



**ALINE RAMALHO BRANDÃO PEREIRA**

**REMOÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO POR  
ISOLADOS DE *Aspergillus brasiliensis* E  
*Penicillium citrinum* EM BIOFILTROS**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**ALINE RAMALHO BRANDÃO PEREIRA**

**REMOÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO POR ISOLADOS DE *Aspergillus  
brasiliensis* E *Penicillium citrinum* EM BIOFILTROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

Coorientadores

Dr. Cláudio Roberto Fonsêca S. Soares

Dr. Luis Roberto Batista

**LAVRAS – MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Pereira, Aline Ramalho Brandão.

Remoção de elementos traço por isolados de *Aspergillus  
brasiliensis* *Penicillium citrinum* em biofiltros / Aline Ramalho  
Brandão Pereira. – Lavras : UFLA, 2011.

118 : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Bibliografia.

1. Fungos. 2. Metais pesados. 3. Efluentes. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

**ALINE RAMALHO BRANDAO PEREIRA**

**REMOÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO POR ISOLADOS DE *Aspergillus  
brasiliensis* E *Penicillium citrinum* EM BIOFILTROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2011.

Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares	UFSC
Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dra. Júlia Ferreira da Silva	UFBA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2011**

A João Guallberto Penha e à Dra. Júlia Ferreira da Silva, sem os quais a  
realização deste projeto não seria possível.

DEDICO  
**AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e aos departamentos de Biologia, Ciência dos Alimentos e Ciências dos Solos, por permitirem a realização deste trabalho.

À Dra. Sara Maria Chaufoun, pela orientação e confiança.

Aos coorientadores Cláudio Roberto Fonsêca S. Soares, Luis Roberto Batista e à colaboradora Manuela da Silva, pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Jeans C. Frisvad do Center for Microbial Biotech da Universidade técnica de Denmark (Holanda), por ter cedido a amostra de *Aspergillus brasiliensis* (IBT 26433) tão gentilmente.

À Manuela da Silva, Marília Martins Nishikawa e Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento, por envio da amostra *Penicillium citrinum* da coleção de culturas do laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS- FIOCRUZ RJ).

A Maryeimy Varón Lopes, pelo isolamento e identificação dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* de regiões contaminadas.

Ao aluno Jessé Valentin, pelas sugestões e apoio.

Ao João Gualberto Penha, pela realização das análises em espectrofotômetro de absorção atômica.

Aos Drs. Marcelo Pereira e Deila Botelho, pelo apoio e sugestões.

À aluna Maiara Carvalho, pela ajuda nos cálculos de química.

Agradeço aos meus avós Orphilino e Julita; aos meus pais, João Carlos e Joice; tios Marcos, Roberto e Andréa; meu irmão Yan e meu namorado Fernando, por todo o amor, carinho e confiança em mim depositados, durante todos esses anos de estudo. Estou certa de que esta vitória não seria possível sem a energia positiva que deles emana e me encoraja na superação de todos os obstáculos.

Às minhas queridas amigas Amanda, Angélica, Fernanda, Kedma, Mariana e Renata, pelos inúmeros momentos de felicidade.

Aos meus amigos Frank e Samantha que, mesmo distantes, nunca deixaram de partilhar comigo os momentos de felicidade e tristeza.

Aos amigos do Laboratório Júlia Ferreira da Silva, Lucas Guimarães e Vicentina da Silva, pelo carinho, ensinamentos e ajuda durante toda a execução do experimento.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

Muito obrigada!

“Só existem dois dias do ano em que nada pode ser  
feito, o dia de ontem e o dia de amanhã.  
Portanto, hoje é o dia certo.  
Sonhe, acredite e principalmente FAÇA”.

Dalai Lama

**BIOGRAFIA**



Aline Ramalho Brandão Pereira nasceu na cidade do Rio de Janeiro, no dia 28 de Julho de 1986. Filha de João Carlos Ramalho Pereira e Joice Zeca Ramalho Pereira, estudou no colégio Marista de Varginha (MG) e concluiu o ensino médio em 2003. Em 2005, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas, onde se graduou bacharel no ano de 2008. Em 2009, ingressou no mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o com a defesa da presente dissertação.

## RESUMO

A poluição com elementos-traço tem se tornado um sério problema em muitos países do mundo. A concentração desses elementos nos efluentes agroindustriais frequentemente excede os valores permitidos pela legislação ambiental. O uso das propriedades microbianas de bioabsorção, bioacumulação e associação com peptídeos ligantes de metais tem se tornado uma alternativa aos métodos convencionais de tratamento. Isto porque o tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço por microrganismos é extremamente eficaz e economicamente viável na remoção destes elementos, principalmente quando estes estão em baixas concentrações. O uso de fungos isolados de ambientes contaminados na remoção desses elementos tem despertado muito interesse na área de biotecnologia, uma vez que, provavelmente, eles possuem estratégias que permitem que tolerem e removam estes elementos do ambiente. Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar a remoção dos elementos Cu, Mn e Zn, presentes na água residuária do café, pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de ambientes contaminados e não contaminados por elementos-traço, em erlenmeyers e utilizando biofiltros aeróbios. Houve grande remoção de todos os elementos pelos fungos estudados, em ambos os testes realizados. Análises de microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X indicam que, provavelmente, os mecanismos utilizados pelos fungos para a remoção destes elementos sejam, prioritariamente, de bioabsorção. Estes resultados indicam que o uso destas espécies fúngicas (isoladas ou não de ambientes contaminados) seja uma alternativa promissora aos métodos de tratamento convencionais de efluentes contaminados.

Palavras-chave: Água residuária do café. Remoção. Elementos-traço. *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*

## ABSTRACT

The pollution with trace elements has become a serious problem in many countries of the world. The concentration of those elements in agroindustrial effluents frequently exceeds the values allowed by the environmental legislation. The use of the microbial properties of biosorption, bioaccumulation and association with metal binding peptides have become an alternative to the conventional treatment methods. This is because the treatment by microorganisms of effluents polluted with trace elements is extremely effective and economically viable in the removal of these elements, mainly when they are at low concentrations. The use of fungi, isolated from polluted environments, for the removal of those elements has been arousing much interest in the biotechnology area, probably because they possess strategies that allow them to tolerate and remove these elements from environment. This work was conducted with the objective of comparing the removal of the elements Cu, Mn and Zn, present in coffee wastewater, by the fungi *Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium citrinum* isolated from environments polluted and non-polluted by trace elements, in erlenmeyers and using aerobic biofilters. There was high removal of all of the elements by the fungi studied, in both tests conducted. Analyses of scanning electronic microscopy with ray-X microanalysis indicate that probably the mechanism used by the fungi for the removal of these elements is primarily biosorption. These results indicate that the use of these fungal species (isolated or not from polluted environments) is a promising alternative to the conventional treatment methods for polluted effluents.

Keywords: Coffee Wastewater. Removal. Trace elements. *Aspergillus brasiliensis*. *Penicillium citrinum*

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Remoção de elementos-traço por isolados de <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>Penicillium citrinum</i> em biofiltros</b> .....	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Elementos-traço</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Elementos-traço presentes na água residuária do café (ARC)</b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço</b> .....	24
<b>2.3.1</b>	<b>Biofiltros e material suporte</b> .....	27
<b>2.4</b>	<b>Elementos-traço e microrganismos</b> .....	29
<b>2.4.1</b>	<b>Biossorção</b> .....	31
<b>2.4.2</b>	<b>Bioacumulação</b> .....	33
<b>2.4.3</b>	<b>Utilização de metabólitos excretados</b> .....	35
<b>2.4.4</b>	<b>Uso de fungos na remoção de elementos-traço do ambiente</b> .....	36
<b>2.4.5</b>	<b>Influência do pH e de uma combinação de elementos-traço, em sua remoção</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>CAPÍTULO 2 Tolerância e remoção de elementos-traço por fungos filamentosos isolados de regiões contaminadas e não contaminadas</b> .....	55
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	57
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	59
<b>2.1</b>	<b>Obtenção dos isolados e multiplicação dos inóculos</b> .....	59
<b>2.2</b>	<b>Coleta de amostra de água residuária do café (ARC): qualificação e quantificação de elementos-traço</b> .....	60
<b>2.3</b>	<b>Teste de tolerância a elementos-traço</b> .....	60
<b>2.3.1</b>	<b>Análise estatística do teste de tolerância aos elementos-traço Cu, Mn e Zn</b> .....	61
<b>2.4</b>	<b>Teste de remoção de elementos-traço em escala laboratorial</b> .....	62
<b>2.4.1</b>	<b>Análise estatística do teste de remoção de elementos-traço em escala laboratorial</b> .....	63
<b>2.4</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X</b> .....	63
<b>2.5</b>	<b>Teste de remoção de elementos-traço em biofiltros aeróbios</b> .....	64

2.5.1	Biofiltros .....	64
2.5.2	Inoculação dos fungos isolados de região contaminada em material suporte e ativação dos biofiltros .....	65
2.5.3	Análise estatística dos resultados obtidos nos testes em biofiltros...	68
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
3.1	Teste de tolerância aos elementos-traço Cu, Mn e Zn.....	69
3.1	Avaliação dos elementos-traço presentes na ARC .....	76
3.2	Teste de remoção dos elementos-traço em escala laboratorial .....	77
3.3	Teste de remoção de elementos-traço em biofiltros aeróbios.....	92
3.4	Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raio-X	100
4	CONCLUSÕES .....	109
	REFERÊNCIAS.....	110

## CAPÍTULO 1

### **Remoção de elementos-traço por isolados de *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* em biofiltros**

#### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

O crescimento populacional, aliado ao desenvolvimento de atividades agropecuárias e industriais, tem produzido diversos efeitos negativos sobre o ambiente, com o aumento da poluição e a degradação dos recursos naturais, podendo gerar desequilíbrios irreversíveis nos diferentes ecossistemas.

A cafeicultura é uma das atividades mais importantes do Brasil, tanto do ponto de vista econômico como social, sendo responsável pela geração de milhares de empregos diretos e indiretos.

O processamento do café pode ser realizado por via seca ou úmida. O processamento via úmida requer o uso de grandes volumes de água nas etapas de separação, descascamento, despolpa e desmucilagem, gerando, assim, grande quantidade de águas residuárias (ARC).

Dentre os diversos compostos presentes na ARC estão os resíduos provenientes de agrotóxicos e fertilizantes. O uso de agroquímicos é uma prática comum na agricultura, pois visa obter o aumento do suprimento de nutrientes do solo, a correção de seu pH e a proteção das lavouras pelo controle de pragas. Estes produtos contêm, em sua composição, várias combinações de elementos-traço (também denominados metais pesados) que, se liberado nos mananciais sem o tratamento adequado, podem acarretar em muitos prejuízos ao meio ambiente.

Os elementos-traço, dentre os vários poluentes existentes, têm despertado muito interesse, uma vez que, quando estão acima das concentrações

permissíveis, são extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos. Isso se deve ao fato de esses elementos não possuírem caráter de biodegradação e serem bioacumuláveis, podendo, assim, ser transferidos ao longo da cadeia trófica e comprometer a saúde humana.

Os métodos de tratamentos convencionais de efluentes contaminados por elementos-traço podem gerar subprodutos com características recalcitrantes e constituem-se de técnicas caras e de baixa reprodutibilidade.

Entre os métodos de tratamento alternativos estudados, um dos mais promissores é a bioissorção, um processo de sorção que se baseia na propriedade dos elementos-traço de se ligarem a vários materiais biológicos, tais como algas, leveduras, fungos, bactérias e plantas.

O uso de microrganismos em tratamento de efluentes contaminados por íons metálicos por meio da bioissorção, principalmente de fungos filamentosos, tem se destacado em relação aos outros métodos tradicionais, pois tais microrganismos apresentam maior resistência a elementos-traço tóxicos, o que proporciona seu crescimento e desenvolvimento em meios que contêm altas concentrações desses poluentes. Os elementos-traço podem ficar aderidos na superfície da parede celular de tais microrganismos (bioissorção) ou, então, se bioacumularem em organelas ou se ligarem a proteínas de seu interior celular.

A utilização de fungos isolados de ambientes contaminados por estes elementos no tratamento de efluentes é uma alternativa muito promissora, uma vez que, se os microrganismos conseguem proliferar em um ambiente contaminado, provavelmente possuem estratégias para tolerar e crescer em tal situação. Além disso, são ideais para a remoção de elementos-traço, quando estão em concentrações de 1 a 100 mg/L, pois os métodos tradicionais de tratamento não são eficazes para esta finalidade, quando em pequenas concentrações.

É no contexto da busca constante de métodos alternativos de tratamento de efluentes que surge a necessidade do estudo de novas espécies fúngicas que apresentem capacidade de retenção de elementos-traço, visando à otimização dos processos de tratamento de águas residuárias.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar a remoção dos elementos cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) presentes na água residuária do café, pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de ambientes contaminados e não contaminados por elementos-traço, em escala laboratorial e utilizando biofiltros aeróbios, visando comparar a eficiência de remoção a partir de uma prévia exposição do fungo ao poluente.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Elementos-traço

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Dessa maneira, os problemas decorrentes da ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados por meio de alterações na qualidade do solo, ar e água.

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. A economia de água em processos produtivos vem ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem (KUNZ; ZAMORA; DURÁN, 2002).

Dentre os contaminantes conhecidos destacam-se os elementos-traço, termo que tem sido empregado para definir metais catiônicos e aniônicos presentes em baixas concentrações (usualmente  $<1\text{g kg}^{-1}$ ), em solos e plantas. Este termo tem sido preferido em diversas publicações recentes, em substituição à expressão metal pesado, a qual nunca foi definida por nenhum órgão oficial na área de química, sendo, assim, pouco usual (GUILHERME et al., 2005).

A liberação de elementos-traço para o meio ambiente se deve, principalmente, ao aumento das atividades agroindustriais e tem apresentado diversas ameaças ao ambiente e à saúde humana (CERBASI; YETIS, 2001). Quando dispostos indevidamente no meio ambiente, podem interferir no funcionamento das plantas e da biota do solo, inibindo uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos, e afetar a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

Segundo Volesky e Holan (1995), elementos-traço tóxicos, especialmente cobre (Cu), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e zinco (Zn), estão sendo,

cada vez mais, liberados no meio ambiente por meio de águas residuárias industriais, agrícolas e outras atividades humanas. Estes elementos estão comumente associados a poluição e à toxicidade, mas também incluem alguns elementos que são biologicamente essenciais para os seres vivos em baixas concentrações, tais como Cr, Co, Cu, Mn, Se.

De acordo com Volesky (2001), os elementos-traço que mais preocupam e representam um risco ambiental são, em ordem de prioridade, As, Cd, Pb, Hg, Cr, Co, Cu, Ni, Zn e Al.

Segundo Barros (2006), a poluição de uma bacia hidrográfica por tais elementos pode causar alterações das propriedades físicas, químicas e biológicas da massa de água, comprometendo o seu uso para o consumo humano e para outros tipos de atividades, dependendo do grau de poluição ou contaminação.

Estas substâncias reduzem a capacidade autodepurativa das águas, devido à ação tóxica que exerce sobre os microrganismos responsáveis pela depuração natural em sistemas aquáticos (BRANCO, 1986).

Segundo Clarisse et al. (1999), a contaminação dos mananciais por elementos-traço pode causar alterações das características físicas (turbidez, cor, temperatura, viscosidade, tensão superficial), químicas (demanda química de oxigênio, ou DQO, pH, força iônica, oxigênio dissolvido (OD), grau de toxicidade e nutrientes) ou biológicas (espécies de fitoplâncton e zooplâncton), comprometendo a qualidade da água para o consumo humano.

Os elementos-traço e sua toxicidade são de particular interesse para a saúde pública, pois estas substâncias não podem ser quimicamente transformadas ou destruídas (DAVIS; VOLESKY; VIEIRA, 2001). Por causa de sua toxicidade, a presença de elementos-traço nos mananciais pode interferir em muitos usos benéficos da água (AZIZ; ADLAN; ARIFFIN, 2007).

O elemento-traço Cu é utilizado intensivamente como catalizador, como branqueador, na indústria petrolífera, como mordente, em tinturaria e como

agente oxidante em corantes; também como fungicida, na pintura de cascos de navios, de madeira ou aço, inseticida e como aditivo em solos (LEMOS et al., 2010). Em humanos, este elemento é necessário para o desenvolvimento do tecido conjuntivo, revestimentos de nervo e osso (FRAGA, 2005) e também incorporado em várias enzimas que catalisam reações importantes (SETH et al., 2004).

No entanto, o elemento-traço Cu torna-se tóxico e carcinogênico quando uma grande dose é ingerida, sendo encontrados vários relatos na literatura. Os sintomas da intoxicação incluem, dor abdominal, náuseas, vômitos, cefaleia, letargia, diarreia, taquicardia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, hemorragia gastrointestinal, insuficiência renal e a morte (JANET; ADAMS; KEEN, 2005). Segundo Davis, Volesky e Vieira (2000), altas doses de Cu, quando ingeridas, podem se depositar no cérebro, na pele, nos rins, no pâncreas e no miocárdio.

O Mn é um elemento essencial à vida animal e vegetal, pois faz parte da constituição de certas enzimas e, provavelmente, condiciona a utilização de certas vitaminas (B1). Por estas razões, é frequentemente adicionado a fertilizantes e a preparados vitamínicos farmacêuticos. A sua deficiência provoca a diminuição de clorofila nas plantas (que adquirem um aspecto amarelado) e perturbações nos tecidos ósseos dos animais. Os compostos de manganês, genericamente, não são considerados tóxicos. Contudo, as propriedades oxidantes de alguns permanganatos podem causar irritação da pele e a inalação dos seus vapores pode ser bastante prejudicial (NAUTILLUS, 2011).

O Zn, em sua forma metálica, tem limitada biodisponibilidade e não apresenta nenhum risco ecológico. Entretanto, pode reagir com outras substâncias químicas, como ácidos e oxigênio, para formar compostos que podem se tornar potencialmente tóxicos (RADHIKA; SUBRAMANIAN; NATARAJAN, 2006). É considerado um elemento essencial para a saúde do ser

humano, entretanto, pode exibir toxicidade gastrointestinal devido à acumulação deste elemento no corpo humano (WALSH et al., 1994). Além disso, o Zn pode trazer sérios riscos à saúde humana, se ingerido além da concentração recomendada de 100-300 mg Zn/dia, como náuseas, vômito, problemas gastrointestinais, letargia, fadiga e alterações na resposta imune (FOSMIRE, 1990).

Os valores máximos de elementos-traço permitidos em efluentes, de acordo com a Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005), o CONAMA, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Padrão de lançamento de efluentes, segundo a Resolução 357 do CONAMA

Elemento-traço	Concentração máxima permitida
Cu	1 mg/L
Mn	1 mg/L
Zn	5 mg/L

Os valores máximos de elementos-traço permitidos em efluentes, segundo a Deliberação Normativa nº 10 da Comissão de Política Ambiental de Minas Gerais (COPAM) (MINAS GERAIS, 1986), estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Padrão de lançamento de efluentes, segundo a Deliberação Normativa nº 10 do COPAM

Elemento-traço	Concentração máxima permitida
Cu	0,5 mg/L
Mn	1 mg/L
Zn	5 mg/L

Portanto, tornou-se extremamente importante, nos anos recentes, a pesquisa de métodos para diminuir os níveis de poluição/contaminação causados pela presença de elementos-traço em efluentes líquidos, de modo a atender à legislação ambiental vigente (CALFA; TOREM, 2007)

Os efeitos adversos de tais elementos sobre o ambiente e seus acréscimos por meio da cadeia alimentar têm promovido a investigação para o desenvolvimento de técnicas eficientes e de baixo custo para o tratamento de efluentes contaminados (VOLESKY; HOLAN, 1995). Dentre estes tratamentos, destaca-se o uso de microrganismos resistentes à toxicidade de elementos-traço.

## **2.2 Elementos-traço presentes na água residuária do café (ARC)**

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo e o segundo maior consumidor, perdendo apenas para os Estados Unidos. Mas, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), até 2015, será também o maior consumidor (MELO, 2009). Assim, o café é um dos produtos mais importantes para o Brasil e é, sem dúvida, de notória importância e expressividade para a sua economia (SILVA, 1999).

Levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2010) mostra que em Minas Gerais existe um milhão de hectares de café em produção. As principais regiões produtoras são Sul de Minas (50,2%), Cerrado (22,5%) e Zona da Mata (27,4%). A safra mineira de café equivale a 52,3% da brasileira, estimada em 48,1 milhões de sacas (CONSUMO..., 2011).

O processamento do café pode ser realizado por via seca ou úmida. Embora o Brasil seja conhecido como produtor de grãos de café obtidos por via seca, alguns produtores começaram a optar pelo processamento via úmida, visando atender à crescente demanda internacional por grãos de alta qualidade e que proporcionem bebidas finas (MATOS et al., 2003).

O processamento via úmida requer grandes volumes de água nas etapas de eliminação da casca, fermentação e lavagem. Para cada saca de café produzido são gerados 3.500 litros de água residuária do café (ARC) (MELO, 2009).

Com o processamento pós-colheita dos frutos do cafeeiro, gera-se água residuária (ARC) que contém altas concentrações de resíduos sólidos, além de altos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), o que a torna bastante poluente (MATOS; LO MÔNACO, 2003).

O efluente gerado pelo processamento via úmida é rico em material orgânico e inorgânico que, se dispostos sem tratamento no ambiente, podem causar grandes problemas ambientais, como degradação ou destruição da flora e da fauna, além de comprometer a qualidade da água e do solo (MATOS et al., 2006).

Dentre os compostos inorgânicos presentes na ARC, está uma grande quantidade de elementos-traço provenientes do uso de fertilizantes, corretivos e defensivos que se acumulam no fruto (KIEKENS; COTTENIE, 1985). Esses insumos (fertilizantes, calcários, esterco e lodos de esgoto) podem constituir fontes de poluição não-pontuais de solos e sistemas aquáticos (GUILHERME et al., 2005).

Os adubos comerciais têm, em sua composição, além dos compostos desejáveis, elementos-traço tóxicos, principalmente Cd, Pb, Cr (GONÇALVES JÚNIOR; PESSOA, 2002), Zn e Ni (AMARAL SOBRINHO; COSTA; VELLOSO, 1992). De acordo com Alloway (1990), fertilizantes, fungicidas, inseticidas e herbicidas contêm várias combinações de elementos-traço, tanto como constituintes ativos, quanto como impurezas.

Segundo Gimeno-Garcia (1996), os elementos traços predominantes em áreas agrícolas com resíduos de fertilizantes e pesticidas são Mn, Zn, Co e Pb.

Os agrotóxicos são um dos poluentes que contêm elementos-traço em sua composição. Uma vez na água, podem tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como podem se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvidos por organismos, podendo, então, ser bioacumulados ao longo da cadeia trófica (NIMMO, 1985). Entretanto, segundo Soares et al. (2008), a ARC contém N, P, K, Ca, Mg e micronutrientes. Assim, se corretamente tratada, pode ser reutilizada para suprir parte da água e dos nutrientes demandados pelas lavouras.

Gonçalves (2006) avaliou a presença de elementos-traço em ARC e detectou a presença de Cu, Zn e Mn, nas concentrações de 1,27 mg/L, 0,66 mg/L e 1,33 mg/L, respectivamente. Vasco (1999), em estudo semelhante, encontrou 4 mg/L de Zn e 5 mg/L de Cu na ARC de uma fazenda de Londrina (PR). Melo (2009) realizou uma análise química de micronutrientes presentes na ARC de uma fazenda em Botucatu (SP) e constatou a presença de 0,6 mg/L de Cu, 0,7 mg/L de Mn e 2 mg/L de Zn.

Na Tabela 3 apresentam-se a função biológica dos principais elementos-traço encontrados na ARC, sua ação nos organismos vivos quando em concentrações adequadas e sua toxicidade às plantas e aos micro-organismos, quando presentes em altas concentrações.

Tabela 2 Função biológica e toxicidade dos elementos-traço Cu, Mn e Zn

Elemento	Função biológica	Toxicidade relativa	
		Plantas	Mamíferos
Cu	Essencial para todos os organismos.		
	Cofator em enzimas redox e no transporte de O <sub>2</sub> .	MA (20-100)	M
Zn	Essencial para todos os organismos.		
	Cofator em muitas enzimas.	BM (100-400)	BM
Mn	Essencial para todos os organismos.		
	Cofator em muitas enzimas.		
	Envolvido na reação de quebra da água na fotossíntese	BM (300-500)	M

Letras classificam a toxicidade como baixa (B), moderada (M) e alta (A). (2) Números entre parênteses denotam a concentração do elemento no tecido foliar (base seca) que indica toxicidade em plantas que não são nem altamente sensíveis nem tolerantes  
 Fonte: McBride (1994 apud GUILHERME et al., 2005)

Segundo a legislação ambiental vigente (BRASIL, 2005), os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedçam às condições, aos padrões e às exigências dispostos na Resolução 357.

Recentemente, têm-se algumas possibilidades de destinos à ARC, como construção de lagoas de decantação, sedimentadores e filtros orgânicos. Porém, esses métodos podem atingir custos elevados e, ainda, como no caso de lagoas de decantação, podem ocupar um espaço considerável (MELO, 2009). Assim, a realidade é que muitos produtores estão descapitalizados ou não possuem área suficiente para fazer as adequações necessárias, liberando, dessa forma, as ARCs nos mananciais, sem nenhum tratamento prévio.



A liberação a longo prazo dessas águas residuárias no ambiente pode resultar no acúmulo de elementos-traço no solo, exercer uma pressão seletiva sobre a microbiota presente neste ambiente e constituir um grave risco à saúde humana. Assim, é de grande importância a exploração de microrganismos de tais nichos ecológicos para seu uso na biossorção de elementos-traço, uma vez que as tecnologias convencionais, tais como troca iônica, precipitação química, osmose reversa ou evaporação, são, muitas vezes, ineficientes e de alto custo, especialmente para elementos-traço presentes em baixa concentração (SPRINTI; ZHUANG; TRUJILLO, 1995; ZHOU, 1999).

Segundo Gianfreda e Bollag (1996), quando a ARC é indevidamente disposta nos solos, pode afetar os processos bioquímicos do mesmo, devido à presença de elementos-traço neste efluente agrícola. Estes últimos inibem o crescimento microbiano e suas atividades enzimáticas, por encobrir cataliticamente os grupos ativos, tendo efeito desnaturante na conformação das proteínas ou por competir com os íons metálicos envolvidos na formação dos complexos enzima-substratos.

Portanto, devido à gravidade do problema, a busca por tratamentos alternativos para a ARC tem despertado o interesse de ambientalistas e pesquisadores de diversas áreas do conhecimento.

### **2.3 Tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço**

Os efeitos adversos dos elementos-traço sobre o meio ambiente e seus acréscimos por meio da cadeia alimentar têm promovido a investigação para o desenvolvimento de técnicas eficientes e de baixo custo para o tratamento de águas residuárias (ERRASQUIN; VAZQUEZ, 2003).

Como os elementos-traço não são agentes biodegradáveis, geralmente são removidos de efluentes contaminados por tratamentos físicos ou químicos

(AKAR; TUNALI, 2006). Os métodos convencionais para a remoção de elementos-traço dissolvidos incluem precipitação química, oxidação ou redução, troca iônica, osmose reversa, filtração, adsorção utilizando carvão ativado, tratamento eletroquímico e recuperação por evaporação (VOLESKY, 1994; BARROS, 2006).

Entretanto, estas técnicas são caras, podendo não ser viáveis em alguns casos, e suas propriedades de ligação a elementos-traço não são específicas (PRICE et al., 2001). Além disso, métodos como precipitação química e osmose reversa para a remoção de elementos-traço presentes em pequenas concentrações (abaixo de 100 mg L<sup>-1</sup>) resultam em incompleta remoção de elementos-traço, gasto excessivo de reagentes e energia, além de produzir grande quantidade de lodo tóxico devido ao acúmulo de elementos-traço (BRIERLEY et al., 1986; KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

Estas são as razões da busca constante de processos alternativos de tratamentos, como os que utilizam biossorção ou bioacumulação (VOLESKY, 1994). Segundo Bumbac et al. (2010), o processo de biossorção utiliza biomateriais, tais como bactérias, fungos, leveduras e algas, para o tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço. Este método alternativo de tratamento possui um bom custo-benefício para o tratamento de grandes volumes de efluentes contaminados com baixas concentrações de elementos-traço (na ordem de 1 a 100 mg L<sup>-1</sup>).

Segundo Calfa e Torem (2007), as vantagens de se utilizarem biossorbentes em vez de sorventes convencionais estão notadamente na relação custo-benefício inerente a essa tecnologia contemporânea. Algas, bactérias, fungos e materiais biológicos em geral (casca de coco, madeira, turfa, etc.) têm revelado adiversidade na captura de íons metálicos em ambientes aquosos e sua ubiquidade diminui o custo total de sistemas de tratamento.

Dentre estes materiais adsorventes, um dos mais utilizados é o uso das propriedades de adsorção química e física de microrganismos para o tratamento de águas residuárias, que possibilitam a remoção de material orgânico e inorgânico presente nesses efluentes (MATOS et al., 2003). A sorção de elementos-traço por microrganismos tem despertado a atenção de pesquisadores pela capacidade superior da biomassa microbiana, em comparação com outros adsorventes inorgânicos e orgânicos (KUREK; CZOBAN; BOLLAG, 1982).

O processo de sorção pode ser definido como sendo a acumulação de íons ou moléculas sobre uma superfície adsorvente, devido à ação de fenômenos de adsorção físicos e químicos em que as moléculas de um soluto são atraídas para sítios vagos na superfície de um substrato, fixando-se nestes locais em virtude da ação de forças físicas ou de ligações químicas (VALDMAN; LEITE, 2000).

A adsorção física é relativamente não específica, haja vista ocorrer devido à ação de pequenas forças intermoleculares (por exemplo, interação de dispersão, interação dipolo-dipolo) entre as moléculas. Logo, a molécula do adsorvato não está presa à superfície do adsorvente, podendo se mover pelo material fixador, sendo, geralmente, uma interação reversível (ATKINS, 1999).

A adsorção química é o resultado da formação de ligações químicas, nas quais o adsorvato forma uma camada sobre a superfície do adsorvente, fazendo com que as moléculas não estejam livres para deslocar-se. Quando a superfície é coberta por uma capa monomolecular de adsorvato, a capacidade do adsorvente é essencialmente eficiente (VALDMAN; LEITE, 2000).

Para a avaliação do processo de sorção, podem-se utilizar sistemas de reatores com pequenos volumes e altas concentrações de substratos orgânicos presente em seu interior, podendo ser constituídos por matéria orgânica viva ou matéria orgânica morta (BARROS, 2006).

### 2.3.1 Biofiltros e material suporte

Os processos físico-químicos de tratamento possuem custos relativamente mais elevados que os biológicos, que têm a vantagem de exercer menor efeito adverso sobre o meio ambiente (KAUFFMAN; PETERSEN; BJERRUM, 1999; METCALF & EDDY INC, 1991). Dessa forma, dentre os diversos tipos de reatores biológicos, os reatores com fungos representam uma alternativa para o tratamento de efluentes que possuem compostos recalcitrantes, como fenol e elementos-traço.

O uso de meios suporte em biofiltros para o crescimento fúngico otimiza o tratamento de efluentes contaminados por elementos-traço, uma vez que o uso da biomassa imobilizada facilita sua separação do meio aquoso, para a posterior recuperação dos elementos adsorvidos (TSEZOS; DEUTSCHMANN, 1990).

Os microrganismos podem crescer nos biofiltros livres e suspensos na solução, ou formando um biofilme em meios suportes. Microrganismos aderidos a substratos porosos são utilizados no processo de biofiltração para degradar ou adsorver compostos poluentes presentes em águas residuárias. Os meios suportes consistem de substâncias inertes, que possibilitam que os microrganismos cresçam aderidos a uma superfície. A eficiência do biofiltro está diretamente relacionada às propriedades e às características do meio suporte, como sua porosidade, grau de compactação, capacidade de aderência à biomassa microbiana, controle do pH, temperatura, umidade e conteúdo nutricional presentes em seu interior (SRIVASTAVA; MAJUNDER, 2008).

Segundo Huang, Huang e Morehart (1990), as células fungicas podem ser imobilizadas em areia e em muitos outros meios suporte para seu crescimento. A biomassa fungica morta imobilizada em fibras têxteis, poliacrilamida, alginato e compostos inorgânicos tem sido muito utilizada para a remoção de elementos-traço de soluções (TOBIN; L'HOMME; ROUX, 1993).

A imobilização de materiais biossorventes tem se mostrado mais conveniente em aplicações práticas devido à sua resistência mecânica, à capacidade antidegradativa, à morfologia e à estabilidade química, bem como à capacidade de regeneração (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1998; CABUK et al., 2006). Diferentes tipos de materiais suporte, como alginato (PRAKASHAM et al., 1999), álcool polivinílico Ca-alginato (PVA), de poliacrilamida, poliisopreno, polisulfona (BAI; ABRAHAM, 2003), sílica gel (CABUK et al., 2006) e sepiolite (BAG; LALE; TÜRKER, 1998), têm sido utilizados para a imobilização de células biológicas.

Além de pesquisas em escala de bancada, há evidências de sistemas comerciais de biossorção por meio de imobilização de biomassa que estão disponíveis no mercado. Wase e Forster (1997) citaram alguns sistemas baseados em algas. A companhia Bio-recovery Systems Inc. produz o biossorvente AlgaSORBTM, que é baseado em *Chlorella* imobilizada em géis de sílica ou poliacrilamida. Outro exemplo de biossorvente desenvolvido para sistemas industriais é chamado de Bio-fix, criado no antigo U.S. Bureau of Mines. Trata-se de um biossorvente granulado composto por uma variedade de biomassas, incluindo algas imobilizadas em esferas de polipropileno. Esse biorreagente pode ser empregado na remoção de metais alcalino-terrosos e tem sido utilizado no tratamento de drenagem ácida de minas (CALFA; TOREM, 2007).

A importância do uso de biorreatores é evidente devido ao baixo custo de sistemas à base de biomassas e à alta eficiência dos biorreagentes para capturarem elementos-traço em baixas concentrações de soluções aquosas (WASE; FORSTER, 1997).

## 2.4 Elementos-traço e microrganismos

Muitos elementos-traço são essenciais ao metabolismo microbiano (ex. Cu e Zn), enquanto outros não apresentam função metabólica. Entretanto, todos estes elementos tornam-se tóxicos acima de uma concentração mínima, embora os efeitos sejam dependentes da especificidade do microrganismo em mediar um processo em particular (MELO; AZEVEDO, 2008).

Os microrganismos desempenham um importante papel na área ambiental, com relação ao destino de elementos-traço, que são transformados em formas solúveis e insolúveis por vários mecanismos biológicos. Estes mecanismos fazem parte dos ciclos biogeoquímicos naturais e potencialmente úteis tanto para o tratamento *in situ* e *ex situ* de biorremediação de resíduos sólidos e resíduos líquidos (GADD, 2000).

Apesar de se prever que alguns elementos-traço são necessários para o crescimento fúngico, os níveis exigidos são muito pequenos (VALIX; TANG; MALIKM, 2001). Assim, quando as concentrações de elementos-traço no ambiente estão excessivamente elevadas, eles são tóxicos à maioria dos microrganismos, devido à sua natureza fortemente iônica, que os torna capazes de se ligar a muitos constituintes celulares, deslocando, assim, alguns elementos-traço essenciais à célula microbiana de seus sítios de ligação. Podem romper proteínas por meio da ligação aos grupos sulfidril e ácidos nucleicos, aos grupos hidroxil e fosfato (MELO; AZEVEDO, 2008).

Os elemento-traço, em pequenas concentrações, podem promover alterações morfológicas na célula microbiana, podendo torná-la inviável. Em concentrações relativamente elevadas dos mesmos, atuam como um agente antimicrobiano, induzindo a desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos (AVAKYAN, 1994). Apesar das ações naturais destes elementos sobre o metabolismo dos microrganismos, estes últimos demonstram uma capacidade de

sobreviver por meio da adaptação e mutação sob várias condições, incluindo altas concentrações de elementos-traço (VALIX; LOON, 2003).

De acordo com Kunito et al. (1999), a contaminação do solo por elementos-traço pode levar a um distúrbio no sistema solo, uma vez que a população microbiana sensível tende a diminuir, enquanto a população resistente tende a aumentar. A adaptação microbiana é um importante mecanismo de resposta à presença de contaminantes no solo e pode resultar no aumento na atividade da microbiota resistente. A pressão seletiva de ambientes contendo estes elementos tem levado ao desenvolvimento desta resistência para todos os elementos-traço tóxicos (ROUCH; LEE; MORBY, 1995).

Sítios contaminados representam nichos ecológicos nos quais uma poluição histórica pode resultar em uma incomum biodiversidade microbiana (LEMOS et al., 2008). Esses nichos, caminhos e redes metabólicas foram desenvolvidos como respostas às condições adversas, as quais podem vir a representar uma solução de descontaminação para as áreas poluídas (SPROCATI et al., 2006). Assim, uma grande variedade de fungos, bactérias e algas está sendo estudada para possíveis aplicações como biossorventes de elementos-traço na remediação ambiental (AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

Segundo Magyarosy et al. (2002), a elevada superfície em relação ao volume presente na célula microbiana e sua capacidade de desintoxicar ambientes contaminados com elementos-traço estão entre as razões que fazem com que estes organismos sejam considerados como potenciais alternativas às resinas sintéticas na remoção de elementos-traço de efluentes e resíduos sólidos.

De acordo com Kamizomo et al. (1989), as células microbianas têm potencial para tolerar ambientes contaminados com elementos-traço, com o efluxo do excesso de elementos-traço para o exterior celular, a mobilização e a imobilização dos mesmos.

A mobilização dos metais é a passagem de um estado insolúvel inicial (metais na forma de sulfetos ou óxidos metálicos, por exemplo), correspondente a uma fase sólida, para um estado solúvel final em fase aquosa (PÉREZ, 2006). Os mecanismos empregados pelos microrganismos podem mobilizar por meio da quelação por metabólitos e sideróforos microbianos e pela metilação, que pode resultar em volatilização. Esses processos podem levar a uma dissolução parcial ou completa de componentes metálicos e minerais insolúveis (GADD, 2004).

A imobilização é a passagem de um estado solúvel inicial em fase aquosa para um insolúvel final em fase sólida (PÉREZ, 2006). Segundo Lemos et al. (2008), inúmeros são os processos que levam à imobilização dos metais: bioissorção, bioacumulação e a associação com peptídeos ligantes de metais.

De acordo com Gadd (2004), quando as espécies catiônicas são absorvidas por meio do sistema de transporte de elétrons da membrana, podem ser ligadas, precipitadas, ou acumuladas dentro de estruturas ou organelas celulares, dependendo do elemento e do micro-organismo.

Estes processos podem ser utilizados pelo homem para a remoção de elementos-traço de ambientes contaminados.

#### **2.4.1 Bioissorção**

A bioissorção é uma ligação metabolismo independente, entre grupos de biopolímeros carregados negativamente que formam a parede celular fúngica a cátions metálicos, que se dá por meio de interações físico-químicas entre o metal e exopolissacarídeos ou outros materiais associados à parede celular (GADD, 1992; ERRASQUIN; VAZQUEZ, 2003). Dessa forma, a capacidade de “adsorver” elementos-traço vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie (MELO; AZEVEDO, 2008).



A parede celular consiste em uma estrutura estratificada composta de microfibrilas de quitina, as quais estão embebidas em uma matriz de pequenos polissacarídeos, proteínas, sais inorgânicos e pigmentos. As proporções dos componentes da parede celular variam grandemente de fungo para fungo. A quitina é um polímero de N-acetil-D-glicosamina (NAG). Os principais polissacarídeos da matriz da parede celular consistem de glicanos não-celulósicos, tais como compostos glicogenoides, mananos (polímeros de manose), quitosana (polímeros de glicosamina) e galactanos (polímeros de galactose) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Esta estrutura é considerada um complexo trocador de íons. A capacidade de troca iônica depende da presença de grupos funcionais e da estrutura espacial da parede celular. Dentre os principais grupos funcionais responsáveis por mecanismos de captação de elementos-traço, estão a carboxila, o grupo amino, o sulfato e o fosfato, que são responsáveis pela captação de cátions metálicos, por atração eletrostática ou por formação de ligações químicas (APARICIO, 2000; VEGLIÓ et al., 1997).

Segundo Kapoor e Viraraghavan (1997), no processo de biossorção, diversos mecanismos químicos podem estar envolvidos, como adsorção, troca iônica e ligação covalente dos elementos-traço a sítios específicos presentes na parede celular fúngica. O processo de biossorção é influenciado pela concentração inicial do elemento-traço, tempo de contato com o mesmo, a quantidade de biomassa, a temperatura e o pH do meio (YAN; VIRARAGHAVAN, 2003).

Segundo Melo e Azevedo (2008), a quantidade de elementos-traço ligados à superfície celular é muito superior àquela prevista pela estequiometria de ligação com os sítios reativos da superfície. Isso pode ser constatado por meio de estudos de microscopia eletrônica, nos quais, em um primeiro estágio, somente a quantidade estequiometria do elemento-traço se liga aos sítios ativos

da parede celular. Após esta ligação estequiométrica, os íons metálicos atuam como sítios de nucleação para a deposição de mais íons metálicos, determinando, assim, o aparecimento de agregados de elementos-traço chamados “cristaloides”.

Segundo Gomes, Mendonça-Hagler e Savvaidis (1998), a biossorção é um processo passivo, rápido, reversível e independente de energia metabólica, realizado tanto por biomassa viva quanto por biomassa morta, no qual atuam forças físico-químicas que promovem a atração e a ligação do íon metálico, molécula ou material particulado à biomassa.

Tsezos e Deutschmann (1996) destacaram três classes de biopolímeros microbianos que servem de sítios para a captação de elementos-traço: proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Tais componentes possuem, em sua estrutura, as espécies químicas amina, carboxila, hidroxila, fosfato, sulfato e outros que podem se ligar aos íons metálicos. Segundo Muzzarelli (1977), o grupamento amino presente na quitina e na quitosana presentes na parede celular fúngica possui importante papel na ligação aos elementos-traço.

É importante enfatizar que a biossorção de elementos-traço em diferentes espécies fúngicas envolvem diferentes grupos funcionais. Muraleedharam et al. (1994) demonstraram que o  $\text{Ca}^{+2}$  e o  $\text{H}^{+}$  são liberados no meio quando o fungo *Ganoderma lucidium* adsorve Cu, mostrando, assim, que, neste caso, a troca iônica é o principal mecanismo de remoção.

#### **2.4.2 Bioacumulação**

Na bioacumulação ocorre transporte de íons de elementos traços por meio da membrana celular e sua acumulação intracelular. De acordo com Collins e Stotzky (1992), na maior parte dos casos, a bioacumulação de

elementos-traço por microrganismos se deve, primeiramente, a fenômenos de superfície (adsorção).

Segundo Rossi (1990), para que este processo ocorra, depende de sistemas específicos de transporte e do grau de tolerância da célula ao elemento. Tais elementos atingem o interior celular, através do sistema de transporte de nutrientes, os quais são essenciais ao metabolismo microbiano. Brierley et al. (1985) demonstraram que a acumulação intracelular em bactérias de  $Mn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  ocorre pelo sistema de transporte de  $K^+$ .

Este processo de remoção é dependente de energia fornecida pelo metabolismo, ocorrendo somente em células vivas. A remoção de elementos-traço por este mecanismo é, geralmente, mais lenta que o mecanismo de adsorção físico-químico. Provavelmente, os elementos-traço são transportados para o interior celular através dos sistemas de transporte de metais essenciais para o desenvolvimento microbiano, ligando-se a organelas e a proteínas intracelulares (GADD, 1990) ou compartimentalizadas em vacúolos (VOLESKY; MAY; HOLAN, 1993).

Entretanto, deve ser destacado que a bioacumulação de elementos-traço é, em geral, muito menor do que a atingida pela biossorção. No caso da bioacumulação, o nível de elementos-traço acumulados situam-se em uma faixa de 0,5% a 2% do peso seco celular (MELO; AZEVEDO, 2008). Já no processo de biossorção, estima-se que a quantidade de elementos-traço adsorvida equivale a cerca de 10% a 15% do peso seco (STRANDBERG; SHUMATE; PARROT, 1981). Em outro estudo promovido por Murray e Kidby (1975), foi demonstrado que células de leveduras podem adsorver uma quantidade de elementos-traço em uma quantidade equivalente ao próprio peso celular.

Sabe-se que fungos filamentosos e leveduras têm a capacidade de acumular micronutrientes, tais como Cu, Zn, Co, Cr e Mn e metais que não fazem parte da sua dieta nutricional, como U, Ni, Cd, Sn e Hg, em quantidades

maiores do que as necessárias ao requerimento nutricional (LEMOS et al., 2008).

Segundo Malik (2004), somente o processo de biossorção não é suficiente para uma efetiva remoção dos elementos-traço dos efluentes, assim ocorrendo concomitantemente aos processos de bioacumulação, desenvolvidos apenas quando as células estão metabolicamente ativas.

Assim, a aplicabilidade de células metabolicamente ativas de fungos tolerantes a elementos-traço fornece um alto potencial biotecnológico para o tratamento de efluentes contaminados.

A utilização de células metabolicamente ativas e em crescimento deve ser uma melhor escolha para a remoção de elementos-traço de efluentes contaminados, por causa da sua capacidade de reposição e de absorção metabólica dos elementos após a adsorção física. Entretanto, a absorção dos elementos é limitada porque as células vivas estão sujeitas à influência de pH extremos, à toxicidade de altas concentrações de elementos-traço e de uma mistura desses elementos, que são fatores comumente encontrados em efluentes agroindustriais (MALIK, 2004).

Os mecanismos de acumulação e adsorção variam de acordo com a espécie microbiana ou, até mesmo, com a cepa estudada. Fatores físicos e químicos, como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros elementos-traço também influenciam no processo de captação do metal e, conseqüentemente, na eficiência e na seletividade da acumulação (GADD, 1990).

#### **2.4.3 Utilização de metabólitos excretados**

A utilização de metabólitos excretados por microrganismos também é uma estratégia para a remoção de elementos-traço do meio. Esses produtos

incluem metabólitos como o sulfeto ou o ácido oxálico e uma variedade de materiais extracelulares, tais como polissacarídeos e melaninas. Fungos e leveduras podem também produzir proteínas e polipeptídeos, como as metalotioneínas e os 7-glutamil peptídeos, em resposta à presença de certos níveis de elementos-traço presentes no ambiente. Alguns destes produtos são elemento-traço específicos e podem vincular uma quantidade substancial do conteúdo intracelular dos elementos cobre ou Cd, conferindo, assim, resistência da célula a esses elementos-traço (GADD; WHITE, 1993).

Uma série de compostos ligantes a elementos-traço, específicos e não específicos é produzida por microrganismos. Dentre os compostos não-específicos destacam-se os ácidos orgânicos simples, alcoóis e macromoléculas, polissacarídeos, ácidos húmico e fúlvico (SAYER; GADD, 2001).

Os micro-organismos em geral produzem e excretam compostos orgânicos e inorgânicos que podem complexar com elementos-traço, ocorrendo, assim, a imobilização do metal (HATCH; MENAWAT, 1978). Segundo Gadd (1999), a produção de ácido cítrico e oxálico por fungos também tem importante papel na remoção de elementos-traço do ambiente.

Outro exemplo, a quelação intracelular por proteínas metalotioneínas (PRESTA; STILLMAN, 1997) ou peptídeos 7-glutamil, é um dos mecanismo de resistência a  $\text{Cu}^{+2}$  presente em *Saccharomyces cerevisiae* (GADD; WHITE, 1989). Segundo estes autores, metalotioneína (MT) é conhecida como uma proteína, que tem uma função de desintoxicação de elementos-traço.

#### **2.4.4 Uso de fungos na remoção de elementos-traço do ambiente**

Segundo Leitão (2009), existem diversas vantagens no uso de fungos em detrimento de outros microrganismos na remoção de elementos-traço do ambiente. São mais versáteis em relação à amplitude de substratos que podem

usar. As características morfológicas e de crescimento dos fungos são responsáveis pela rápida colonização de substratos. Também têm a vantagem de serem relativamente fáceis de cultivar, sendo, assim, ideais para a produção em larga escala. Outra vantagem é a facilidade de separação da biomassa fúngica por filtração, devido à sua estrutura filamentosa. Em comparação com leveduras e bactérias, fungos filamentosos são menos sensíveis a variações de nutrientes, aeração, temperatura e pH.

O uso de fungos na remoção de elementos-traço tem recebido considerável atenção, devido à sua grande capacidade de fixação dos mesmos, podendo ser usados em processos de tratamento de efluentes que podem superar os métodos tradicionais (DUDDRIDGE; WAINWRIGHT, 1980).

Segundo Gadd (1990), o uso de fungos como agentes biossorbentes de elementos-traço tem aumentado significativamente, devido à presença de quitina, quitosana, glucana, manana e proteínas em sua parede celular, que exercem importante função na ligação com este poluente.

Os fungos desempenham papel importante na remoção de elementos-traço por meio de sua capacidade de adsorver tais elementos à parede celular, formando um complexo de metal de quitina (ZHOU et al., 2005), da produção de metalotioneínas (JAECKEL et al., 2005) e oxalatos, e acumulação extracelular no micélio (TABOSKI; PIO; RKO, 2005).

A parede celular fúngica é composta principalmente de polissacarídeos, alguns dos quais podem estar associados a proteínas, ou outros componentes, como lipídeos e melaninas (GADD, 1993). Estas biomoléculas possuem vários grupos funcionais (como amino, carboxila, sulfydryl, tiol e grupos fosfato) que desempenham um importante papel na sorção de elementos-traço (SRIVASTAVA; THAKUR, 2006).

Segundo Strandberg et al. (1981), as paredes celulares de fungos podem atuar como um trocador de cátions, devido à sua carga negativa proveniente da

presença de diferentes grupos funcionais, como, por exemplo, carboxílico, amina, fosfato ou sulfidril, em diferentes componentes da parede (hemicelulose, pectina, lignina, etc.). Esta estrutura é rica em polissacarídeos e glicoproteínas, como glucanos, quitina, mananas e fosfo-mananas. Estes polímeros atuam como possíveis ligantes a elementos-traço. A estrutura da parede celular fúngica apresenta 90% de sua massa seca, consistindo de polissacarídeos aminados ou não-aminados ou amino (FARKAS, 1980).

Alguns fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* exibem a propriedade de remover elementos traços do meio ambiente, pois apresentam maior resistência para elementos-traço tóxicos, o que proporciona o seu desenvolvimento em meios com altas concentrações destes elementos (BLUMER, 2002).

Fungos dos gêneros Mucorales e Rhizopus, e das espécies *Aspergillus niger* e *Fusarium flocciferum*, têm sido descritos como ótimo bio-sorventes de elementos-traço (AKTHAR; SATRY; MOHAN, 1996; DELGADO; ANSELMO, NOVAES, 1998). De acordo com Kurek, Czoban e Bollag (1982), a biomassa dos fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccaromyces* e *Trichoderma* são capazes de remover elementos traços de soluções aquosas.

Muitas espécies de fungos, como *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium spinulum* e *Aspergillus niger*, têm sido extensivamente estudadas na bio-sorção de elementos-traço, sendo que a quantidade de remoção varia por espécie (ZHOU; KI, 1991; HAFEZ; ABDEL-RAZEK; HAFEZ, 1997;. KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1997). Segundo Wainwright et al. (1986), biomassa de *Aspergillus niger* é capaz de remover quantidades significativas de Pb, Cu e sulfetos de Zn, por meio do processo de adsorção.

Segundo Leitão (2009), o uso de espécies do gênero *Penicillium* apresenta vantagens em relação a outras espécies fúngicas, devido à sua grande

habilidade de crescer em ambientes salinos e hipersalinos, como a maioria dos efluentes agroindustriais, incluindo a água residuária do café.

No trabalho de Lemos et al. (2008) está sintetizado o resultado de alguns trabalhos de maior sucesso com o emprego de fungos filamentosos na remoção de elementos-traço (Tabela 4).

Tabela 4 Remoção de elementos-traço por fungos filamentosos

Fungo	Elementos-traço	Referência
<i>Aspergillus Níger</i>	Au, Ag, Cd, Cu, U e Zn	Kuyucak e Volesky, 1988; Gee e Dudeney, 1988; Townsley et al., 1986; Mullen et al., 1992 e Price et al., 2001.
<i>Penicillium digitatum</i>	Cd, Ni, Pb e Zn	Galun et al., 1987
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cd, Cr, Cu, Pb e Zn	Volesky e Holan 1995; Niu et al., 1993; e Holan e Volesky, 1994
<i>Penicillium spinulosum</i>	Au, Cd, Cu, Mn, Zn	Townsley et al., 1986 e Ross e Townsley, 1986.

Outro aspecto que torna atrativo o uso de microrganismos no tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço é o aproveitamento dos microrganismos excedentes gerados pela indústria de fermentação nos processos de remoção de elementos-traço de efluentes contaminados. O reaproveitamento da biomassa reduz o custo da obtenção dos bioissorventes, tornando este processo economicamente viável (SINGLENTON; SIMMONS, 1996).

Kapoor, Viraraghavan e Cullimore (1999) também concluíram que a biomassa fúngica pode ser facilmente produzida, com baixos custos e em quantidades substanciais, como um subproduto dos processos industriais em larga escala para a bioissorção de elementos-traço. A conversão de resíduos de biomassa em bioissorventes de elementos-traço pode diminuir os problemas ambientais gerados por tais elementos e, ao mesmo tempo, reduzir o custo da disposição do resíduo de biomassa produzida.



#### **2.4.5 Influência do pH e de uma combinação de elementos-traço, em sua remoção**

O pH altera a solubilidade dos elementos-traço, além de afetar a atividade dos grupos funcionais presentes na parede celular, que são sítios de ligação a estes elementos (SANNASI et al., 2006).

Segundo Tsekova, Todorova e Ganeva (2006), o pH é um dos principais fatores que interferem na eficiência de remoção dos diferentes elementos-traço. Variações no pH podem provocar alterações nos componentes presentes na parede celular fúngica responsáveis pela adsorção aos elementos-traço e, conseqüentemente, alterar a remoção dos mesmos do ambiente.

Para alguns microrganismos, a elevação do pH favorece a remoção de metais, como o Cu e o Zn, por exemplo. No entanto, o emprego de valores de pH acima de 5 promove a precipitação do cátion, inviabilizando a sua remoção (LEMOS et al., 2008).

Segundo Chang, Law e Chang (1997), em baixos valores de pH ocorre menor remoção de elementos-traço, devido à competição de prótons ( $H^+$ ) e cátions metálicos por sítios não-específicos presentes na parede celular, resultando em um aumento de sítios protonados. Esse fato gera um ambiente carregado positivamente, resultando em uma redução da ligação de cátions e, conseqüentemente, da captação de elementos-traço pela biomassa fúngica.

A presença de elementos-traço em combinação pode ter maior efeito sobre os parâmetros microbiológicos e atividades enzimáticas do que elementos-traço isolados e em altas concentrações (RENELLA et al., 2003).

A interação simultânea entre vários elementos-traço e os microrganismos pode resultar em efeitos sinérgicos, antagônicos, ou aditivos. Estes mecanismos de interação podem ser particularmente únicos e complexos,

dependendo das linhagens microbianas. Os efeitos de elementos-traço combinados no microrganismo (por exemplo, estimulação do crescimento ou toxicidade) são diferentes destes mesmos efeitos quando esses elementos estão sozinhos no meio (GIKAS, 2008).

A presença de outros cátions na solução pode interferir bloqueando alguns sítios de ligação a elementos-traço presentes na parede celular. Ambos, bioacumulação e biossorção de cátions, como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{+}$ , são reduzidos em pH baixo. A presença de elementos-traço tóxicos no meio de crescimento pode alterar a composição da parede celular, podendo resultar na produção de melaninas, aumentando, assim, a capacidade de ligação a elementos-traço (GADD et al., 1995).

O tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço por fungos, em escala industrial, necessita que os mesmos sejam imobilizados em uma matriz sólida, pois o pequeno tamanho das partículas e sua baixa densidade dificultam a separação da biomassa e do efluente tratado. Assim, o uso de biomassa imobilizada em biofiltros facilita a sua separação da solução aquosa e sua manipulação (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1998).

## REFERÊNCIAS

ADRIANO, D. C. **Elements in the terrestrial environments: biochemistry, bioavailability and risk of metals**. New York: Springer, 2001. 866p.

AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 12, p. 2243-2257, Sept. 2007.

AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 15, p. 1780-1787, Oct. 2006.

ALLOWAY, B. J. Soil processes and the behaviour of metals. In: ALLOWAY, B. J. (Ed.). **Heavy metals in soils**. Glasgow: Blackie, 1990. cap. 2.

AMARAL-SOBRINHO, N. M. B.; COSTA, L. M.; VELLOSO, A. C. X. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 16, n. 2, p.271-276, mar./abr. 1992.

APARICIO, S. **Chromium biosorption by the algal biomass *Sargassum sp.*** 2000. 45p. Tesis (Master of Science of Kemi ol Metallurgy) - Lulea University of Techonology, Lulea, 2000.

AVAKYAN, Z. A. The toxicity of heavy metals to microorganism. **Qatar University Science Journal**, Doha, v. 14, p. 3-65, 1994.

AZIZ, H. A.; ADLAN, M. N.; ARIFFIN, K. S. Heavy metal (Cd, Pb, Zn, Ni, Cu and Cr (III)) removal from water in Malaysia : Post treatment by hight quality limestone. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 6, p. 1578-1583, May 2007.

BAG, H.; LALE, M.; TÜRKER, A. R. Determination of iron and nickel by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration on *Saccharomyces cerevisiae* immobilized sepiolite. **Talanta: an international journal of analytical chemistry**, London, v. 47, n. 3, p. 689-696, Nov. 1998.

BAI, R. S.; ABRAHAM, T. E. Studies on chromium (VI) adsorption-desorption using immobilized fungal biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 87, n. 1, p. 17-26, Mar. 2003.

BARROS, A. J. M. Thermogravimetric study of the sorption process of heavy metals in organic solid waste. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 184-190, abr./jun. 2006.

BLUMER S. A. G. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccaromyces cerevisiae***. 2002. 53 p. Tese (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3. ed. São Paulo: Cetesb/Ascetesb, 1986. 616 p.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 53, de 18 mar. 2005. Seção 1. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705 .pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2011.

BRIERLEY, C. L. et al. Materials and biotechnology. In: HIGGINS, I. J.; BEST, B. J.; JONES, J. (Ed.). **Biotechnology: principles and applications**. Oxford: Blackwell Scientific, 1985. p. 163-213.

BUMBAC, C. et al. Heavy metals removal using residual fungal biomass. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, Cheltenham, v. 11, n. 3, p. 822-829, 2010.

CABUK, A. et al. Biosorption characteristics of *Bacillus* sp. ATS-2 immobilized in silica gel for removal of Pb(II). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 317-323, Aug. 2006.

CALFA, B. A.; TOREM, M. L. Biorreagentes: aplicações na remoção de metais pesados contidos em efluentes líquidos por biossorção/bioflotação (Bioreagents - their use in the removal of heavy metals from liquid streams by biosorption/bioflotation). **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 60, n. 3, p. 537-542, jul./set. 2007.

CERBASI, I. H.; YETIS, U. Biosorption of Ni (ii) and Pb (ii) by *Phanerochaete chrysosporium* from binary metal system - kinetics. **Water Research**, New York, v. 27, n. 1, p. 15-20, Jan. 2001.

CHANG, J. S.; LAW, R.; CHANG, C. C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *P. aeruginosa* PU21. **Water Research**, New York, v. 31, n. 7, p. 1651-1658, 1997.

CLARISSE, M. D.; AMORIM, M. C. V.; LUCAS, E. F. Despoluição ambiental: uso de polímeros na remoção de metais pesados. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 715, p. 16-24, 1999.

COLLINS, Y. E.; STOTZKY, G. Heavy metal alter the electrokinetic properties of bacteria, yeast and clay minerals. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 58, n. 5, p. 1592-1600, May 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, quarto levantamento. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos\\_09.12.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_09.12.pdf)>. Acesso em: 18 jan. 2011.

CONSUMO per capita de café no Brasil em 2010 é recorde de 4,81 kg. **Estado de Minas**, Belo Horizonte, 26 jan. 2011. Disponível em: <[http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2011/01/26/internas\\_economia,205997/consumo-per-capita-de-cafe-no-brasil-em-2010-e-recorde-de-4-81-kg.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2011/01/26/internas_economia,205997/consumo-per-capita-de-cafe-no-brasil-em-2010-e-recorde-de-4-81-kg.shtml)>. Acesso em: 18 jan. 2011.

DAVIS, A. P.; SHOKOUHIAN, M.; NI, S. Loading estimates of lead, copper, cadmium and zinc in urban runoff from specific sources. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 997-1009, Aug. 2001.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R. H. S. F. Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, New York, v. 34, n. 17, p. 4270-4278, Dec. 2000.

DELGADO, A.; ANSELMO, A. M.; NOVAIS, J. M. Heavy metal biosorption by dried powdered mycelium of *Fusarium flocciferum*. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 70, n. 3, p. 370-375, May/June 1998.

DUDDRIDGE, J. E.; WAINWRIGHT, M. Heavy metal accumulation by aquatic fungi and reduction in viability of *Gammarus pulex* fed Cd<sup>2+</sup> contaminated mycelium. **Water Research**, New York, v. 14, n. 11, p. 1605-1611, 1980.

ERRASQUIN, E. L.; VAZQUEZ C. Tolerance and uptake of heavymetals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 137-143, Jan. 2003.

FARKAS, V. Biosynthesis of cell wall of fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 44, n. 4, p. 117-141, Dec. 1980.

FOSMIRE, G. J. Zinc toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 51, n. 2, p. 225-227, Feb. 1990.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 26, n. 4-5, p. 235-244, Aug./Oct. 2005.

GADD, G. M. Biosorption. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 302-304, 1992.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 41, p. 47-92, 1999.

GADD, G. M. Fungi and yeasts for metal accumulation. In: EHRLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. (Ed.). **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 249-276.

GADD, G. M. Interaction of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 1, p. 25-60, May 1993.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma: an international journal of soil science**, Amsterdam, v. 122, n. 2/4, p. 109-119, Oct. 2004.

GADD, G. M.; WHITE, C. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeast. In: POLE, R. K.; GADD, G. M. (Ed.). **Metal microbe interactions**. Oxford: IRL, 1989. p. 19-38.

GADD, G. M.; WHITE, C.; WILKINSON, S. C. The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 35, n. 1/2, p. 17-40, 1995.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, J. M. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: STOTZKY, G.; BOLLAG, J. M. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 123-193.

GIKAS, G. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 159, n. 2/3, p. 187-203, Jan. 2008.

GOMES, N. C. M.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SAVVAIDIS, I. Metal bioremediation by microorganisms. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 85-92, set. 1998.

GONÇALVES JÚNIOR; A. C.; PESSOA, A. C. dos S. Fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em argissolo vermelho eutrófico a partir de adubos comerciais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 3, n.1-2, p.19-23, 2002.

GONÇALVES, M. **Caracterização e oxidação dos compostos orgânicos nas águas residuárias da despolpa úmida dos frutos do caféiro**. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos traços em solos e ecossistemas aquáticos. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 345-382.

HAFEZ, N.; ABDEL-RAZEK, A. S.; HAFEZ, M. B. Accumulation of some heavy metals on *Aspergillus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 68, n. 1, p. 19-22, 1997.

HATCH, R. T.; MENAWAT, A. Biological removal and recovery of trace heavy metals. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 8, p. 191-203, May 1978.

HUANG C.; HUANG, C. P.; MOREHART A. L. The removal of Cu (II) from dilute aqueous solutions by *S. cerevisiae*. **Water Research**, New York, v. 24, n. 4, p. 433-439, Apr. 1990.

JAECKEL, P. et al. Cadmium induced a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 333, n. 1, p. 150-155, July 2005.

JANET, Y.; ADAMS, U.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 26, n. 4-5, p. 268-298, Aug./Oct. 2005.

KAMIZOMO, A. et al. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 219, n. 1-2, p. 161-167, Oct. 1989.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal-biosorption: an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 53, n. 3, p. 195-206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 61, n. 3, p. 221-227, Sept. 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode. **Water Research**, New York, v. 32, n. 6, p. 1968-1977, June 1998.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus nidulans*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n.1, p.95-104, Apr. 1999.

KAUFFMANN, C.; PETERSEN, B. R.; BJERRUM, M.J. Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 71-74, July 1999.

KIEKENS; L.; COTTENIE, A. Principles of investigations on the mobility and plant uptake of heavy metals. In: LESCHBER, R. et al. (Ed.). **Chemical methods for assessing bioavailable metals in sludges and soils**. New York: Elsevier, 1985. p. 21-32.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 85-144.



KUNITO, T. et al. Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 4, n. 2, p. 174-181, Oct. 1999.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P.; DURÁN, S. G. M. N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

KUREK, E.; CZOBAN, J.; BOLLAG, J. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1011-1015, May 1982.

KUYUCAK, N.; VOLESKY, B. New algal biosorbent for a gold recovery process. In: NORRIS, P. R.; KELLY, D. P. (Ed.). **Biohydrometallurgy**. Kew Surrey: Science & Technology Letters, 1988. p. 453-464.

LEITÃO, A. L. Potential of penicillium species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 6, n. 4, p.1393-1417, 2009.

LEMOS, J. L. S. et al. **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

LEMOS, L. R. **Extração seletiva de cobre utilizando sistemas aquoso bifásicos**. 2010. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MAGYAROSY, A. et al. Nickel accumulation and nickel oxalate precipitation by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 2-3, p.382-388, July 2002.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, New York, v. 30, n. 2, p. 261-278, Apr. 2004.

MATOS, A. T. et al. Produtividade de forrageiras utilizadas em rampas de tratamento de águas residuárias da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 154-158, jan./mar. 2003.

MATOS, A. T.; MAGALHÃES, M. A.; FUKUNAGA, D. C. Remoção de sólidos em suspensão na água residuária da despolpa de frutos do cafeeiro em filtros constituídos por pergaminho de grãos de café submetido a compressões. **Engenharia Agrícola**, Sorocaba, v. 26, n. 2, p. 610-616, maio/ago, 2006.

MATOS, A. T.; LO MÔNACO, P. A. Tratamento e destinação final dos resíduos gerados no beneficiamento do fruto do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 647-708.

MELO A. C. de P. **Utilização de água residuária do processo pós-colheita do café na produção de mudas de cafeeiro**. 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.

MELO I. S.; AZEVEDO J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. rev. ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

METCALF & EDDY INC. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 3. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1991. 1334p.

MINAS GERAIS. Deliberação Normativa nº 10, de 16 de dezembro de 1986. Estabele normas e padrões para qualidade das águas, lançamentos de afluentes nas coleções de águas, e dá outras providências. **Minas Gerais: diário executivo**, Belo Horizonte, 10 jan. 1987. Disponível em: <[http://www.paas.uff.br/legisla/copam10\\_86.pdf](http://www.paas.uff.br/legisla/copam10_86.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2011.

MULLEN, M. D. et al. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxi*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 24, n. 2, p. 129-35, Feb. 1992.

MURALEEDHAREN, T. R. et al. Biosorption of rare-earth elements by *ganoderma lcidum*: mechanistic studies. **International Journal of Environment and Pollution**, Geneva, v. 4, n. 3-4, p. 256-266, 1994.

MURRAY A. D.; KIDBY D. K.; ROSSI, G. Sub-cellular location of mercury in yeast grown in the presence of mercuric chloride. **Journal of General Microbiology**, London, v. 86, n. 1, p. 66-74, Jan. 1975.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. Oxford: Pergamon, 1977.

NAUTILUS. **Tabela periódica**: cobre, acção biológica. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2010. Disponível em: <<http://nautilus.fis.uc.pt/st2.5/scenes-p/elem/e02940.html>>. Acesso em: 6 jan. 2011

NIMMO, D. R. et al. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: methods and applications. New York: Hemisphere, 1985. p. 335- 373.

NIU, H. et al. Removal of lead from aqueous solutions by penicillium biomass. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 42, n. 6, p.785-787, Sept. 1993.

PÉREZ, J. M. et al. *Geobacillus stearothermophilus* LV *cadA* gene mediates resistance to cadmium, lead and zinc in *zntA* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Biological Research**, Santiago, v. 39, n. 4, p. 661-668, 2006.

PRAKASHAM, R. S. et al. Biosorption of chromium VI by free and immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Environmental Pollution**, Barking, v. 104, n. 3, p. 421-427, Mar. 1999.

PRESTA, A.; STILLMAN, M. J. Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu (I) - Methallothionein in intact yeast cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 66, n. 1/4, p. 231-240, 1997.

PRICE, M. S.; CLASSEN, J. J.; PAYNE, G. A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 77, n. 1, p. 41-49, Mar. 2001.

RADHIKA, V.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. **Water Research**, New York, v. 40, n. 19, p. 3628-3636, Nov. 2006.

RENELLA, G. et al. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity to phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 35, n. 9, p. 1203-1210, Sept. 2003.

ROSSI, G. **Biohydrometallurgy**. Hamburgo: McGraw-Hill, 1990. 609p.

ROUCH, D. A.; LEE, B. T. D.; MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 14, n2, p. 132-141, Feb. 1995.

SANNASI, P. et al. Sorption of Cr(VI), Cu(II) and Pb(II) by growing and non-growing cells of a bacterial consortium. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 5, p. 740-747, Mar. 2006.

SAYER, J. A.; GADD, G. M. Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 10, p. 1261-1267, Oct. 2001.

SCHIMIDT C. A. P. et al. Concentrações de metais pesados em grãos de café produzidos em lavouras sobre solos originados do basalto e do arenito Caiuá. **Ciência Rural**, santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1591-1594, ago. 2009.

SETH, R. et al. In vitro assessment of copperinduced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 501-509, Aug. 2004.

SILVA, J. S.; BERBET, P. A. **Colheita, secagem e armazenamento do café**. Viçosa, MG: Aprenda fácil, 1999. 146p.

SINGLETON, I.; SIMMONS, P. Factors affecting silver biosorption by an industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 155-159, Jan. 1996.

SOARES, S. F. et al. **Água residuária do café: geração e aproveitamento**. Belo Horizonte: Epamig, 2008. (Circular Técnica, 30).

SPRINITI, M.; ZHUANG, H.; TRUJILLO, E. M. Evaluation of immobilized biomass beads for removing heavy metals from wastewater. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 67, n.6, p. 943-954, Sept./Oct. 1995.

SPROCATI, A. et al. Investigating heavy metals resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 366, n. 2-3, p. 649-658, Mar. 2006.

SRIVASTAVA, N. K.; MAJUMDER, C. B. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater: review. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 1-8, Feb. 2008.

SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 10, p. 1167-1173, July 2006.

STRANDBERG, G. W.; SHUMATE, S. E.; PARROT, J. R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, n. 1, p. 237-245, Jan. 1981.

TABOSKI, M. A. S. R.; PIO, T. G.; RKO, A. Lead and cadmium uptake in the marine fungi *Corollospora lacera* and *Monodictys pelagica*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 445-453, Aug. 2005.

TOBIN, J. M.; L'HOMME, B.; ROUX, J. C.; Immobilization protocols and effects on cadmium uptake by *Rhizopus arrhizus* biosorbents. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 7, n. 10, p. 739-744, Oct. 1993.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. E.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TOWNSLEY, C. C.; ROSS, I. S.; ATKINS, A. S. Copper removal from a simulated leach effluent using the filamentous fungus *Trichoderma viride*. In: ECCLES, H.; HUNT, S. (Ed.). **Immobilization of ions by biosorption**. Chichester: E. Horwood, 1986. p. 159-170.

TSEKOVA, K.; TODOROVA, D.; GANEV, A. S. Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 1, p. 1780-1787, Jan. 2006.

TSEZOS, M.; DEUTSCHMONN, A. A. An investigation of engineering parameters for the use of immobilized biomass particles in biosorption. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 29-39, 1990.

TSEZOS, M.; REMOUDAKI, E.; ANGELATOU, V. A Study of the effects of competing ions on the biosorption of metals. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 38, n. 1, p. 19-29, 1996.

VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F. Biosorption de cd, zn and cu by Sargassum sp. waste biomass. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 22, n. 2, p. 171-173, 2000.

VALIX, M.; LOON, L. O. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. **Mineral Engineering**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 193-198, Mar. 2003.

VALIX, M.; TANG, J. Y.; MALIKM, R. Heavy metal tolerance of fungi. **Minerals Engineering**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 499-505, May 2001.

VASCO, E. Z. Procesamiento de frutos do café por via humeda y generación de subproductos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA CAFEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: UFRP/IAPAR/IRD, 1999. p. 345-355.

VEGLIÓ, F.; BEOLCHINI, F.; GASBARRO, A. Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Athrobacter* sp. **Process Biochemistry**, London, v. 32, n. 2, p. 99-105, Feb. 1997.

VIRARAGHAVAN, T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water Research**, New York, v. 37, n. 8, p. 4486-4496, Nov. 2003.

VOLESKY, B. Advances in biosorption of metals: selection of biomass types. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 291-302, Aug. 1994.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 59, n. 2/3, p. 203-216, Feb. 2001.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, New York, v. 11, n. 3, p. 235-250, May/June 1995.

VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z. R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 41, n. 8, p. 826-829, Feb. 1993.

WAINWRIGHT, M. et al. Adsorption of insoluble compounds by mycelium of fungus *Mucorflavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 8, p. 597-600, Oct. 1986.

WALSH, C. T. et al. Zinc: health effects and research priorities from the 1990's. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 102, p. 5-46, June 1994. Supplement.

WASE, J.; FORSTER, C. **Biosorbents for metalions**. London: Taylor & Yan, 1997.

ZHOU, D.; ZHANG, L.; GUO, S. L. Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. **Water Research**, New York, v. 39, n. 16, p. 3755-3762, Oct. 2005.

ZHOU, J. L. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, n. 5, p. 686-693, 1999.

ZHOU, J. L.; KI, R. J. The uptake of copper from aqueous solution by immobilized fungal biomass. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 317-330, Apr. 1991.

## CAPÍTULO 2

### **Tolerância e remoção de elementos-traço por fungos filamentosos isolados de regiões contaminadas e não contaminadas**

#### **RESUMO**

O descascamento/despulpamento e a desmucilagem dos grãos de café geram um grande volume de água residuária, composta de uma série de elementos-traço que, se dispostos sem o devido tratamento no ambiente, podem causar uma série de prejuízos à saúde humana. O uso de fungos no tratamento de efluentes contaminados tem se apresentado como uma alternativa viável aos métodos de tratamento convencionais, uma vez que estes não são eficazes para o tratamento de efluentes contaminados com baixas concentrações de elementos-traço, como é o caso da água residuária do café. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a tolerância e a capacidade de remoção dos elementos-traço predominantes na água residuária do café (ARC), Cu, Mn e Zn, utilizando uma solução sintética com as concentrações destes elementos encontradas na ARC por espectrofotometria de absorção atômica (0,5, 1 e 5mg/L), pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas em escala laboratorial. Também foi feita a avaliação da capacidade de remoção dos elementos em biofiltros aeróbios por *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas. Foi feita análise de microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X para a avaliação do processo de adsorção dos elementos à parede celular fúngica. Conforme o esperado, as linhagens isoladas de regiões contaminadas se mostraram mais tolerantes aos elementos estudados em relação às linhagens isoladas de regiões não contaminadas. Com relação ao teste de remoção em escala laboratorial, as linhagens dos fungos em estudo responderam diferentemente aos elementos testados (independente de sua origem). Nos testes realizados em biofiltros, o fungo *Penicillium citrinum* apresentou maior capacidade de remoção dos elementos que o fungo *Aspergillus brasiliensis*. Por meio de microanálise de raios-X, foi observada a presença da maioria dos elementos testados aderidos à parede celular fúngica, indicando que o mecanismo de adsorção está envolvido na remoção dos elementos das soluções. Todos os fungos estudados apresentaram capacidade de remoção dos elementos Cu, Mn e Zn de solução, apresentando-se, assim, com uma alternativa aos tradicionais tratamentos de efluentes.

Palavras-chave: Tolerância. Remoção. Metais pesados. Fungos.



## ABSTRACT

### **Tolerance and removal of trace elements by filamentous fungi isolated from contaminated and uncontaminated regions**

The peeling/pulping and the demucilaging of the coffee beans generate a large volume of wastewater, composed of a series of trace elements that, if disposed without the due treatment in the environment, can cause a range of damage to human health. The use of fungi in the treatment of polluted effluents has presented as a viable alternative to the conventional treatment methods, because such methods are not effective for the treatment of effluents polluted with low trace element concentrations, as is the case of the coffee wastewater. The present study was conducted with the objective of evaluating the tolerance and the removal capacity of the predominant trace elements in the coffee wastewater (CW), Cu, Mn and Zn, using a synthetic solution with the concentrations of these elements found in CW by atomic absorption spectrophotometry (0.5, 1 and 5mg/L), by the fungi *Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium citrinum* isolated from polluted and non-polluted areas on a laboratorial scale. The evaluation of the removal capacity of the elements in aerobic biofilters was also conducted for *Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium citrinum* isolated from polluted areas. Scanning electronic microscopy analysis with X-ray microanalysis for the evaluation of the adsorption process of the elements to the fungal cellular wall was also carried out. As expected, the strains isolated from polluted areas they showed more tolerant to the elements studied in relation to the strains isolated from non-polluted areas. Regarding the removal test on a laboratorial scale, the strains of the fungi in study respond differently to the tested elements (independent of their origin). In the tests conducted in biofilters, the fungi *Penicillium citrinum* presented a higher removal capacity of the elements than the *Aspergillus brasiliensis* fungi. Through X-ray microanalysis, the presence of most of the tested elements adhered to the fungal cellular wall was observed, indicating that the adsorption mechanism is involved in the removal of the elements from the solutions. All of the studied fungi presented removal capacity of the elements Cu, Mn and Zn from the solution, presenting an alternative to traditional wastewater treatment.

Keywords: Tolerance. Removal. Heavy metal. Fungi.

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação de ambientes com elementos-traço tem se tornado um grave problema mundial. Tais elementos são encontrados em solos e efluentes frequentemente acima das concentrações permitidas pelos órgãos de fiscalização (LODEIRO, 2006). Sua disposição no ambiente, sem um tratamento adequado, tem ocasionado diversos problemas ambientais devido à sua alta toxicidade, recalcitrância e potencial bioacumulativo.

No descascamento/despulpamento e desmucilagem dos grãos de café, são gerados em torno de 3 a 5 L de água residuária para cada litro de frutos processado (MATOS, 2003). Assim, grandes volumes de resíduos líquidos, ricos em material orgânico e inorgânico são produzidos durante o processamento de café, dentre eles uma série de elementos-traço (também denominados, metais pesados) que, segundo Kiekens e Cottenie (1985), são provenientes do uso de fertilizantes, corretivos e defensivos que se acumulam nos frutos.

Quando os resíduos líquidos são dispostos sem tratamento no ambiente, podem causar grandes problemas ambientais, devido à natureza bioacumulativa e tóxica dos elementos-traço (DAVIS; SHOKOUHIAN; NI, 2001).

Existem diversos tratamentos convencionais físico-químicos de efluentes contendo elementos-traço. Porém, quando as concentrações dos mesmos estão entre 1 a 100 mg.L<sup>-1</sup>, estes métodos podem apresentar desvantagens como a remoção incompleta de metais, a elevada necessidade de reagentes e energia, a geração de subprodutos tóxicos e custos elevados (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

Portanto, a busca de métodos alternativos de tratamento de efluentes contaminados por elementos-traço tem despertado grande interesse, principalmente o uso de alguns microrganismos que possuem a habilidade de remover elementos-traço do ambiente (SIMÕES; TAUKE-TORNISIELO, 2005).

Tanto as células (parede celular e polissacarídeos) quanto os produtos excretados e os mecanismos de absorção dos elementos têm o potencial para removê-los de soluções que os contêm (NAKAGIMA; SAKAGUCHI, 1986).

A biomassa fúngica tem recebido considerável atenção devido à sua grande capacidade de fixação a metais, pois podem acumular e adsorver os elementos-traço por processos físico-químicos e mecanismos biológicos que incluem ligação dos elementos com polímeros presentes na parede celular e com metabólitos liberados no ambiente pelo fungo, e acumulação destes elementos em seu interior celular (LEMOS et al., 2008; GADD, 1990).

Segundo Valix, Tang e Malikm (2001), o uso de microrganismos isolados de ambientes contaminados na remoção de elementos-traço presentes em efluentes agroindustriais é uma alternativa promissora, uma vez que os microrganismos presentes nessas áreas provavelmente desenvolveram estratégias fisiológicas para sobreviverem em altas concentrações desses elementos.

Assim, neste trabalho, busca-se comparar a tolerância e capacidade de remoção de elementos-traço de efluentes sintéticos, que simulem os elementos e as concentrações dos mesmos encontrados na água residuária do café, pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas por elementos-traço, em escala laboratorial e em biofiltros aeróbios.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados e multiplicação dos inóculos

Foram utilizadas as espécies fúngicas *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*, ambas isoladas de solos da cidade de Três Marias, MG, contaminados por rejeitos de uma indústria de processamento de Zn. Conforme descrito por Lopes (2010), os fungos foram isolados no solo da região à profundidade de 0 a 20 cm. A área onde o fungo *Aspergillus brasiliensis* foi isolada é contaminada por Zn (6.680,3 mg dm<sup>-3</sup>), Cu (456,3 mg dm<sup>-3</sup>), Pb (77,3 mg dm<sup>-3</sup>) e Cd (159,5 mg dm<sup>-3</sup>) e pH 6,9. A área onde o fungo *Penicillium citrinum* foi isolado é contaminada por Zn (2.866,5 mg dm<sup>-3</sup>), Cu (138,6 mg dm<sup>-3</sup>), Pb (35,3 mg dm<sup>-3</sup>) e Cd (80,5 mg dm<sup>-3</sup>), e com pH 6,5.

Os fungos foram caracterizados morfológicamente no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (DCA/UFLA) e por técnicas moleculares, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-Piracicaba). Estão sendo mantidos por meio de três métodos de conservação de culturas (repicagens periódicas, Castellani e em microtubos) no laboratório de microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) e no laboratório de microbiologia do DCA/UFLA. Eles foram inseridos na coleção de culturas do laboratório da Epamig e receberam os seguintes números de referência: *Penicillium citrinum* 0086 e *Aspergillus brasiliensis* 0084.

Foram utilizadas as mesmas espécies fúngicas citadas anteriormente, isoladas, porém, de regiões não contaminadas por elementos-traço, para a avaliação da influência de uma prévia exposição do fungo ao poluente, na remoção desses elementos. Estas espécies foram obtidas das seguintes coleções de culturas: *Aspergillus brasiliensis* (IBT 26433), do Center for Microbial

Biotec da Universidade técnica de Denmark (Holanda) e *Penicillium citrinum* (INCQS 40011 – isolado de milho moído), da coleção de culturas do laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ RJ). Eles também foram inseridos na coleção de culturas do laboratório da Epamig

## **2.2 Coleta de amostra de água residuária do café (ARC): qualificação e quantificação de elementos-traço**

Foi coletada uma amostra (200 mL) da água proveniente da lavagem dos frutos do café (ARC), do Centro de Processamento do Café (CEP-café), localizado na UFLA, para a avaliação do pH e dos elementos-traço presentes. A água foi filtrada em membrana de 0,45 µm e encaminhada para o Departamento de Ciências do Solo, para análise em espectrofotômetro de absorção atômica. Foi feita a avaliação da presença dos seguintes elementos-traço descritos na literatura por Gonçalves (2006), como presentes nas ARC: cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn).

## **2.3 Teste de tolerância a elementos-traço**

Foi testada a tolerância dos fungos em estudo aos elementos-traço cobre, manganês e zinco, nas seguintes concentrações encontradas na ARC por espectrofotometria de absorção atômica 0,5 mg/L, 1 mg/L e 5 mg/L de cada elemento. Todo experimento foi feito em triplicata.

Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo ágar malte (AM) acrescido de sulfato de cobre, sulfato de manganês ou sulfato de zinco separadamente, em três pontos equidistantes. Os isolados foram também inoculados em placas contendo ágar malte, sem adição de qualquer elemento-

traço, utilizadas como controle. Todos os meios foram preparados com água Milli-Q (água deionizada purificada em um sistema Milli-Q, fornecido pela Millipore Corporation).

Os meios foram ajustados para pH 5, utilizando-se uma solução de (1 mol/L) de HCl. O pH do meio foi modificado para 5, pois, segundo Zafar, Aqil e Ahmad (2007), é neste pH que se obtém maior taxa de remoção de íons metálicos por biomassa microbiana. Além disso, segundo Gonçalves (2006), o pH encontrado nas ARC variam entre 4 e 5.

Os fungos foram incubados a 25°C, por sete dias e o diâmetro das colônias foi medido para serem avaliados quanto à tolerância aos elementos-traço testados. Os isolados que apresentaram crescimento igual ou superior ao controle foram considerados tolerantes - adaptação de metodologia proposta por Bergsten et al. (2005).

### **2.3.1 Análise estatística do teste de tolerância aos elementos-traço Cu, Mn e Zn**

Foi feita uma análise estatística dos resultados obtidos com o teste de tolerância. Para a realização das análises de variância (ANAVA), foi utilizado o software SISVAR. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial, com 2 fatores para cada elemento-traço testado: fungo (1 - *A. brasiliensis* de região contaminada; 2 - *P. citrinum* de região contaminada; 3 - *A. brasiliensis* de região não contaminada; 4 - *P. citrinum* de região não contaminada) e concentração (0,5; 1 e 5), e um total de 3 repetições para cada tratamento.

## 2.4 Teste de remoção de elementos-traço em escala laboratorial

Os fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus brasiliensis* isolados de ambientes contaminados e não contaminados foram testados quanto à sua capacidade de remoção de elementos-traço, utilizando uma adaptação da metodologia de Dritsa e Rigas (2006) e Swamy e Ramsay (1999).

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo ágar malte e incubados a 25°C, por 7 dias. Após o crescimento micelial, foram retirados cinco discos de 0,5 cm de diâmetro (meio de cultura e biomassa fúngica) e transferidos para erlenmeyers de 250 mL, contendo 130 mL de caldo extrato de malte 2% e de uma solução sintética dos elementos-traço predominantes na ARC Cu, Mn e Zn.

A solução sintética terá composta de água Mili-Q e de uma mistura dos elementos-traço predominantes nas ARC Cu, Mn e Zn, nas concentrações 0,5 mg/L, 1 mg/L e 5 mg/L. Para a realização deste teste foram utilizados os sais dos elementos em estudo, sulfato de cobre, sulfato de manganês e sulfato de zinco. Para atingir as concentrações desejadas de 0,5 mg/L, 1 mg/l e 5 mg/L, foram utilizados 75 µL, 150 µL, 750 µL da solução sintética, respectivamente.

Foram utilizados como padrões (controle) erlenmeyers contendo a solução sintética de sais e o meio de cultura sem o inóculo e o meio de cultura com o inóculo, sem a solução de metais. Um erlenmeyer controle, contendo o meio de cultura com os elementos-traço sem o fungo, é muito importante para a distinção do que foi realmente removido por ação do fungo e do que foi removido devido a reações físicas, como a adsorção à parede dos erlenmeyers, ou de reações químicas, como a precipitação destes elementos (ROANE; PEPPER, 2000).

Os erlenmeyers foram incubados em *shaker* (100 rpm), a 25°C, por 10 dias. A agitação de 100 rpm foi escolhida, pois, segundo Velmurugan et al. (2010), há uma maior probabilidade do encontro dos elementos-traço aos sítios

ativos disponíveis na parede celular fúngica, nessa rotação. Em menores velocidades, ocorre a diminuição de contato do elemento com a superfície sorvente, dificultando, assim, o processo de remoção (LIU, 2006).

Após cinco dias (tempo 1) e após dez dias (tempo 2), as amostras foram filtradas em membranas Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ , o teor dos elementos traços quantificados por espectrofotômetro de absorção atômica e o pH da solução avaliado. Após dez dias de incubação, os mesmos testes citados anteriormente foram realizados, a biomassa produzida foi filtrada e o peso seco avaliado. Após esse tempo amostral, uma alíquota da biomassa foi retirada com o auxílio de uma alça de platina, para análise em microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X.

#### **2.4.1 Análise estatística do teste de remoção de elementos-traço em escala laboratorial**

Foi feita a análise estatística dos dados obtidos referentes à remoção dos elementos-traço, utilizando o software SISVAR, pelos quatro fungos em estudo no teste em erlenmeyer. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial, para cada elemento-traço, com 3 fatores: tempo (5 e 10), fungos (*Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas) e concentração (0; 0,5 e 1, 5).

#### **2.4 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X**

O uso do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e do microscópio eletrônico de transmissão (MET) auxilia na elucidação dos mecanismos envolvidos na bioadsorção, bem como as características químicas e elementares do biorreagente. O MEV pode ser acoplado ao equipamento *Energy Dispersive*



*System* (EDS), o qual possibilita a determinação da composição qualitativa dos elementos-traço presentes nas amostras a partir da emissão de raios-X característicos (CALFA; TOREM, 2007).

Foram retiradas alíquotas da biomassa formadas nos testes em erlenmeyer da concentração 0 (controle) e da concentração de 5 mg/L de elementos-traço. Estas foram lavadas com água destilada e colocadas em suportes de alumínio (*stubs*) anteriormente cobertos com fita de carbono e observadas em microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 250 da marca FEI) acoplado a um sistema de microanálise de raios-X (EDS) que utiliza a emissão de raios-X para qualificar os elementos encontrados nas amostras. Foi utilizado o programa Genesis para a realização da microanálise nas seguintes condições: 30.000 kv., spot variando de 5 a 7 e alto vácuo.

Essa análise foi realizada no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para a confecção dos gráficos do espectro da microanálise de raios-X foi feita uma determinação da composição das amostras por área da amostra nas condições: distância de trabalho (WD) de 10 mm, aumento de 1000 X e voltagem de 30kv.

## **2.5 Teste de remoção de elementos-traço em biofiltros aeróbios**

### **2.5.1 Biofiltros**

Foram utilizados biofiltros de vidro (reatores de bancada em batelada), previamente desinfetados com uma solução de formaldeído a 10%, com 20 mm de espessura, prismáticos, com 65 cm de altura e 15 cm de lado e capacidade de 14,6 litros, previamente construídos por Silva (2008). Ao longo da altura dos reatores, foram instaladas quatro torneiras, para permitir a amostragem do efluente para as análises de quantificação dos elementos-traço (Figura 1).



Figura 1 Biofiltro de vidro utilizado no teste de remoção de elementos-traço

O biofiltro foi continuamente oxigenado com o auxílio de uma bomba de ar aquática BOYU modelo U-3600, com vazão de 4,0 L min<sup>-1</sup>.

### **2.5.2 Inoculação dos fungos isolados de região contaminada em material suporte e ativação dos biofiltros**

O meio suporte conduíte foi escolhido, pois, após a realização de testes com este material, por Silva (2008), concluiu-se que este tem baixo custo, pode ser reaproveitado várias vezes após sucessivos testes em biofiltros, além de não alterar o pH nem a turbidez da solução em que está inserido.

A metodologia foi a mesma desenvolvida por Silva (2008). Os isolados fúngicos de região contaminada por elementos-traço foram repicados em placas contendo o meio ágar malte (MA) e incubados, por 20 dias, a 25°C. Após esse período, foram adicionados 20 mL de água destilada estéril na superfície das mesmas, e feita uma raspagem da biomassa desenvolvida na superfície, para a desagregação dos esporos. Os esporos presentes na suspensão foram contados

em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para, aproximadamente,  $5 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ .

A suspensão de esporos (20 mL) foi inoculada em frascos contendo 250 mL de meio MA ainda fundido ( $40^\circ\text{C}$ ), homogeneizada e transferida para bandejas contendo o suporte para o crescimento fúngico. O suporte consiste de tubos corrugados (1,5 cm de diâmetro/2 cm comprimento – 8 L de conduíte por biofiltro), previamente esterilizados em autoclave, a  $121^\circ\text{C}$ , por 15 minutos. As bandejas foram encobertas por plástico filme (Figura 2) e incubadas, a  $25^\circ\text{C}$ , por vinte dias, para que os fungos crescessem e colonizassem a superfície e interior do conduíte (Figura 3).



Figura 2 Bandeja contendo o meio suporte conduíte inoculado com os esporos fúngicos em meio ágar extrato de malte ainda fundidos, encoberta por plástico filme e incubada, a  $25^\circ\text{C}$



Figura 3 Crescimento fúngico ao redor do suporte conduíte

Após esse período, o material suporte contendo a biomassa fúngica aderida foi transferido para o biofiltro e, em seguida, adicionados dez litros de uma solução sintética contendo água destilada, acrescida de sulfato de cobre, sulfato de manganês e sulfato de zinco, simultaneamente, a uma concentração de 5 mg/L de Cu, Mn e Zn. O pH da solução foi alterado para pH6,0, a fim de avaliar se neste pH ocorre maior adsorção de elementos-traço do que no pH 5 testado anteriormente em erlenmeyes. Este pH também é descrito por alguns autores (SAY et al., 2001) como ideal para a remoção de alguns dos elementos testados.

O biofiltro foi ativado, 20 mL de cada torneira foram retirados, inicialmente de 12 em 12 horas e, após dois dias, diariamente por um período de cinco dias (Figura 4). A concentração dos elementos-traço presentes nas amostras foi avaliada por espectrofotometria de absorção atômica.



Figura 4 Biofiltros contendo meio suporte conduíte inoculado com os fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus brasiliensis* isolados de regiões contaminadas com elementos-traço

### 2.5.3 Análise estatística dos resultados obtidos nos testes em biofiltros

Foi feita a análise estatística dos dados obtidos referentes à remoção dos elementos-traço por estes dois fungos utilizados utilizando o software SISVAR. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial, com 2 fatores: tempo (12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) e fungo em cada elemento-traço, com um total de 4 repetições por tratamento.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teste de tolerância aos elementos-traço Cu, Mn e Zn

Pelos dados das Tabelas 1, 2 3 e 4 observam-se os resultados dos testes de tolerância aos elementos Cu, Mn e Zn pelos fungos *Aspergillus Brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas.

Tabela 1 Média dos resultados de crescimento micelial do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região contaminada por elementos-traço, em diferentes concentrações dos elementos-traço Cu, Mn e Zn

Elemento	Concentração	Média diâmetro da colônia
0	0	5 cm
Cu	0,5 mg/L	4,9 cm
Cu	1 mg/L	5,25 cm
Cu	5 mg/L	4,8 cm
Mn	0,5 mg/L	5,3 cm
Mn	1 mg/L	5 cm
Mn	5 mg/L	5 cm
Zn	0,5 mg/L	5,25 cm
Zn	1 mg/L	4,9 cm
Zn	5 mg/L	5 cm

Tabela 2 Média dos resultados de crescimento micelial do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região não contaminada por elementos-traço, em diferentes concentrações dos elementos-traço Cu, Mn e Zn

Elemento	Concentração	Média diâmetro da colônia
0	0	6,20 cm
Cu	0,5 mg/L	6,00 cm
Cu	1,0 mg/L	6,20 cm
Cu	5,0 mg/L	6,10 cm
Mn	0,5 mg/L	6,30 cm
Mn	1,0 mg/L	6,00 cm
Mn	5,0 mg/L	6,40 cm
Zn	0,5 mg/L	6,20 cm
Zn	1,0 mg/L	6,20 cm
Zn	5,0 mg/L	6,20 cm

Tabela 3 Média dos resultados de crescimento micelial do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região contaminada por elementos-traço, em diferentes concentrações dos elementos-traço Cu, Mn e Zn

<b>Elemento</b>	<b>Concentração</b>	<b>Média diâmetro da colônia</b>
0	0	1,95 cm
Cu	0,5 mg/L	2,00 cm
Cu	1,0 mg/L	2,00 cm
Cu	5,0 mg/L	2,00 cm
Mn	0,5 mg/L	2,00 cm
Mn	1,0 mg/L	2,00 cm
Mn	5,0 mg/L	2,10 cm
Zn	0,5 mg/L	2,00 cm
Zn	1,0 mg/L	1,80 cm
Zn	5,0 mg/L	2,00 cm

Tabela 4 Média dos resultados de crescimento micelial do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região não contaminada por elementos-traço, em diferentes concentrações dos elementos-traço Cu, Mn e Zn

<b>Elemento</b>	<b>Concentração</b>	<b>Média diâmetro da colônia</b>
0	0	1,60 cm
Cu	0,5 mg/L	2,60 cm
Cu	1,0 mg/L	1,63 cm
Cu	5,0 mg/L	1,73 cm
Mn	0,5 mg/L	1,85 cm
Mn	1,0 mg/L	1,70 cm
Mn	5,0 mg/L	1,70 cm
Zn	0,5 mg/L	1,70 cm
Zn	1,0 mg/L	1,70 cm
Zn	5,0 mg/L	1,70 cm

Na Tabela 5 observa-se o resultado da análise de variância para a variável resposta tolerância ao elemento-traço cobre.

Tabela 5 Análise de variância para variável tolerância ao elemento-traço cobre pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Fungo	3	120,58	40,19	2564,75	0,0001
Concentração	2	0,44	0,22	14,20	0,0001
Fungo X Concentração	6	1,68	0,28	17,89	0,0001
Erro	24	0,37	0,01		
Total	35	123,09			

O teste F, a 5% de significância, foi significativo para a interação dupla fungo X concentração. Logo, se procedeu ao desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração (Tabela 6).

Tabela 6 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração do elemento cobre para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas

Concentração	0,5	1	5
<i>P. citrinum</i> região não contaminada	4,97 c	5,05 c	4,88 c
<i>P. citrinum</i> região contaminada	2,03 a	2,05 b	2,00 b
<i>A. brasiliensis</i> região não contaminada	6,03 d	6,25 d	6,10 d
<i>A. brasiliensis</i> região contaminada	2,60 b	1,63 a	1,57 a

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Pode-se observar, a partir da análise dos dados da Tabela 6, que os fungos isolados de região contaminada apresentaram maior tolerância a todas as concentrações de cobre em relação aos fungos de região não contaminada.



A análise de variância para a variável tolerância ao elemento-traço manganês está ilustrada na Tabela 7.

Tabela 7 Análise de variância para a variável tolerância ao elemento-traço manganês para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Fungo	3	139,34	46,45	6067,37	0,001
Concentração	2	0,31	0,16	20,83	0,001
Fungo X Concentração	6	0,18	0,03	4,10	0,01
Erro	24	0,18	0,01		
Total	35	140,03			

O teste F, a 5% de significância, foi significativo para a interação dupla fungo X concentração. Logo, se procedeu ao desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração (Tabela 8).

Tabela 8 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração do elemento Mn para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas

Concentração	0,5	1	5
<i>P. citrinum</i> região não contaminada	5,28 b	5,02 c	5,00 C
<i>P. citrinum</i> região contaminada	2,03 a	1,97 b	2,10 B
<i>A. brasiliensis</i> região não contaminada	6,5 c	6,10 d	6,43 D
<i>A. brasiliensis</i> região contaminada	1,86 a	1,67 a	1,73 A

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Pode-se observar, a partir da análise dos dados da Tabela 6, que os fungos isolados de região contaminada apresentaram maior tolerância a todas as concentrações de manganês em relação aos fungos de região não contaminada.

Na Tabela 9 observa-se a análise de variância para a variável tolerância ao elemento-traço zinco para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas.

Tabela 9 Análise de variância para a variável tolerância ao elemento-traço zinco para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Fungo	3	100,87	33,63	3,368	0,04
Concentração	2	21,37	10,69	1,071	0,36
Fungo X Concentração	6	61,63	10,27	1,029	0,43
Erro	24	239,61	9,98		
Total	35	423,50			

O teste F, a 5% de significância, não foi significativo para a interação dupla fungo X concentração. Apenas o fator fungo foi significativo pelo teste F, a 5% de significância. Logo, procedeu-se à análise individual do fator fungo (Tabela 10).

Tabela 10 Teste de médias para o fator fungo para o elemento Zn para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas

<i>P. citrinum</i> região não contaminada	5,03	a b
<i>P. citrinum</i> região contaminada	4,07	a b
<i>A. brasiliensis</i> região não contaminada	6,22	b
<i>A. brasiliensis</i> região contaminada	1,67	a

Letras seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Para o elemento zinco, pode-se observar, após a análise da Tabela 10, que, para o fungo *A. brasiliensis*, a linhagem isolada de região contaminada se mostrou mais tolerante ao Zn, em relação à região não contaminada. Para o fungo *P. citrinum*, não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhagens estudadas, na tolerância a este elemento.

Pode-se observar, a partir da análise dos resultados das Tabelas 1 a 10, que houve um maior crescimento do fungo *A. brasiliensis* em relação ao fungo *P. citrinum*. Esse fato não é indicativo de uma maior tolerância do fungo *A. brasiliensis*, pois esse fungo apresenta, naturalmente, um crescimento mais rápido que o fungo *P. citrinum*.

Também se observa, nas Tabelas 6, 8 e 10, que, para a maioria dos elementos testados, as linhagens fúngicas isoladas de ambientes contaminados apresentaram maior tolerância frente a todos os elementos-traço e concentrações avaliadas.

Esses resultados podem ser explicados, pois a tolerância a elementos-traço pode ser ocasionada por diferentes tipos de estratégias de tolerância ou mecanismos de resistência, exibidos pelas diferentes linhagens fúngicas quando em contato com tais elementos (ZAFAR et al., 2007).

De acordo com Pan et al. (2009), a tolerância entre linhagens da mesma espécie fúngica frente a elementos-traço se deve a distintos mecanismos de detoxicação desenvolvidos pelos mesmos em resposta às pressões ambientais. Essas linhagens promovem a diminuição da toxicidade dos elementos-traço, por meio da complexação destes elementos, precipitação ou outros mecanismos e, assim, conseguem tolerar e crescer em tais condições (SAXENA; BHATTACHARYYA; MATHUR, 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a hipótese esperada de que espécies isoladas de ambientes contaminados por elementos-

traço possuem maior tolerância a tais elementos do que espécies isoladas de regiões não contaminadas (ROUCH; LEE; MORBY, 1995).

Poucos trabalhos relatam a comparação da tolerância entre linhagens fúngicas pertencentes à mesma espécie, isoladas de ambientes contaminados e não contaminados. A maioria estuda a tolerância ou de linhagens obtidas de ambientes contaminados com elementos-traço ou de regiões não contaminadas e, em ambos casos, obtiveram ótimos resultados.

Nazareth e Marbaniang (2008), Valix e Lonn (2003) e De et al. (2009) testaram a tolerância de fungos filamentosos isolados de regiões não contaminadas frente aos elementos, Cu e Pb, Ni, Co, Fe, Mg e Mn e Na, Pb e Cu, respectivamente. O resultado destes trabalhos corrobora os obtidos no presente estudo, no qual mesmo as linhagens isoladas de regiões não contaminadas apresentaram tolerância e crescimento em todas as concentrações de elementos-traço testados.

Outros autores também estudaram a tolerância a elementos-traço de fungos isolados de regiões contaminadas com estes elementos. Ezzouhri et al. (2009) avaliaram a tolerância de microrganismos isolados de regiões contaminadas por elementos-traço em Tangier (Morocco) frente aos elementos Pb, Cr, Cu e Zn. Os isolados do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais tolerantes a todos os elementos-traço testados e exibiram maior crescimento na presença destes, em relação aos demais fungos e ao controle (meio sem adição de elementos-traço). Esse resultado é semelhante ao obtido no presente estudo, em que ambas as espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* apresentaram grande tolerância aos elementos-traço avaliados.

Iram et al. (2009) e Zafar et al. (2007) estudaram a tolerância de fungos isolados de regiões contaminadas aos elementos Zn, Pb, Cd, Ni e Co e Cu, Cd, Pb, As, e Zn, respectivamente. No primeiro trabalho, os fungos do gênero *Aspergillus* foram os que apresentaram maior tolerância a todos os elementos-

traço, enquanto, no segundo, fungos do gênero *Penicillium* se mostraram mais tolerantes. No presente estudo, ambas as espécies estudadas apresentaram a mesma tolerância aos elementos testados.

### 3.1 Avaliação dos elementos-traço presentes na ARC

Na Tabela 11 são apresentados os resultados das concentrações dos elementos-traço Cu, Mn e Zn presentes na ARC obtida do CEP-Café, na UFLA.

Tabela 11 Resultado das concentrações dos metais Cu, Mn e Zn presentes na água residuária do café obtida do CEP-Café (UFLA)

<b>Elementos traço presente na ARC</b>	<b>Concentração obtida por espectrofotometria de absorção atômica</b>	<b>COPAM</b>	<b>CONAMA</b>
Cobre	<1 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L
Manganês	<0,5 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Zinco	0,36 mg/L	5,0 mg/L	5,0 mg/L

O pH obtido na ARC foi de 4,5

As concentrações obtidas na amostra de água proveniente da lavagem do café do CEPE-Café estão abaixo da concentração permitida pelo COPAM e CONAMA. Entretanto, nos estudos realizados por Vasco (1999) e Gonçalves (2006), referentes à presença de elementos traço na ARC, as concentrações destes elementos-traço estavam muito acima do permitido por estes órgãos fiscalizadores. Foram encontradas as seguintes concentrações por estes autores: 5 mg/l Cu, 4 mg/L Zn (Vasco, 1999) 1,27 mg/L Cu, 1,33 mg/L Mn e 0,66 mg/L de Zn (Gonçalves, 2006).

### 3.2 Teste de remoção dos elementos-traço em escala laboratorial

Na Tabela 12 são apresentados os resultados do teste de análise de variância para a variável resposta remoção de Cu pelos fungos em estudo, após 5 e 10 dias de incubação.

Tabela 12 Análise de variância para variável resposta remoção de Cu pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinus* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas por elementos-traço

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Tempo	1	0,004	0,004	0,187	0,6658
Fungo	7	25,248	3,607	173,497	0,0001
Concentração	3	357,778	119,259	5736,632	0,0001
Tempo X Fungo	7	0,605	0,086	4,159	0,0004
Tempo X Concentração	3	0,206	0,069	3,301	0,0225
Fungo X Concentração	21	41,665	1,984	95,438	0,0001
Tempo X Fungo X Concentração	21	1,208	0,058	2,768	0,0002
Erro	128	2,661	0,021		
Total	191	429,375			

O teste F, a 5% de significância, foi significativo para a interação tripla tempo X fungo X concentração. Logo, se procedeu ao desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração e tempo (Tabelas 13 e 14) para o elemento-traço Cu.

Tabela 13 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração de cobre e após 5 dias de incubação

Tempo	5			
	0	0,5	1	5
Concentração				
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada	0,187 a	0,489 b c	0,846 b c	4,057 d
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada - Controle	0,090 a	0,668 c	1,224 d	4,621 e
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada	0,150 a	0,381 a b c	0,524 a b	1,337 a
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada - Controle	0,029 a	0,493 b c	0,947 c d	4,538 e
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada	0,056 a	0,202 a b	0,332 a	2,401 b
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada - Controle	0,131 a	0,437 a b c	0,797 b c	4,129 d
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada	0,004 a	0,079 a	0,402 a	3,066 c
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada - Controle	0,000 a	0,438 a b c	0,923 c d	4,388 d e

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Tabela 14 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração de cobre e após 10 dias de incubação

Tempo	10			
	0	0,5	1	5
Concentração				
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada	0,048 a	0,405 a b	1,005 c d	4,237 d e
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada - Controle	0,021 a	0,621 b	0,982 c d	4,505 e f
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada	0,068 a	0,410 a b	0,860 b c d	1,410 a
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada - Controle	0,007 a	0,471 a b	0,989 c d	4,386 e
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada	0,007 a	0,156 a	0,701 a b c	2,117 b
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada - Controle	0,101 a	0,505 a b	0,591 a b	3,888 d
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada	0,088 a	0,321 a b	0,486 a	2,497 c
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada - Controle	0,176 a	0,629 b	1,129 d	4,837 f

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Avaliando-se os dados das Tabelas 13 e 14, pode-se observar que, para o elemento cobre, de maneira geral, após 5 e 10 dias de incubação, os fungos isolados de região não contaminada, principalmente o fungo *Penicillium citrinum*, foram os que apresentaram os melhores resultados na remoção deste elemento.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados do teste de análise de variância para variável resposta remoção de Mn pelos fungos em estudo, após 5 e 10 dias de incubação.

Tabela 15 Análise de variância para variável resposta remoção de Mn pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas por elementos-traço

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Tempo	1	0,05	0,05	4,34	0,0393
Fungo	7	3,97	0,57	51,63	0,0001
Concentração	3	516,95	172,32	15673,50	0,0001
Tempo X Fungo	7	0,31	0,04	4,07	0,0005
Tempo X Concentração	3	0,02	0,01	0,68	0,5644
Fungo X Concentração	21	5,08	0,24	22,01	0,0001
Tempo X Fungo X Concentração	21	1,63	0,08	7,05	0,0001
Erro	128	1,41	0,01		
Total	191	529,43			

O teste F, a 5% de significância, foi significativo para a interação tripla Tempo X Fungo X Concentração. Logo, se procedeu ao desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração e tempo (Tabela 16 e 17) para o elemento-traço Mn.

Tabela 16 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração de manganês e após 5 dias de incubação

Tempo	5			
	0	0,5	1	5
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada	0,000 a	0,356 a	0,737 b	3,884 b c
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada - Controle	0,039 a	0,453 a	0,844 b c	4,362 d
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada	0,006 a	0,344 a	0,335 a	4,403 d
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada - Controle	0,003 a	0,472 a	1,175 d	4,577 d
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada	0,033 a	0,288 a	0,663 b	3,511 a
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada - Controle	0,101 a	0,366 a	0,707 b	3,756 a b
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada	0,075 a	0,420 a	0,747 b	4,034 c
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada - Controle	0,059 a	0,521 a	1,067 c d	4,555 d

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância



Tabela 17 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração de manganês e após 10 dias de incubação

Tempo	10			
	0	0,5	1	5
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada	0,016 a	0,374 a	0,728 a b	4,137 b
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada - Controle	0,056 a	0,435 a	0,891 a b c	4,444 c d
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada	0,005 a	0,367 a	0,749 a b	4,233 b c
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada - Controle	0,030 a	0,548 a	1,047 c	4,446 c d
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada	0,030 a	0,293 a	0,777 a b	2,961 a
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada - Controle	0,046 a	0,329 a	0,681 a	4,555 d
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada	0,115 a	0,403 a	0,882 a b c	4,213 b c
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada - Controle	0,103 a	0,551 a	0,983 b c	4,474 c d

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Após a avaliação dos dados das Tabelas 15 e 16, pode-se observar que, para o elemento manganês, de maneira geral, após 5 e 10 dias de incubação, as espécies fúngicas responderam diferentemente à remoção deste elemento nas concentrações testadas. Entretanto, os fungos isolados de região contaminada foram os que apresentaram os melhores resultados na remoção deste elemento.

Na Tabela 18 são apresentados os resultados do teste de análise de variância para variável resposta remoção de Zn pelos fungos em estudo, após 5 e 10 dias de incubação.

Tabela 18 Análise de variância para variável resposta remoção de Zn pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinus* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas por elementos-traço

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Tempo	1	0,03	0,03	1,83	0,1784
Fungo	7	4,95	0,71	40,17	0,0001
Concentração	3	513,10	171,03	9712,93	0,0001
Tempo X Fungo	7	0,24	0,03	1,97	0,0636
Tempo X Concentração	3	0,12	0,04	2,26	0,0848
Fungo X Concentração	21	11,22	0,53	30,34	0,0001
Tempo X Fungo X Concentração	21	0,49	0,02	1,33	0,1662
Erro	128	2,25	0,02		
Total	191	532,41			

O teste F, a 5% de significância, não foi significativo para a interação tripla tempo X fungo X concentração. Logo, iniciou-se uma análise de cada uma das três interações duplas (Tabela 19). Apenas a interação dupla fungo X tempo foi significativa, pelo teste F, a 5% de significância. Como a interação dupla não abordou o fator tempo, foi necessário proceder a uma análise individual desse fator. Todavia, observando-se a tabela de análise de variância para o fator tempo, constata-se que o mesmo não foi significativo.

Tabela 19 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de concentração de Zn pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas e não contaminadas por elementos-traço

Concentração	0	0,5	1	5
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada	0,0002 a	0,1917 A	0,7317 a	4,2785 b c
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região contaminada - Controle	0,0018 a	0,6168 C	1,0292 b c	4,5680 d
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada	0,0240 a	0,2490 a b	0,7112 a	4,0630 b
<i>Aspergillus brasiliensis</i> região não contaminada - Controle	0,0442 a	0,6278 C	1,0573 c	4,8602 e
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada	0,1018 a	0,4693 b c	1,0197 b c	3,3358 a
<i>Penicillium citrinum</i> região contaminada - Controle	0,2150 a	0,6188 C	0,9315 a b c	3,3917 a
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada	0,0313 a	0,4198 a b c	0,8118 a b	4,4680 c d
<i>Penicillium citrinum</i> região não contaminada - Controle	0,1542 a	0,6217 C	1,1033 c	4,6460 d e

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Após a avaliação dos dados da Tabela 19, pode-se observar que, para o elemento zinco, de maneira geral, após 5 e 10 dias de incubação, o fungo *Aspergillus brasiliensis* (independente da origem) foi o que apresentou os melhores resultados na remoção deste elemento.

Pode-se observar, a partir da observação dos dados das Tabelas 13, 14, 16, 17 e 19, que as linhagens isoladas de regiões contaminadas e não contaminadas dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* responderam diferentemente com relação à sua capacidade de remoção dos elementos-traço Cu, Mn e Zn. Estes resultados indicam que os elementos presentes na parede celular dos fungos estudados podem apresentar maior afinidade com um ou outro elemento-traço específico, fazendo com que os outros elementos percam a competição pelos sítios de ligação presentes na parede celular ou por transportadores existentes na membrana celular (LI, 2005).

Assim, pode-se inferir que diferentes espécies fúngicas são capazes de adsorver elementos-traço de soluções, por diferentes mecanismos de remoção e, portanto, os removem em diferentes quantidades, fato observado, no presente trabalho, até por linhagens pertencentes à mesma espécie fúngica. Esses resultados corroboram os obtidos por Adriano (2001) que concluiu que espécies de microrganismos dentro de um mesmo gênero, ou até mesmo linhagens dentro de uma mesma espécie, podem diferir nas suas sensibilidades aos elementos-traço.

A remoção desses elementos-traço pelos fungos em estudo pode ter ocorrido devido a mecanismos de bio sorção ou de bioacumulação. O fenômeno de bio sorção ocorre como consequência de fenômenos físicos (independentes do metabolismo celular) como a sorção de tais elementos a grupos funcionais presentes na parede celular fúngica como grupamentos amino, carboxyl, thiol, sulfidril e fosfatos (PAN et al., 2009; SRIVASTAVA, 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram aqueles obtidos por Yetis (2000), que avaliaram o processo de remoção e concluíram que o mesmo ocorre em duas estratégias: primeiramente, uma rápida adsorção do elemento-traço à superfície celular, seguida de uma lenta difusão destes elementos para o interior celular. Após a saturação dos sítios de ligação e a quantidade de elementos absorvidos torna-se tóxica à célula, o microrganismo passa a desorver e liberar os elementos no meio.

Segundo Pan et al. (2009), quanto maior a variedade de elementos-traço presentes na solução, menor será a concentração de elementos-traço adsorvidos pela biomassa fúngica, devido à competição desses elementos por sítios ativos. Vivas, Barea e Azcon (2005), estudando a adsorção de Cd e Zn por fungos, concluíram que esses elementos apresentam efeitos antagônicos quando juntos em solução, na sorção à biomassa fúngica. Entretanto, este fenômeno não foi observado no presente estudo. Além disso, o estudo da remoção destes elementos separadamente não seria viável em nosso caso, pois não é a realidade encontrada nas ARC, onde está presente uma ampla variedade de elementos-traço.

Kapoor e Viraraghavan (1997) avaliaram o papel dos grupos funcionais na adsorção de Cu, Pb e Cd, pelo fungo *A. niger*. Para isso, a biomassa foi submetida a tratamentos químicos que modificaram os grupos funcionais, carboxil, amino e fosfato, o que foi confirmado por meio de espectrofotometria com infravermelho. Foi encontrado que a esterificação dos grupos carboxil e metilação de grupos amino presentes na parede celular de *A. niger* diminuiu significativamente a biosorção dos elementos-traço pelo fungo avaliado. Esses resultados sugerem que os grupos carboxyl e amino são importantes para a ligação do elemento à biomassa desta espécie fúngica. Grupos fosfato e a fração lipídica da biomassa não desempenharam papel importante na remoção dos mesmos. A biossorção de Ca e Cu, especificamente, se mostrou menor quando

os grupamentos amino foram modificados. Uma ligeira diminuição da remoção de todos os elementos foi observada quando os lipídios foram extraídos da biomassa. Assim, provavelmente, a interação entre o fungo *Aspergillus brasiliensis* e os elementos-traço em estudo se deve aos grupamentos carboxil e amino presentes na parede celular fúngica.

Akthar et al. (1996) também observaram que o grupamento carboxil presente na membrana de fungos do gênero *Aspergillus* tem papel significativo para a remoção de cobre presente em efluentes.

Nas Tabelas 20 a 27 são apresentados os resultados da variação de pH após 5 e 10 dias de incubação e o peso seco (após 10 dias de incubação) produzido pelas espécies fungicas em estudo *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*.

Tabela 20 pH obtido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* (EPAMIG - 0084) isolado de região contaminada, após 5 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C), em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

<b>Elemento</b>	<b>pH sem inóculo</b>	<b>pH com inóculo</b>
Cu 0 mg/L	5,100	3,500
Cu 0,5 mg/L	5,160	3,600
Cu 1 mg/L	5,100	3,500
Cu 5 mg/L	5,000	3,410
Mn 0 mg/L	5,100	2,300
Mn 0,5 mg/L	5,100	3,600
Mn 1 mg/L	5,100	3,500
Mn 5 mg/L	5,000	3,400
Zn 0 mg/L	5,100	3,500
Zn 0,5 mg/L	5,160	3,600
Zn 1 mg/L	5,160	3,500
Zn 5 mg/L	5,000	3,400

Com relação ao pH do meio, pode-se observar, a partir dos dados da Tabela 20, uma redução, em média, de um ponto e meio (de 5 para 3,5).

Tabela 21 pH e peso seco obtido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* (EPAMIG - 0084) isolado de região contaminada, após 10 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C) em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

Elemento	pH sem inóculo	pH com inóculo	Peso seco (g)
Cu 0 mg/L	4,827	2,283	0,667
Cu 0,5 mg/L	4,767	2,233	0,637
Cu 1 mg/L	4,700	2,233	0,690
Cu 5 mg/L	4,667	2,367	0,687
Mn 0 mg/L	4,827	2,283	0,667
Mn 0,5 mg/L	4,767	2,233	0,637
Mn 1 mg/L	4,700	2,233	0,690
Mn 5 mg/L	4,667	2,367	0,687
Zn 0 mg/L	4,827	2,283	0,667
Zn 0,5 mg/L	4,767	2,233	0,637
Zn 1 mg/L	4,700	2,233	0,690
Zn 5 mg/L	4,667	2,367	0,687

Tabela 22 pH obtido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* (IBT 26433) isolado de região não contaminada, após 5 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C) em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

<b>Elemento</b>	<b>pH sem inóculo</b>	<b>pH com inóculo</b>
Cu 0 mg/L	4,810	2,867
Cu0,5 mg/L	4,800	2,683
Cu 1 mg/L	4,783	2,707
Cu 5 mg/L	4,700	2,967
Mn 0 mg/L	4,810	2,867
Mn0,5 mg/L	4,800	2,683
Mn 1 mg/L	4,783	2,707
Mn 5 mg/L	4,700	2,967
Zn 0 mg/L	4,810	2,867
Zn 0,5 mg/L	4,800	2,683
Zn 1 mg/L	4,783	2,707
Zn 5 mg/L	4,967	2,687

Tabela 23 pH e peso seco obtido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* (IBT 26433) isolado de região não contaminada, após 10 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C), em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

<b>Elemento</b>	<b>pH sem inoculo</b>	<b>pH com inóculo</b>	<b>Peso seco (g)</b>
Cu 0 mg/L	4,880	1,863	0,607
Cu0,5mg/L	4,757	1,870	0,527
Cu 1mg/L	4,740	1,913	0,707
Cu 5mg/L	4,683	1,943	0,580
Mn 0 mg/L	4,880	1,863	0,607
Mn0,5mg/L	4,757	1,870	0,527
Mn 1mg/L	4,740	1,913	0,707
Mn 5mg/L	4,683	1,943	0,580
Zn 0mg/L	4,880	1,863	0,607
Zn 0,5mg/L	4,757	1,870	0,527
Zn 1mg/L	4,740	1,913	0,707
Zn 5mg/L	4,683	1,943	0,580



Tabela 24 pH obtido pelo fungo *Penicillium citrinum* isolado de região contaminada (EPAMIG 0086), após 5 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C) em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

Elemento	pH sem inóculo	pH com inóculo
Cu 0 mg/L	5,000	4,600
Cu 0,5 mg/L	5,000	4,700
Cu 1 mg/L	4,800	4,700
Cu 5 mg/L	4,700	4,533
Mn 0 mg/L	5,000	4,600
Mn 0,5 mg/L	5,000	4,800
Mn 1 mg/L	4,800	4,700
Mn 5 mg/L	4,700	4,533
Zn 0 mg/L	5,000	4,600
Zn 0,5 mg/L	5,000	4,700
Zn 1 mg/L	4,800	4,700
Zn 5 mg/L	4,700	4,533

Tabela 25 pH e peso seco obtido pelo fungo *Penicillium citrinum* (EPAMIG 0086) isolado de região contaminada, após 10 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C) em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

Elemento	pH sem inoculo	pH com inóculo	Peso seco (g)
Cu 0 mg/L	5,090	4,637	0,537
Cu 0,5 mg/L	5,023	4,727	0,510
Cu 1 mg/L	4,877	4,240	0,517
Cu 5 mg/L	4,817	4,590	0,540
Mn 0 mg/L	5,090	4,637	0,537
Mn 0,5 mg/L	5,023	4,727	0,510
Mn 1 mg/L	4,877	4,240	0,517
Mn 5 mg/L	4,817	4,590	0,540
Zn 0 mg/L	5,090	4,637	0,537
Zn 0,5 mg/L	5,023	4,727	0,517
Zn 1 mg/L	4,877	4,240	0,540
Zn 5 mg/L	4,817	4,590	0,540

Tabela 26 pH obtido pelo fungo *Penicillium citrinum* isolado de região não contaminada (INCQS 40011) após 5 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C), em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

Elemento	pH 5 dias Padrão	pH 5 dias Fungo
Cu 0 mg/L	4,6	5,0
Cu 0,5 mg/L	4,7	5,0
Cu 1 mg/L	4,7	4,8
Cu 5 mg/L	4,5	4,7
Mn 0 mg/L	4,6	5,0
Mn 0,5 mg/L	4,7	5,0
Mn 1 mg/L	4,7	4,8
Mn 5 mg/L	4,5	4,7
Zn 0 mg/L	4,6	5,0
Zn 0,5 mg/L	4,7	5,0
Zn 1 mg/L	4,7	4,8
Zn 5 mg/L	4,5	4,7

Tabela 27 pH e peso seco obtido pelo fungo *Penicillium citrinum* isolado de região não contaminada (INCQS 40011), após 10 dias de incubação em *shaker* (100 rpm – 25°C), em contato com uma solução de diferentes concentrações de Cu, Mn e Zn

Elemento	pH 10 dias Padrão	pH 10 dias Fungo	Peso seco (g)
Cu 0 mg/L	4,6	5,1	0,49
Cu 0,5 mg/L	4,8	5,0	0,50
Cu 1 mg/L	4,2	4,8	0,62
Cu 5 mg/L	4,6	4,7	0,49
Mn 0 mg/L	4,6	5,1	0,46
Mn 0,5 mg/L	4,8	5,0	0,58
Mn 1 mg/L	4,2	4,8	0,62
Mn 5 mg/L	4,6	4,7	0,49
Zn 0 mg/L	4,6	5,1	0,44
Zn 0,5 mg/L	4,8	5,0	0,52
Zn 1 mg/L	4,2	4,8	0,53
Zn 5 mg/L	4,6	4,7	0,57

Com relação ao pH do meio, pode-se observar, nas Tabelas 20 a 27, que, para a espécie fúngica *Aspergillus brasiliensis* (20-23), houve, em geral, uma redução de 3 pontos no pH da solução (5 para 2). Para a espécie *Penicillium citrinum* (Tabelas 24-27), não foi observada alteração significativa no pH da solução em que ele estava inserido.

Por meio da avaliação do peso seco, pode-se observar que a biomassa produzida no controle foi semelhante à obtida em todas as concentrações dos elementos testados. Esses resultados demonstram que as concentrações dos elementos-traço não são tóxicas ao microrganismo avaliado, pois não inibiram seu crescimento.

Com relação à influência do pH escolhido neste estudo, Faryal, Lodhi e Hameed (2006) observaram que o pH ótimo para que ocorra a remoção de Zn do meio por *Aspergillus fumigatus* foi o 5, o mesmo utilizado no presente estudo, fato que deve ter influenciado a grande remoção deste elemento pela maioria dos fungos avaliados.

Akar et al. (2009) avaliaram a adsorção de Cu por *Tramaetes versicolor* em diferentes pHs e observaram que a máxima remoção deste elemento da solução ocorreu em pH 5 e que, abaixo deste pH, a adsorção foi diminuída, chegando a zero em pH 1. O mesmo fenômeno foi evidenciado no presente estudo, em que o fungo *Aspergillus brasiliensis* alterou o pH da solução em que estava presente para 3, removendo com menos eficiência o elemento Cu que o fungo *Penicillium citrinum*, que manteve o pH da solução próximo de 5.

A pequena adsorção dos elementos-traço à biomassa fúngica em pH baixo está associada à liberação de íons ( $H_3O^+$ ) na parede celular, que promove uma repulsão eletrostática entre essas cargas positivas e as dos elementos-traço. O aumento da remoção observado em pH 5 pode ser explicado pela liberação de sítios de ligação na parede celular fúngica carregados negativamente, como resultado da desproteínação, facilitando a ligação (AKAR et al., 2009)

Pan et al. (2009) estudaram a adsorção dos elementos-traço  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  por fungos do gênero *Penicillium*, isolados de ambiente contaminado por tais elementos. Após a inoculação em meio líquido (batata dextrose) contendo estes elementos, observou-se maior adsorção de Zn do que dos demais elementos testados. Neste trabalho, também se obteve redução significativa deste elemento por todas as linhagens estudadas.

Purchase et al. (2009) estudaram a remoção de Zn por *Beauveria bassiana* e *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de ambientes contaminados por elementos-traço. Estes autores obtiveram uma remoção de 10% deste elemento no primeiro dia de incubação, aumentando para 64% no 7º dia de incubação, seguido de uma diminuição no 21º dia de incubação para 29% de remoção, para o fungo *B. bassiana*. O fungo *R. mucilaginosa* apresentou uma remoção inicial de Zn de apenas 2%, mas, após 21 dias, de 53%. Em nosso estudo, as linhagens estudadas também se comportaram de forma diferente ao longo do tempo de incubação. Algumas linhagens removeram com mais eficiência determinados elementos aos cinco dias de incubação, enquanto outras, aos dez dias de incubação.

Outros autores, estudando a biossorção de Cu por *A. niger*, também observaram ótimos resultados. Price, Classene e Payne (2001) obtiveram remoção de 0,52 mg de Cu por grama de biomassa seca deste fungo. Townsley, Ross e Atkins (1986) e Mullen et al. (1992) observaram 1,8 mg e 1,7 mg de remoção por grama de biomassa, respectivamente.

Ren et al. (2009) estudaram a remoção de Cu, Cd, Pb e Zn por *A. niger* isolado de ambientes contaminados com tais elementos. Após um dia de incubação, encontraram remoção de 73% de Cu, 70,8% de Cd, 15,6% de Pb e 14,2% de Zn. Após dois dias de incubação a 84,3% de Cu, 84,4% de Cd, 25% de Pb e 14,4% de Zn. Entretanto, neste estudo, as linhagens de *Aspergillus brasiliensis* estudadas apresentaram maior eficiência na remoção do elemento Zn do que de Cu.

Menor afinidade ao elemento Cu por fungos do gênero *Aspergillus* também foi observada por Akar e Tunali (2006) e Tastan, Ertugrul e Dönmez (2009). Os primeiros estudaram a remoção de  $Pb^{+2}$  e  $Cu^{+2}$  presentes em efluentes, por *Aspergillus flavus*. Obtiveram remoção de  $Pb^{+2}$  de  $6,41 \pm 0,49$  mg/g de biomassa e de  $Cu^{+2}$ ,  $3,04 \pm 0,46$ /g de biomassa. Os últimos estudaram a remoção de  $Cr^{+6}$ ,  $Ni^{+2}$  e  $Cu^{+2}$  por *Aspergillus versicolor* e obtiveram remoção de 99,89% de  $Cr^{+6}$ , 30,05%  $Ni^{+2}$  e 29,06% de  $Cu^{+2}$ , após sete dias de incubação.

Em outros estudos relativos à remoção de elementos-traço de efluentes por espécies do gênero *Penicillium*, *P. digitatum* apresentou remoção de 9,7 mg de Zn/g de biomassa em pH 5,5 (GALUN et al., 1987); *P. simplissimum* de 65,6 mg de Zn/g de biomassa, em pH 5,0 (FAN et al., 2008); *P. chrysogenum*, 6,5 mg de Zn por grama de biomassa em pH 4,5 (NIU et al., 1993) e de Cu, 11,7 mg/g em pH 6 (SKOWRONSKI; PIRSZEL; PAWLIK-SKWRONSKA, 2001) e *P. cyclopium*, 50 mg de Cu por grama de biomassa em pH 4,5 (IANIS; TSEKOVA; VASILEVA, 2006). No presente estudo, as linhagens de *P. citrinum* avaliadas também removeram com maior eficiência o elemento Cu que o elemento Zn, indicando que, provavelmente, os elementos presentes na parede celular desta espécie fúngica tenham maior afinidade com o elemento-traço Cu.

### 3.3 Teste de remoção de elementos-traço em biofiltros aeróbios

Nas Tabelas 28 a 31 são apresentados os resultados do pH e concentração residual de elementos-traço após cultivo com os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas, em biofiltros aeróbios, após sete dias de ativação.

Tabela 28 Média do pH em biofiltros utilizando conduítes como meio suporte para o crescimento de *Aspergillus brasiliensis* (EPAMIG – 0084) e *Penicillium citrinum* (EPAMIG – 0086) isolados de região contaminada por estes elementos

Ph	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	6	5,2	5,0	5,9	6,6	6,9	7,1	7,0
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	6	3,0	3,0	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2

Biofiltro A: Fungo *Penicillium citrinum* inoculado em conduítes e solução sintética contendo 5 mg/L dos elementos-traço Cu, Mn e Zn, em pH inicial 6

Biofiltro B: Fungo *Aspergillus brasiliensis* inoculado em conduítes, com solução sintética contendo 5 mg/L dos elementos-traço Cu, Mn e Zn, e pH inicial 6

Pode-se observar, após a análise dos dados da Tabela 28, que o pH do biofiltro inoculado com *Penicillium citrinum* (biofiltro A) apresentou uma queda de um ponto (5) em relação ao inicial (6), até 24 horas de ativação, seguido de um aumento para pH 7 com 120 horas de ativação.

Com relação ao biofiltro B (inoculado com *Aspergillus brasiliensis*), foi observada uma queda de três pontos em relação ao inicial (pH 6 para pH 3), após 6 horas de ativação e manutenção deste valor de pH após 120 horas de ativação.

A diminuição do pH observada no experimento realizado com o fungo *A. brasiliensis* deve ter ocorrido devido à produção de ácidos por esse fungo, pois, segundo Varga et al. (2007), é muito próxima à espécie *Aspergillus niger*, que é produtora de ácido glucônico e cítrico.

Mulligan, Galvez-Cloutier e Renaud (1999) observaram que, após dez dias de incubação com o fungo *A. Níger*, o pH reduziu a 3, provavelmente pela produção de ácido que auxilia na remoção de elementos-traço do ambiente.

Os resultados do trabalho realizado por Sayer e Gadd (2001) também corroboram os obtidos no presente estudo. De acordo com estes autores, a produção de ácido glucônico, cítrico e oxálico, por *Aspergillus niger*, auxilia na remoção de elementos-traço, como o cobre e o zinco, de soluções, devido à sua complexação com estes elementos, seguido de uma ligação à parede celular

fúngica. Provavelmente, esse fenômeno deve ocorrer com a espécie *Aspergillus brasiliensis*, por se tratar de uma espécie muito próxima à citada anteriormente.

Tabela 29 Média da concentração do elemento-traço Cu em biofiltro utilizando tubo corrugado como meio suporte para *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos

Cu	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	5,000	4,564	4,343	3,462	3,093	6,130	6,251	4,564
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	5,000	4,626	4,383	3,468	3,102	6,170	6,237	4,626

Tabela 30 Média da concentração do elemento-traço Mn em biofiltro utilizando tubo corrugado como meio suporte para *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos

Mn	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	5,000	2,686	2,526	2,466	2,354	2,360	2,278	2,686
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	5,000	3,106	3,116	3,143	3,112	3,153	3,057	3,106

Tabela 31 Média da concentração do elemento-traço Zn em biofiltro utilizando tubo corrugado como meio suporte para *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos

Zn	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	5,000	3,315	2,749	2,436	2,388	2,250	2,428	3,315
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	5,000	3,585	3,528	3,738	3,680	3,178	3,478	3,585

Foi feita a análise de variância para variável resposta remoção de cobre por *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada (Tabela 32).

Tabela 32 Análise de variância para variável resposta remoção de cobre por *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Fungo	1	36,81	36,81	1666,12	0,0001
Tempo	5	10,43	2,09	94,42	0,0001
Fungo X Tempo	5	8,12	1,62	73,52	0,0001
Erro	36	0,80	0,02		
Total	47	56,16			

O teste F, a 5% de significância, foi significativo para a interação dupla fungo x tempo. Logo, se procedeu ao desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de tempo (Tabela 31).

Tabela 33 Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de tempo (12 a 120 horas) para o elemento cobre

Tempo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<i>P. citrinum</i>	5,58 a	5,19 a	4,69 a	4,42 a	3,47 a	3,11 a
<i>A. brasiliensis</i>	6,21 b	6,22 b	6,20 b	6,16 b	6,12 b	6,06 b

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Por meio da análise da Tabela 33, observa-se que o fungo *P. citrinum* foi o que apresentou os melhores resultados na remoção do elemento Cu, em todos os tempos avaliados.

Fez-se a análise de variância para a variável resposta remoção de manganês por ambos os fungos estudados (Tabela 34).



Tabela 34 Análise de variância para variável resposta remoção de manganês por *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Fungo	1	3,96	3,96	283,48	0,0001
Tempo	5	0,51	0,10	7,25	0,0001
Fungo X Tempo	5	0,09	0,02	1,36	0,26
Erro	36	0,50	0,01		
Total	47	5,06			

O teste F, a 5% de significância, não foi significativo para a interação dupla Fungo X Tempo. Logo, procedeu-se à análise individual do fator tempo e do fator fungo (Tabela 35). Ambos foram significativos, pelo teste F, a 5% de significância.

Tabela 35 Teste de médias para o fator fungo, para o elemento manganês

<i>P. citrinum</i>	1,87	a
<i>A. brasiliensis</i>	2,45	b

Letras seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Pela análise da Tabela 35, constata-se que o fungo *P. citrinum* apresentou os melhores resultados na remoção do elemento-traço manganês.

Foi feita a análise de variância para a variável resposta remoção de zinco por ambos os fungos estudados (Tabela 36).

Tabela 36 Análise de variância para variável resposta remoção de zinco por *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Fungo	1	10,53	10,53	60,98	0,0001
Tempo	5	2,33	0,47	2,70	0,04
Fungo X Tempo	5	1,48	0,30	1,72	0,16
Erro	36	6,21	0,17		
Total	47	20,55			

O teste F, a 5% de significância, não foi significativo para a interação dupla fungo X tempo. Logo, procedeu-se à análise individual do fator tempo e do fator fungo (Tabela 37). Ambos foram significativos, pelo teste F, a 5% de significância.

Tabela 37 Teste de médias para o fator fungo, para o elemento zinco

<i>P. citrinum</i>	2,59	a
<i>A. brasiliensis</i>	3,53	b

Letras seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Pela análise da Tabela 37, observa-se que o fungo *P. citrinum* apresentou os melhores resultados na remoção do elemento-traço zinco.

Pode-se concluir que, durante todo o experimento, o fungo *Penicillium citrinum* removeu com maior eficiência a maioria dos elementos-traço estudados, quando comparado ao fungo *Aspergillus brasiliensis*. Provavelmente, os elementos-traço estudados são sensíveis à variação de pH como a que ocorreu no biofiltro inoculado com o fungo *Aspergillus brasiliensis*. O mesmo fenômeno foi observado por Leitão (2009), na captação de  $Zn^{+2}$  por *P. digitatum*. Neste estudo, a remoção de Zn mostrou-se altamente sensível a variações no pH, sendo inibida em pH abaixo de 3.

Em outro estudo, avaliou-se a bioadsorção de  $\text{Cu}^{+2}$  por *Penicillium cyclopium*. A remoção foi considerada fortemente dependente do pH, da quantidade de biomassa e da concentração de íons Cu nas soluções. O processo de bioadsorção foi rápido e, nos primeiros cinco minutos, até 75% do total de íons Cu foram depositados na superfície do fungo em estudo (IANIS; TSEKOVA; VASILEVA, 2006).

Say et al. (2001) estudaram o efeito do pH na bioadsorção de Cd, Pb e Cu por *Phanerochaete chrysosporium*. Segundo estes autores, o pH do meio afeta a solubilidade dos metais e o estado de ionização dos grupos funcionais (carboxilato, fosfato e grupamento amino) presentes na parede celular fúngica. Os grupos carboxilatos e fosfatos possuem carga negativa que permitem que estes componentes sejam importantes sítios de ligação de cátions. Assim, em pH próximo a 6, estes pesquisadores obtiveram maior adsorção destes elementos em estudo ao fungo. Foi encontrada uma remoção de 13,24 mg de Cd, 45,25 mg de Pb e 10,72 mg de Cu, por grama de biomassa seca.

Kapoor, Viraraghavan e Cullimore (1999) estudaram a remoção de Pb, Ca e Cu por *Aspergillus niger* em diferentes pHs e a compararam com a remoção obtida pelos métodos tradicionais de troca iônica por resina e carvão ativado. Observaram que, em pH 5,5, não ocorre a precipitação de tais elementos e, dessa forma, o processo de remoção dos mesmos ocorreria, provavelmente, devido à adsorção destes à biomassa fúngica. Assim, provavelmente, a remoção dos elementos-traço obtidas no presente estudo deve ser resultante dos mecanismos de bioadsorção e bioacumulação, e não de um processo de precipitação dos elementos devido a fenômenos físicos.

Os mesmos autores citados anteriormente concluíram que a remoção dos elementos-traço pela biomassa fúngica é superior à obtida em carvão ativado e que a remoção por troca iônica em resinas não é eficiente quando os íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^{+}$  estão presentes, como é caso da água residuária do café. Assim, o

tratamento destes efluentes com biomassa de fungos do gênero *Aspergillus* seria uma alternativa altamente viável.

Tsekova, Todorova e Ganeva (2006) obtiveram remoção de 72,8% de Cu, 52,3% de  $Mn^{+2}$  e 55,4% de Zn por *Aspergillus niger* imobilizados em alginato de cálcio removeram, e 67,1% de Cu, 44,6% de Mn, 58,5% de Zn, em álcool polivinílico + hidrogel (PVA), após 30 minutos de incubação. No trabalho realizado por estes autores, a remoção de Cu foi maior do que a do elemento Zn, seguido de Mn, diferentemente do obtido no presente trabalho. Além disso, o pH em que foi observada maior remoção destes elementos foi o pH 7,5, enquanto neste estudo o pH atingido por este fungo foi de 3,1.

Kapoor e Viraraghavan (1998) estudaram a adsorção Cd, Cu, Pb e Ni por biomassa de *A. niger* imobilizada em polímero (polisulfona) com forma esférica em biofiltros de fluxo contínuo e obtiveram remoção de 3,6 mg de Cd, 2,89 mg de Cu, 10,05 mg de Pb e 1,08 mg de Ni por grama de biomassa.

Lourenço (2006) também utilizou tubos corrugados como meio suporte. Entretanto, diferente do presente trabalho, concluiu que o processo de adesão de microrganismos ao meio suporte foi dificultado pela textura bastante lisa dos anéis, apesar da superfície irregular e dos pequenos canais que facilitaram o acúmulo dos mesmos.

Silva (2008) estudou a adsorção de Cu pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* nos mesmos biofiltros utilizados neste estudo, testando, como meio suporte, uma variedade de materiais, entre eles o conduíte. Comparando-se os materiais empregados, o melhor suporte utilizado foi o conduíte, em razão da forma de anel, que facilita o crescimento de hifas em seu interior e a consequente fixação do fungo ao suporte. No biofiltro contendo este meio suporte, foi observado, em 22 horas, valor máximo de biossorção deste elemento de 35,8%. No presente estudo, foi obtida remoção de 40% de Cu por ambos os fungos testados com 48 horas de incubação.

### 3.4 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raio-X

Este método de avaliação da presença de elementos-traço, detecta apenas os elementos que estão aderidos à parede celular fúngica, apresentando assim, os elementos-traço que foram removidos da solução, pelo processo de bioissorção. Além disso, esta análise, apesar de fornecer dados quantitativos bem próximos do real, não pode ser considerada como uma análise quantitativa, mas apenas qualitativa.

Nos Gráficos 1 a 8 são apresentados os resultados de microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*, isolados de regiões contaminadas e não contaminadas, após o contato com o meio de cultura sem adição de elementos-traço (controle) e após o contato com meio de cultura com uma solução de elementos-traço (5 mg/L).

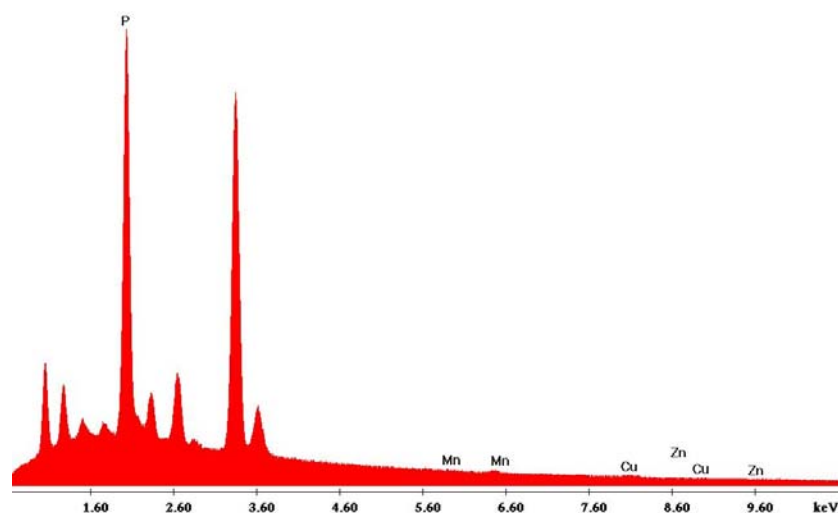


Gráfico 1 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raio-X do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região contaminada – amostra controle – sem elementos-traço

Observa-se, no Gráfico 1, que não houve a formação de picos para os elementos Cu, Mn e Zn, indicando que não ocorreu adsorção destes elementos por esse fungo. Esse resultado era esperado, uma vez que esta é a amostra controle, sem elementos-traço (concentração 0), do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região contaminada.

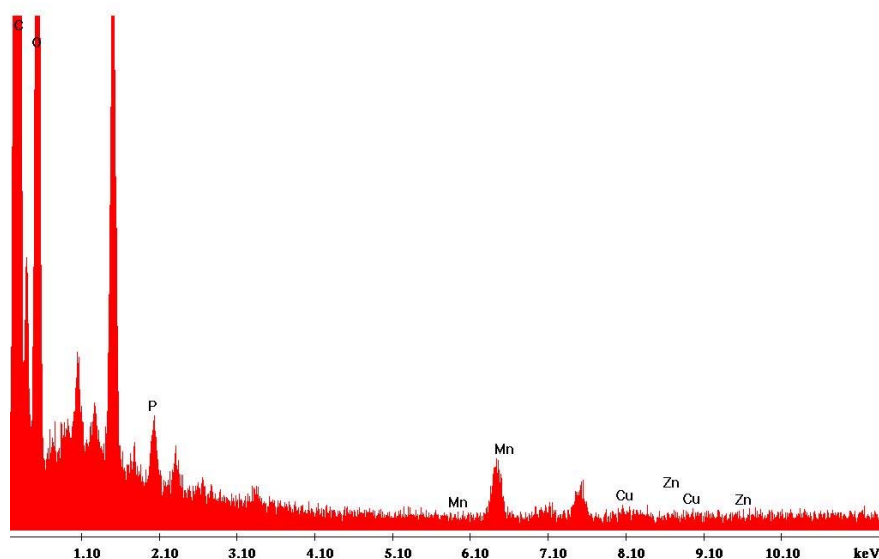


Gráfico 2 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raio-X do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região contaminada – amostra em contato com solução dos elementos-traço Cu, Mn e Zn (5 mg/L)

Pela análise do Gráfico 2 observa-se que houve a formação de picos dos elementos Cu e Mn, não ocorrendo o mesmo para o elemento Zn. Estes resultados indicam que ocorreu adsorção de Cu e Mn por este fungo.

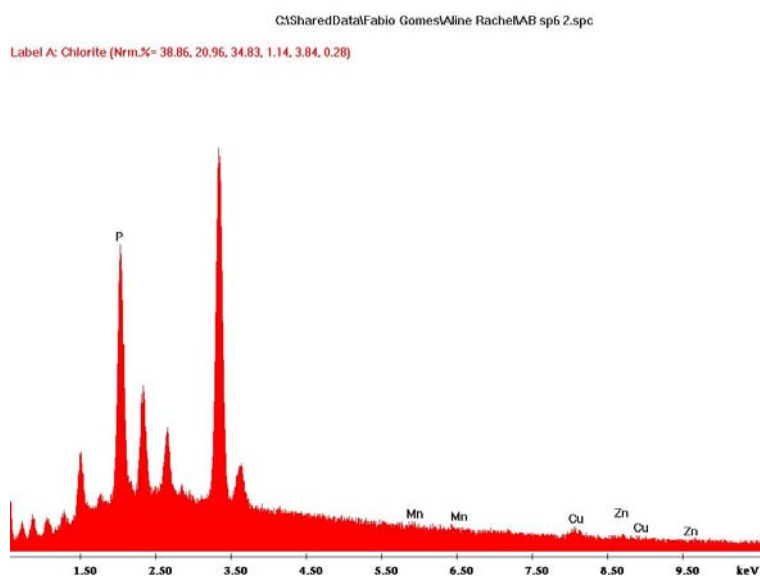


Gráfico 3 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raio-X do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região não contaminada – amostra controle – sem elementos-traço

Pode-se observar, no Gráfico 3, que não houve a formação de picos dos elementos Mn e Zn, e ocorreu um ligeiro pico do elemento cobre, indicando que não houve adsorção destes elementos por esse fungo. Esse resultado era esperado, uma vez que esta é a amostra controle, sem elementos-traço (concentração 0), do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região não contaminada.

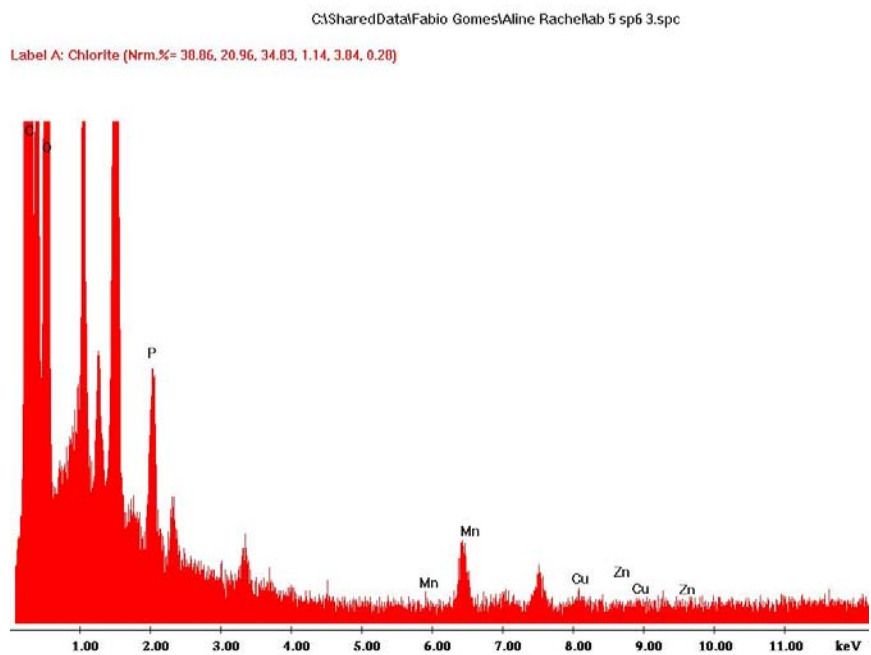


Gráfico 4 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X do fungo *Aspergillus brasiliensis* isolado de região não contaminada – amostra em contato com solução dos elementos-traço Cu, Mn e Zn (5 mg/L)

Pela análise do Gráfico 4, pode-se observar que houve formação de picos dos elementos Cu e Mn, fato não observado para o elemento Zn, indicando que ocorreu a adsorção destes dois primeiros elementos pelo fungo avaliado.



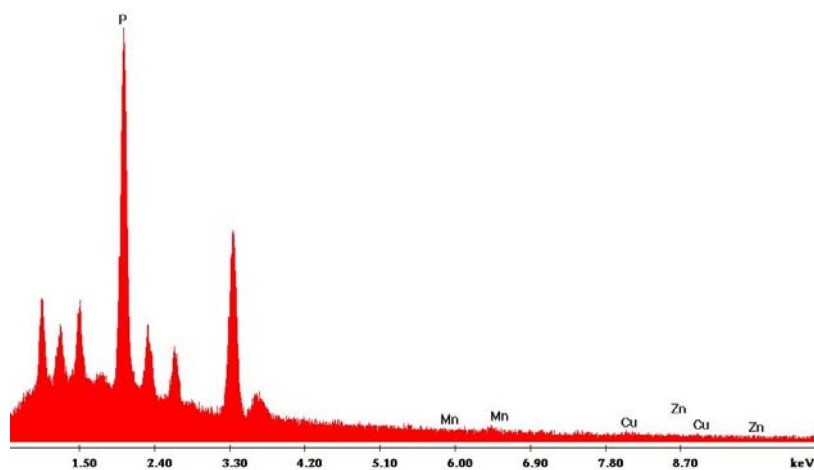


Gráfico 5 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região contaminada – amostra controle – sem elementos-traço

Pelo Gráfico 5 observa-se que não houve a formação de picos dos elementos Cu, Mn e Zn, indicando que não houve adsorção destes elementos por esse fungo. Esse resultado era esperado, uma vez que esta é a amostra controle, sem elementos-traço (concentração 0), do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região contaminada.

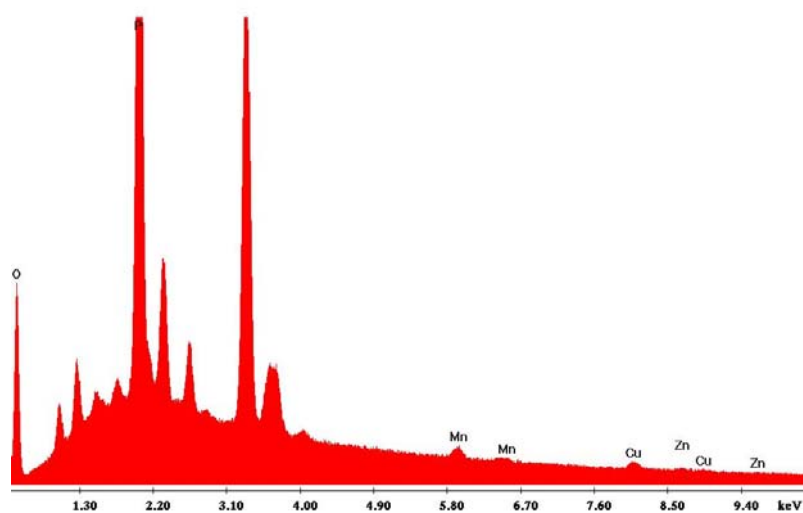


Gráfico 6 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região contaminada – amostra em contato com solução dos elementos-traço Cu, Mn e Zn (5 mg/L)

No Gráfico 6, observa-se que houve a formação de picos dos elementos Cu, Mn e uma ligeira formação de pico para o elemento Zn, indicando que ocorreu adsorção destes elementos por este fungo.

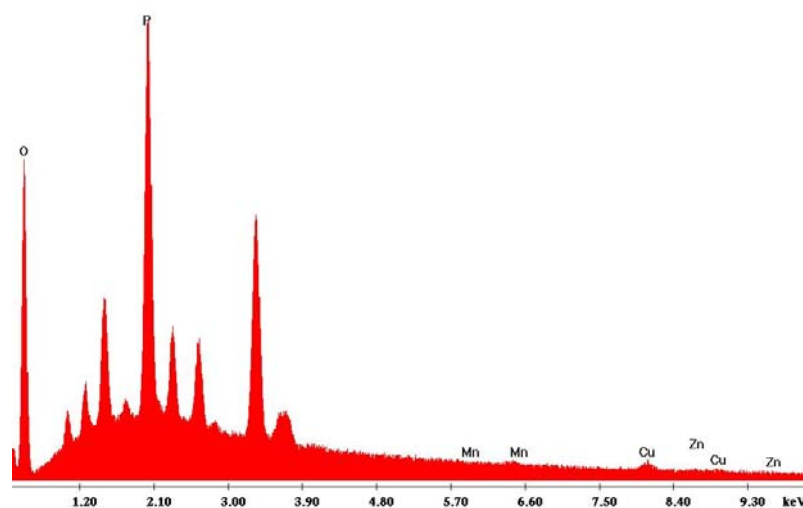


Gráfico 7 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região não contaminada – amostra controle – sem elementos-traço

A avaliação dos dados do Gráfico 7 permite constatar que não ocorreu a formação de picos dos elementos Mn e Zn, indicando que não houve adsorção destes elementos por esse fungo. Esse resultado era esperado, uma vez que esta amostra é a controle, sem elementos-traço (concentração 0), do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região não contaminada. O pequeno pico de cobre formado não era esperado neste resultado, entretanto, deve ter ocorrido devido a determinados componentes presentes no meio de cultura.

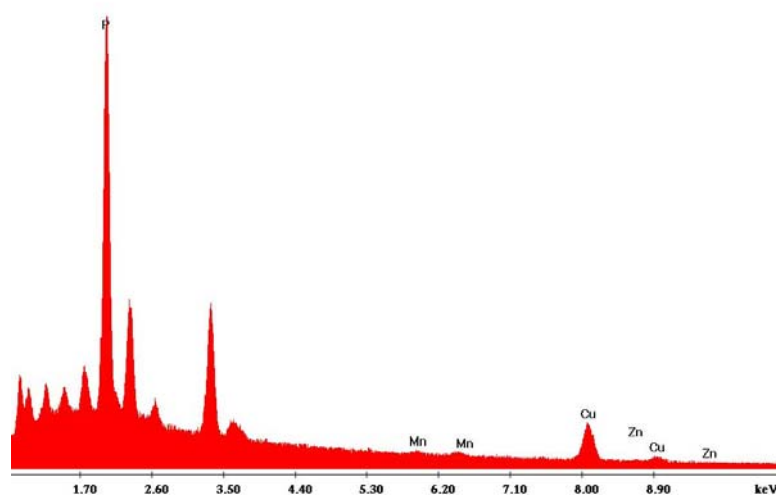


Gráfico 8 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X do fungo *Penicillium citrinum* isolado de região não contaminada – amostra em contato com solução dos elementos-traço Cu, Mn e Zn (5 mg/L)

A análise do Gráfico 8 revela que houve formação de picos dos elementos Cu, um ligeiro pico de Mn e não houve formação de pico para o elemento Zn, indicando que ocorreu a adsorção destes dois primeiros elementos pelo fungo em estudo.

Purchase et al. (2009) também utilizaram a microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X para mostrar a adsorção de Pb pelo fungo *Beauveria bassiana* e concluíram que o processo de adsorção é um dos mecanismos responsáveis pela remoção de Pb do ambiente por este fungo.

Velmurugan et al. (2010) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X para a observação de nanocristais de Zn adsorvidos à biomassa de *Fusarium* spp. Os cristais formados no trabalho citado tinham formato uniforme e morfologia circular, diferentemente do resultado

obtido neste trabalho, no qual não houve formação de cristais de elementos-traço. Segundo os mesmos autores, a formação de nanocristais com morfologias diferentes em diferentes linhagens fúngicas se deve à produção de proteínas pelas células fúngicas a que os elementos-traço aderem e, assim, são adsorvidos à parede celular. Assim, a forma apresentada pela nanocristal é diretamente dependente do tipo de proteína produzida e liberada no meio. Neste estudo, não foi observada a presença de cristais aderidos à biomassa fúngica.

Após avaliação dos resultados obtidos neste estudo, observa-se que não há evidências para a conclusão de que o processo de bioissorção foi maior do que a absorção. Pode-se apenas afirmar, com base nos gráficos fornecidos pela microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raio-X, que a bioissorção é um dos mecanismos físicos responsáveis pela diminuição da concentração dos elementos-traço avaliados neste estudo.

Apesar de os gráficos formados após a microanálise de raios-X não apresentarem resultados quantitativos, mas apenas qualitativos, pode-se observar que o pico formado no gráfico de todos os fungos testados do elemento-traço Zn foi muito pequeno em relação aos outros elementos-traço avaliados. Esse resultado pode, aparentemente, contrastar com os testes anteriores (espectrofotometria de absorção atômica), em que o Zn foi um dos elementos que foram removidos com maior eficiência pelo fungo *Aspergillus brasiliensis*. Entretanto, este elemento deve ter sido absorvido pelas células fúngicas, uma vez que é muito importante em várias funções enzimáticas, mostrando, assim, que ambos os processos de bioissorção e absorção desempenham papel importante na remoção de elementos-traço do ambiente. O mesmo processo pode ter ocorrido com os outros elementos-traço, entretanto, como pode ser observado no gráfico, grande parte ficou aderida à parede celular fúngica.

#### 4 CONCLUSÕES

Os fungos estudados, *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*, foram tolerantes aos elementos (Cu, Mn e Zn) e às concentrações testadas (0,5, 1 e 5 mg/L). Entretanto, conforme o esperado, as linhagens isoladas de regiões contaminadas apresentaram maior tolerância a estes elementos em relação às isoladas de ambientes não contaminados.

Com relação ao teste de remoção em escala laboratorial (pH 5), as linhagens dos fungos em estudo responderam diferentemente aos elementos testados (independente de sua origem).

No teste em biofiltros (pH6), o fungo *Penicillium citrinum* foi a espécie que apresentou melhores resultados na remoção dos elementos-traço testados.

As análises de microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X foram capazes de comprovar a adsorção dos elementos-traço à parede celular fúngica. No entanto, a remoção dos elementos-traço também pode estar relacionada à absorção dos elementos pelas células fúngicas em estudo.

## REFERÊNCIAS

ADRIANO, D. C. **Elements in the terrestrial environments:** biochemistry, bioavailability and risk of metals. New York: Springer, 2001. 866 p.

AKAR, S. T. et al. Removal of copper (II) ions from synthetic solution and real wastewater by the combined action of dried *Trametes versicolor* cells and montmorillonite. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 97, n. 1/2, p. 98-104, June 2009.

AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 15, p. 1780-1787, Oct. 2006.

BERGSTEN, L. R. et al. Estudo de fungos isolados de sedimento contaminado por compostos tóxicos. **Revista:** revista brasileira de vigilância sanitária, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 185-191, jan. 2005.

CALFA, B. A.; TOREM M. L. Biorreagentes: aplicações na remoção de metais pesados contidos em efluentes líquidos por bioissorção/bioflotação (Bioreagents - their use in the removal of heavy metals from liquid streams by biosorption/bioflotation). **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 60, n. 3, p. 537-542, jul./set. 2007.

CHANG, J. S.; HUANG, J. C. Selective adsorption/recovery of Pb, Cu, and Cd with multiple fixed beds containing immobilized bacterial biomass. **Biotechnology Progress**, New York, v. 14, n. 5, p. 735- 741, Sept./Oct. 1998.

CONSUMO per capita de café no Brasil em 2010 é recorde de 4,81 kg. **Estado de Minas**, Belo Horizonte, 26 jan. 2011. Disponível em: <[http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2011/01/26/internas\\_economia,205997/consumo-per-capita-de-cafe-no-brasil-em-2010-e-recorde-de-4-81-kg.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2011/01/26/internas_economia,205997/consumo-per-capita-de-cafe-no-brasil-em-2010-e-recorde-de-4-81-kg.shtml)>. Acesso em: 18 jan. 2011.

DAVIS, A. P.; SHOKOUHIAN, M.; NI, S. Loading estimates of lead, copper, cadmium and zinc in urban runoff from specific sources. **Chemosphere:** chemistry, physics and biology as focused on environmental problems, Oxford, v. 44, n. 5, p. 997-1009, Aug. 2001.

DAWEI, P. et al. Nanomaterial/ionophore-based electrode for anodic stripping voltammetric determination of lead: an electrochemical sensing platform toward heavy metals. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, n.12, p. 5088-5094, June 2009.

DE, S. et al. Effect of heavy metals and carbendazim on the in vitro growth of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Verticillium chlamyosporium* Goddard. **Proceedings of the National Academy of Sciences India: section b-biological sciences**, Allahabad, v. 79, n. 1, p. 393-398, Jan./Mar. 2009.

DRITSA, V.; RIGAS, F. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 1, p. 120-124, 2006.

EZZOUHRI, L. et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 3, n. 2, p. 35-48, 2009.

FAN, T. et al. Biosorption of cadmium (II), zinc (II) and lead (II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 160, n. 2/3, p. 655-661, Dec. 2008.

FARYAL, R.; LODHI, A.; HAMEED, A. Isolation, characterization and biosorption of zinc by indigenous fungal strains *Aspergillus fumigatus* RH05 and *Aspergillus flavus* RH07. **Pakistan journal of botany**, Karachi, v. 38, n. 3, p. 817-832, 2006.

GADD, G. M. Fungi and yeasts for metal accumulation. In: EHRLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. (Ed.). **Microbial mineral recovery**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 249-276.

GALUN, M. et al. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: kinetic and uptake parameters. **Water, Air and Soil Pollution: an international journal of environmental pollution**, Dordrecht, v. 33, n. 3-4, p. 359-371, 1987.

GONÇALVES M. **Caracterização e oxidação dos compostos orgânicos nas águas residuárias da despolpa úmida dos frutos do cafeeiro**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.



GUILHERME L. R. G. et al. Elementos traços em solos e ecossistemas aquáticos. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 345-382.

IANIS, M.; TSEKOVA, K.; VASILEVA, S. Copper biosorption by *Penicillium cyclopium*: equilibrium and modelling study. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 20, n. 1, p.195-201, Jan. 2006.

IRAM, S. et al. Fungal tolerance to heavy metals. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 5, p. 2583-2594, 2009.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption: an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 53, n. 3, p.195-206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 61, n. 3, p. 221-227, Sept. 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode. **Water Research**, New York, v. 32, n. 6, p. 1968-1977, June 1998.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus nidulans*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n.1, p.95-104, Apr. 1999.

KIEKENS; L.; COTTENIE, A. Principles of investigations on the mobility and plant uptake of heavy metals. In: LESCHBER, R. et al. (Ed.). **Chemical methods for assessing bioavailable metals in sludges and soils**. New York: Elsevier, 1985. p. 21-32.

LEITÃO, A. L. Potential of penicillium species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 6, n. 4, p. 1393-1417, 2009.

LE MOS, J. L. S. et al. **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

LI, X. G. et al. Facile synthesis and highly reactive silver ion adsorption of novel microparticles of sulfodiphenylamine and diaminoanthracene copolymers. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 17, n. 2, p. 5411-5419, Sept. 2005.

LIU, Y. G. et al. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, Changsha, v. 16, n. 3, p. 681-686, June 2006.

LODEIRO, P. et al. The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: kinetic and equilibrium studies. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, n. 2, p. 264-273, Jul. 2006.

LOPES, M. V. **Microbiota edáfica como indicador da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

LÓPEZ, E. E.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, Oxford, v. 50, n.1, p. 137-143, 2003.

LOURENÇO, A. M. P. **Desempenho de um sistema composto de reator UASB, filtro anaeróbio e lagoa aerada facultativa para o tratamento das águas residuárias da suinocultura**. 2006. 129 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MATOS, A. T.; LO MÔNACO, P. A. Tratamento e destinação final dos resíduos gerados no beneficiamento do fruto do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 647-708.

MINAS GERAIS. Deliberação Normativa nº. 10, de 16 de dezembro de 1986. Estabele normas e padrões para qualidade das águas, lançamentos de afluentes nas coleções de águas, e dá outras providências. **Minas Gerais: diário executivo**, Belo Horizonte, 10 jan. 1987. Disponível em: <[http://www.paas.uff.br/legisla/copam10\\_86.pdf](http://www.paas.uff.br/legisla/copam10_86.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2011.

MULLEN M. D. et al. Sorption of heavy metals by soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 24, n. 3, p. 129-135, 1992.

MULLIGAN, C. N.; GALVEZ-CLOUTIER, R.; RENAUD, N. Biological leaching of copper mine residues by *Aspergillus Níger*. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM, 13., 1999, San Lorenzo del Escorial. **Proceedings...**Amsterdam: Elsevier, 1999. 1 CD-ROM.

NAZARETH, S.; MARBANIANG, T. Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium* morphotypes. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 363-369, Oct. 2008.

NIU, H. et al. Removal of lead from aqueous solutions by penicillium biomass. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 42, n. 6, p.785-787, Sept. 1993.

PAN, D. et al. Nanomaterial/ionophore-based electrode for anodic stripping voltammetric determination of lead: an electrochemical sensing platform toward heavy metals. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, n.12, p. 5088-5094, 2009.

PRICE, M. S.; CLASSEN, J. J.; PAYNE, G. A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 77, n. 1, p. 41-49, Mar. 2001.

PURCHASE, D. et al. Effects of temperature on metal tolerance and the accumulation of Zn and Pb by metal-tolerant fungi isolated from urban runoff treatment wetlands. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 4, p. 1163-1174, Apr. 2009.

REN, W. X. et al. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 167, n. 1/3, p. 164-169, Aug. 2009.

ROANE, T. M.; PEPPER, I. L. Micoorganisms and metal pollutants. In: MAIER, R. M.; PEPPER, L. L.; GERBA, C. P. **Environmental microbiology**. 2th ed. San Diego: Elsevier, 2000. p. 403-423.

ROUCH, D. A.; LEE, B. T. D.; MORBY, A. P. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 14, n. 2, p. 132-141, Feb. 1995.

SAEED, A.; AKHTER, M. W.; IQBAL, M. A. Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbent. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 45, n. 1, p. 25-31, Sept. 2005.

SAXENA, P.; BHATTACHARYYA, A. K.; MATHUR, N. Nickel tolerance and accumulation by filamentous fungi from sludge of metal finishing industry. **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 23, n. 5, p. 333-340, July/Aug. 2006.

SAYA, R.; DENIZLI, A.; YAKUP, A. M. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, n. 1, p. 67-70, 2001.

SAYER, J. A.; GADD, G. M. Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 10, p. 1261-1267, Oct. 2001.

SILVA J. F. **Desenvolvimento de biofiltro para avaliar a capacidade de biossorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides***. 2008. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SILVA, M. A. C. et al. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 45-47, Nov. 2003. Supplement 1.

SIMÕES, M. L. G.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo de diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solos de área de caatinga. **Holos Environmental**, Rio Claro, v. 5, n. 2, p. 94-103, 2005.

SKOWRONSKI, T.; PIRSZEL, J.; PAWLIK-SKWRONSKA, B. Heavy metal removal by the waste biomass of *Penicillium chrysogenum*. **Water Pollution Research Journal of Canada**, New York, v. 36, n. 1, p. 793-803, 2001.

SOARES, C. R. T. S. et al. Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5., 2002, Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 56-82.

- SPRINTI, M.; ZHUANG, H.; TRUJILLO, E.M. Evaluation of immobilized biomass beads for removing heavy metals from wastewater. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 67, n. 6, p. 943-954, Sept./Oct. 1995.
- SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 10, p. 1167-1173, Jul. 2006.
- SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, n. 3/4, p. 130-137, Feb. 1999.
- TASTAN, B. E.; ERTUG˘RUL, S.; DÖNMEZ, G. Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 3, p. 870-876, Feb. 2010.
- TOWNSLEY, C. C.; ROSS, I. S.; ATKINS, A. S. Copper removal from a simulates leach effluent using the filamentous fungus *Trichoderma viridis*. In: ECCLES, H.; HUNT, S. (Ed.). **Immobilization of ions by biosorption**. Chichester: E. Horwood, 1986. p. 159-170.
- TSEKOVA, K.; TODOROVA, D.; GANEV, A. S. Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 1, p. 1780-1787, Jan. 2006.
- VALIX, M.; LOON, L. O. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. **Mineral Engineering**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 193-198, Mar. 2003.
- VALIX, M.; TANG, J. Y.; MALIKM, R. Heavy metal tolerance of fungi. **Minerals Engineering**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 499-505, May 2001.
- VARGA, J. et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 8, p. 1925-1932, Aug. 2007.
- VASCO, E. Z. Procesamiento de frutos do café por via humeda y generación de subproductos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: UFRP/IAPAR/IRD, 1999. p. 345-355.

VELMURUGAN, P. et al. Removal of zinc by live, dead, and dried biomass of *Fusarium* spp. isolated from the abandoned-metal mine in South Korea and its perspective of producing nanocrystals. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 182, n. 1/3, p. 317-324, Oct. 2010.

VIVAS, A.; BAREA, J. M.; AZCON, R. *Brevibacillus brevis* isolated from cadmium- or zinc-contaminated soils improves in vitro spore germination and growth of *Glomus mosseae* under high Cd or Zn concentrations. **Microbial Ecology**, New York, v. 49, n. 3, p. 416-424, Apr. 2005.

YETIS, U. et al. The removal of Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, New York, v. 34, n. 16, p. 4090-4100, Nov. 2000.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 13, p.2557-2561, Sept. 2007.

ZHOU, J. L. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, n. 5, p. 686-693, 1999.