60	2,65	6,45	6,40	6,15

• ANAVA 48 horas

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	32	57,57104	1,799095	98,234**
Erro	66	1,20875	0,018314	
Total	98	58,77979		

• ANAVA 96 horas

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	32	228,2996	7,134364	207,294**
Erro	66	2,2715	0,034417	
Total	98	230,5711		

• Correlação entre o crescimento radial com 48 e 96 horas
correlação = 0,973

• ANAVA para testar variância entre grupos de recombinantes, com 48 horas de cultivo

FV	GL	SQ	QM	F
Recombinantes	2	0.1624678	0.0812339	0.13 ^{ns}
Erro	21	12.781627	0.608649	
Total	23	12.944095		

• ANAVA para testar variância entre grupos de recombinantes, com 96 horas de cultivo

FV	GL	SQ	QM	F
Recombinantes	2	1,046493	0,523246	0,20 ^{ns}
Erro	21	53,710690	2,557651	
Total	23	54,757183		

• ANAVA para testar variância entre os tipos de tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes), com 48 horas de cultivo

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	5,0387841	1,6795947	3,45*
Erro	29	14,114615	0,4867108	
Total	32	19,15340		

• ANAVA para testar variância entre os tipos de tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes), com 96 horas de cultivo

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	17,160033	5,720011	2,82 ^{ns}
Erro	29	58,881063	2,030381	
Total	32	76,041096		

• **Teste de Tukey (5%) entre as médias dos tratamentos, considerando controle (0), parentais (1), diplóides (2) e recombinantes(3), quando cultivados por 48 horas, significância é indicado por ***.**

tratamentos	limite inferior de confiança	diferença entre médias	limite superior de confiança
0 - 2	-2.0562	0.0260	2.1082
0 - 1	-1.2048	0.9900	3.1848
0 - 3	-0.9004	1.0396	2.9795
2 - 1	-0.4241	0.9640	2.3521
2 - 3	0.0792	1.0136	1.9480 ***
1 - 3	-1.1144	0.0496	1.2135

12- Produção de biomassa seca por linhagens haplóides, diplóides e recombinantes de *A. nidulans*- dados referentes a produção de biomassa seca em gramas.

Linhagem	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4
MSE	0,57991	0,60972	0,52347	0,32315
PPY	0,51532	0,57083	0,55857	0,55298
BM	0,62473	0,60147	0,56533	0,37754
VE	0,62004	0,57298	0,51628	0,51133
MSE//PPY 1	0,66128	0,69824	0,7026	0,67552
MSE//BM	0,31349	0,37187	0,29535	0,35978
PPY//BM	0,63612	0,63985	0,55435	0,63717
REC M//P 11	0,52266	0,56586	0,55924	0,50761
REC M//P 15	0,38899	0,48095	0,51138	0,49795
REC M//P 18	0,55235	0,56714	0,48475	0,58093
REC M//P 20	0,34189	0,47495	0,56341	0,47959
REC M//B 4	0,39213	0,43237	0,40618	0,35627
REC M//B 5	0,42258	0,39781	0,20854	0,34832
REC M//B 6	0,52815	0,49894	0,52519	0,37935
REC M//B 7	0,31006	0,28721	0,27692	0,21122
REC P//B 4	0,5325	0,58116	0,56178	0,56088
REC P//B 6	0,58863	0,63819	0,59565	0,59555
REC P//B 10	0,56113	0,56908	0,56422	0,54775

• **ANAVA para as linhagens e blocos**

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos	3	0,031352	0,010451	3,0912*
Linhagens	17	0,773962	0,045527	13,4662**
Erro	51	0,172422	0,003381	
Total	71	0,977736		

- ANAVA para os tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes), com a soma dos quadrados do tipo I.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos	3	0,031352	0,010451	3,0912*
Tratamentos	3	0,074994	0,249982	7,39**

- ANAVA para os tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes), considerando como erro o quadrado médio do tipo III das linhagens.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	0,074994	0,0249983	0,50 ^{ns}
Linhagens	14	0,698967	0,4992622	

- Teste de Newman-Keuls para os diferentes tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes).

agrupamento	média	observações	tratamentos
A	0,55516	4	controle
A			
A	0,54547	12	diplóides
A			
A	0,53359	12	parentais
B	0,47630	44	recombinantes

- ANAVA para os tipos de recombinantes (Rec P//B, Rec M//P, Rec M//B), com a soma dos quadrados do tipo I.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos	3	0,009536	0,003178	0,58 ^{ns}
Tratamentos	2	0,297383	0,148691	26,96**

- Correlação entre o crescimento radial e a produção de biomassa seca
correlação = 0,20654

13- Redução da DQO da vinhaça por linhagens haplóides, diplóides e recombinantes de *A. nidulans* - dados referentes a porcentagem de redução da DQO.

Linhagem	repetição 1	repetição 2
MSE	36,15	36,15
PPY	29,98	31,74
BM	32,84	31,74
VE	36,15	36,15
MSE//PPY 1	46,14	44,63
MSE//BM	32,78	31,49
PPY//BM	40,54	38,64
REC M//P 11	29,98	33,21
REC M//P 15	30,62	29,33
REC M//P 18	33,21	31,86
REC M//P 20	21,79	
REC M//B 4	31,06	31,06
REC M//B 5	24,59	23,08
REC M//B 6	26,43	26,43
REC M//B 7	26,96	25,67
REC P//B 4	35,36	31,49
REC P//B 6	35,36	33,43
REC P//B 10	31,30	33,94

• ANAVA para a porcentagem de redução da DQO

FV	GL	SQ	QM	F
Linhagens	17	932,846	54,873	33,5963**
Erro	17	27,76628	1,6333	
Total	34	960,6122		

• ANAVA para os diferentes tratamentos (controle, parentais, diplóides e recombinantes).

FV	GL	SQ	QM	F
tratamentos	3	240,72222	80,24075	4,04*
Erro	14	279,5959	19,97114	
Total	17	520,3182		

• Teste de Tukey (5%) entre as médias dos tratamentos, considerando controle (0), parentais (1), diplóides (2) e recombinantes(3), significancia é indicado por ***.

tratamentos	limite inferior de confiança	diferença entre médias	limite superior de confiança
2 - 0	-12.110	2.889	17.888
2 - 1	-4.671	5.935	16.541
2 - 3	1.123	9.584	18.044 ***
0 - 1	-11.953	3.046	18.045
3 - 0	-20.261	-6.694	6.872
3 - 1	-12.109	-3.649	4.812

• ANAVA para os tipos de recombinantes (Rec P//B, Rec M//P, Rec M//B).

FV	GL	SQ	QM	F
recombinantes	2	75,4958	37,7479	2,99 ^{ns}
Erro	8	100,9083	12,6135	
Total	10	176,4041		

14- Caracterização genética das linhagens de *A. nidulans*

- correlação entre o número de auxotrofias e a produção de biomassa seca

correlação = -0,440713244

- correlação entre o número de auxotrofias e a redução da DQO

correlação = -0,480143598