UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CRESCIMENTO E CAPACIDADE DE BIOSORÇÃO DE METAIS POR *Pleurotus sajor-caju*, EM CULTIVO LÍQUIDO E EM CULTIVO SÓLIDO

MSc. STELA MARIS DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

CAXIAS DO SUL
2007

STELA MARIS DA SILVA

CRESCIMENTO E CAPACIDADE DE BIOSORÇÃO DE METAIS POR *Pleurotus sajor-caju*, EM CULTIVO LÍQUIDO E EM CULTIVO SÓLIDO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

CAXIAS DO SUL
2007

Dedico a Letícia Osório da Rosa, pela amizade e apoio incondicionais, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Σ AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon pelo confiança na possibilidade de realização desta tese e apoio constante.

Aos colegas da Divisão de Processos Biotecnológicos I, aos professores e funcionários do Instituto de Biotecnologia, em especial à Cláudia Marques e Marielsa D. N. Secco e Rosângela T. Festugato, pela amizade e incentivo.

Aos amigos da Universidade Nacional de Cuyo (Mendoza-Argentina), senhor Elias Colías, professora Susana Llamas e professor Hugo Martinez.

Aos colegas do Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional de Cuyo, Mabel Chambouleyron de Spadavecchia, Oscar Daniel Galvez e Maria Luz Aguilar, e em especial ao professor Jorge Fuentes Berazategui, pela amizade e incentivo.

À Profª. Drª. Alexandra Finotti, pela revisão desta tese.

Aos professores doutores Maria Lúcia Yoneama e Johnny Ferraz Dias, do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela realização das análises por PIXE.

À minha família e as amiga-irmãs Tânia M. Kohlrausch, Luciane L.Mayer e Eunice Pilenghy, pela confiança e incentivo e a Elton Monteiro Marques e Osvaldo Ramon Freire, pelo companheirismo, carinho e amor sempre presentes.

Aos professores Márcia Capelano e Valneide Aspiroz pelo estímulo ao desenvolvimento deste o trabalho e pela possibilidade de participação no Projeto Alfa-Rede Jean Mermoz (França-Argentina).

À UCS e ao CNPQ, pelo apoio estrutural e financeiro.

ÍNDICE

Lista de Figuras i

Lista de Tabelas iii

Resumo v

Abstract vi

1 Introdução 1

2 Objetivos 4

3 Revisão Bibliográfica 5

3.1 Geração de resíduos industriais, poluição ambiental e remoção metais 5

3.2 Microrganismos: detoxificação de resíduos sólidos industriais e biosorção de metais 9

3.3 Características gerais de *Pleurotus* spp. e sua capacidade de biosorção de metais 15

3.4 Enzimas de *Pleurotus sajor-caju*: produção e aplicações 18

4 Material e Métodos 22

4.1 Fungo, meios de manutenção e meios de cultivo básicos 24

4.2 Procedimentos experimentais para realização dos estudos de crescimento e capacidade de biosorção do fungo cultivado em meio líquido perante a adição das soluções de sais de metais 26

4.3 Procedimentos experimentais para medidas de pH durante o desenvolvimento fúngico em meio líquido, perante a adição das soluções de sais de metais 29

4.4 Procedimentos experimentais para estudos da capacidade de biosorção de *Pleurotus sajor-caju* crescido em meio sólido, perante a adição das soluções de sais de metais 29

4.5 Procedimentos experimentais para estudos da produção enzimática do fungo crescido em meio sólido, perante a adição das soluções de sais de metais 31

4.6 Metodologia para determinação e quantificação de metais biosorvidos pelo fungo, nos diferentes tipos de ensaios realizados 32

4.7 Análises estatísticas 34

5 Resultados e Discussão 36

5.1 Massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* em cultivo líquido com adição de metais 37

5.2 Determinação da biosorção de metais por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo líquido 42

5.3 Determinação do pH durante o desenvolvimento de *Pleurotus sajor-caju* em meio líquido 69

5.4 Determinação da biosorção de metais por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo sólido 75

5.5 Capacidade de biosorção de *Pleurotus sajor-caju* em cultivo líquido, perante a adição das soluções de metais em diferentes estágios de crescimento fúngico 92

5.6 Determinação da atividade enzimática em meio sólido perante a adição das soluções de metais 99

6 Conclusões 109

7 Perspectivas 112

8 Referências Bibliográficas 114

Anexos – Resultados Experimentais

FIGURAS

Figura 1 – Placa de Petri contendo colônias de *Pleurotus sajor-caju* com 8 dias de desenvolvimento. 25

Figura 2 – Meio de cultivo sólido antes da noculação de *Pleurotus sajor-caju*. 26

Figura 3 – Acelerador Tandetron do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 33

Figura 4 – Massa micelial de *Pleurotus sajor-caju*, em meio de cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 38

Figura 5 – Massa micelial de *Pleurotus sajor-caju*, em meio de cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 40

Figura 6 – Frascos contendo micélio de *Pleurotus sajor-caju* desenvolvendo-se em cultivo líquido. 43

Figura 7 – Biosorção de zinco pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 14 e 21 dias de desenvolvimento. 44

Figura 8 – Biosorção de ferro pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 47

Figura 9– Biosorção de alumínio pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 49

Figura 10 – Biosorção de cobre pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 52

Figura 11 – Biosorção de cromo pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 57

Figura 12 – Biosorção de níquel pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 60

Figura 13 – Biosorção de metais pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento, quando da adição da solução 'Td1'. 64

Figura 14 – Variação do pH em meio de cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju*, no tempo zero e aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 70

Figura 15 – Variação do pH em meio de cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju*, no tempo zero e aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. 72

Figura 16 – Meios de cultivo sólido em sala de crescimento, para desenvolvimento dos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*. 76

Figura 17 – Quantificação dos metais presentes na serragem pura, serragem com adições e controle (corpo de frutificação) de *Pleurotus sajor-caju.* 77

Figura 18 – Biosorção de zinco e cobre pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento. 78

Figura 19 – Biosorção de ferro e alumínio pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento. 81

Figura 20– Biosorção de cromo e níquel pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento. 83

Figura 21 – Corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* obtido de cultivo sólido com sulfato de níquel II adicionado ao meio de cultivo. 84

Figura 22 – Biosorção de ferro e zinco pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento, quando da adição da solução 'Td1'. 87

Figura 23 – Biosorção de ferro e zinco pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento, quando da adição da solução 'Td2'. 90

Figura 24 – Variação do pH em meio de cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju* crescido em cultivo líquido, com adição de metais no 7º dia de desenvolvimento. 96

Figura 25 – Atividade de lacases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo. 100

Figura 26 – Atividade de manganês peroxidases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo. 102

Figura 27 – Atividade de lacases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo. 105

Figura 28 – Atividade de manganês peroxidases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo. 106

TABELAS

Tabela 1 – Lista de valores orientadores para solos e para águas subterrâneas. 6

Tabela 2 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de zinco. 46

Tabela 3 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de ferro II. 48

Tabela 4 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de alumínio. 51

Tabela 5 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de cobre II. 53

Tabela 6 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de cromo III. 59

Tabela 7 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de níquel II. 61

Tabela 8 – Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em ensaio denominado 'Td1'. 65

Tabela 9 – Comparação entre a máxima absorção micelial e os estágios de desenvolvimento de *Pleurotus sajor-caju* em relação aos metais aplicados isoladamente. 67

Tabela 10 – Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de zinco e em meios com adição de sulfato de cobre II. 79

Tabela 11 – Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de ferro II e em meios com adição de sulfato de alumínio. 82

Tabela 12 – Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de cromo III e em meios com adição de sulfato de níquel II. 85

Tabela 13 – Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição da solução 'Td1' na concentração final de 30mg.100g^{-1}. 89

Tabela 14 – Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em ensaios denominado 'Td2' com todos os sulfatos testados na concentração final de 60mg.100g^{-1}. 90 91

Tabela 15 – Comparação entre as diferentes condições de cultivo e a biosorção dos metais cobre, alumínio, ferro e zinco, por *Pleurotus sajor-caju*. 93

Tabela 16 – Análise estatística dos dados que constituíram a Figura 25 e Figura 26. 104

Tabela 17 – Análise estatística dos dados que constituíram a Figura 27 e Figura 28. 107

Palavras chaves:

Pleurotus sajor-caju, metais pesados, biorremediação, fenoloxidases, absorção

RESUMO

Neste trabalho, avaliaram-se o crescimento e a capacidade de biosorção de metais de *Pleurotus sajor-caju* PS 2001, em meios de cultivo líquido e sólido, contendo sulfatos de cobre II, de ferro II, de alumínio, de zinco, de cromo II e de níquel II, em concentrações de 30 ou 60mg.100mL^{-1} . O crescimento e a massa micelial foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento para cultivo líquido sendo que para cada etapa de desenvolvimento foram retiradas amostras que foram submetidas a metodologia PIXE para determinação da biosorção dos elementos presentes nas amostras. No cultivo sólido, após 21 dias forampara os corpos de frutificação dos cultivos sólidos. Para cada etapa de de do trabalho desenvolveu-se um método que se mostrou adequado para quantificar indiretamente a massa fúngica. Os diferentes tratamentos foram propostos seguindo o método de análise de superfície de Box-Wilson, possibilitou a otimização do meio de crescimento ao indicar que adições de sais nas concentrações variáveis presentes nos fermentadores e aplicadas nos tratamentos otimizados de T1 até T5, correspondentes a $(NH_4)_2SO_4$: T1 = 20,50mg a T5 = 24,48mg; $MnSO_4$: T1 = 0,0235mg T5 = 0,0275mg e $CuSO_4.5\ H_2O$: T1 = 0,024mg a T5 = 0,030mg, possibilitaram um aumento de até três vezes da massa fúngica de *P. sajor*-caju, nos primeiros 15 dias de crescimento, em relação aos meios sem adição. Os diferentes tratamentos também apresentaram variação favorável para a secreção das enzimas lacases que tiveram sua produção aumentada em valores de 75% até 200%; a secreção das enzimas manganês peroxidases apresentaram aumento variável de 25% até 90%, indicando que as variações nas adições dos sais empregados nos tratamentos originaram diferentes valores para as secreções enzimáticas. Adicionalmente, constatou-se que a adição de sulfato de cromo III e sulfato de níquel II aos meios de cultivo na ordem de 9,41 mg/ favorece a produção de massa fúngica, bem como a secreção de lacases e manganês peroxidases.

ABSTRACT

In this work, *Pleurotus sajor-caju* PS2001 was cultivated in solid-state, in a medium formulated with sawdust of *Pinus* spp and wheat bran, to which had been added cupric sulphate, manganese sulphate and ammonium sulphate. Different treatments had been made with these salts, aiming at the solid cultive medium otimization for attainment of bigger productivity in the commercial production of mushrooms.

In the first stage of the work a method was developed that was adequate to quantify indirectly the fungi mass indirectly. This method was based on the amount of chitin of the fungi wall which was estimated by the evaluation of the free N-acetilglucosamine concentration released for enzymatic hydrolysis. Different treatments had been considered following the methodology of Box-Wilson, who indicated the amounts of salts ideals to the medium, which allowed an increase of up to three times in the content of
fungus mass during the first 15 days of growth. The treatments had also shown to favorable variation for the secretion of lacases and manganese peroxidases, indicating the potential use of these mushrooms also for the production of these enzymes and purpose of biorremediation. Additionally, one evidenced that the phenol addition to the cultive medium favors the production of fungus mass as well as the secretion of lacases and manganese peroxidases.

1. INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul caracteriza-se por apresentar grande concentração de indústrias, podendo-se destacar indústrias químicas, de celulose, de curtimento, de metalurgia e de refino de petróleo, entre outras. Como parte inerente do processo de desenvolvimento industrial, há a geração de resíduos altamente poluentes, como os metais, que são encontrados tanto nos resíduos sólidos como nos efluentes líquidos provenientes destas indústrias.

Quando estes resíduos são gerados em grande quantidade e não têm o gerenciamento adequado podem contaminar solos e águas, afetando de modo significativo a qualidade de vida e a saúde dos seres humanos, além de comprometer o meio ambiente como um todo. Portanto, é indispensável o tratamento de tais resíduos, não só para o atendimento às leis ambientais, mas como uma forma alternativa para recuperação do valor econômico a eles agregado.

Por outro lado, paralelamente ao desenvolvimento industrial, há o desenvolvimento de metodologias e a aplicação de novas tecnologias para remoção e transformação de compostos tóxicos presentes em resíduos sólidos industriais. O uso de microrganismos com capacidade de adsorção para o tratamento de efluentes e processos de bioremediação têm se destacado em anos recentes. Neste contexto, a utilização de fungos degradadores de lignina aparece como uma promissora alternativa para o tratamento de resíduos sólidos industriais, particularmente pela presença de suas enzimas oxidativas, que também podem ser aplicadas como enzimas livres. Entre os fungos hábeis a produzir enzimas extracelulares que degradam a lignina, encontram-se os fungos da podridão branca da espécie *Pleurotus sajor-caju,* do gênero *Pleurotus* sp.

Os fungos do gênero *Pleurotus* sp. secretam as enzimas fenol-oxidases que catalisam as reações que envolvem a remoção tanto fenóis potencialmente tóxicos liberados durante a degradação da lignina, como toxinas produzidas por outros organismos. Como conseqüência, as enzimas por eles secretadas têm aplicação potencial em corantes, indústria têxtil ou de papel, bem como na degradação de fungicidas, inseticidas, hidrocarbonetos aromáticos, resíduos fenólicos e vários xenobióticos, que são reconhecidos como poluentes ambientais.

Há também estudos que relatam a capacidade de biosorção de metais por diferentes biomassas microbianas, principalmente quando estes estão presentes em soluções aquosas. Para tais estudos são empregados organismos vivos e não-vivos e seus derivativos, tais como fungos filamentosos, leveduras, algas e bactérias. Os fungos filamentosos parecem ser os microrganismos mais hábeis a realizar a biosorção de metais, principalmente devido à sua alta tolerância e a habilidade de incorporarem em sua biomassa, metais eventualmente presentes em resíduos industriais.

O desenvolvimento de estudos envolvendo o crescimento do fungo filamentoso *P. sajor-caju* e sua capacidade de biosorção de metais podem ser de grande relevância na medida em que estes estão presentes em distintos resíduos industriais, em efluentes líquidos e sólidos e têm efeitos inibitórios no crescimento de muitos organismos utilizados em tratamentos de descontaminação. Portanto, processos biotecnológicos efetivos, envolvendo aplicação de microrganismos, requerem mais estudos tanto para o controle apropriado das condições de reação e aplicabilidade, como para maximizar os resultados e minimizar os custos envolvidos na utilização das técnicas estudadas.

Deste modo, neste trabalho objetivou-se avaliar o crescimento e a capacidade de biosorção de metais por *Pleurotus sajor-caju*, em meios de cultivo líquido e sólido, contendo os metais cobre, ferro, alumínio, zinco, cromo e níquel, normalmente presentes em resíduos industriais. Como parâmetros foram avaliados a massa fúngica obtida nos cultivos líquido e sólido, os conteúdos de metais presentes nesta massa fúngica e também o efeito do estresse causado pela presença dos metais selecionados sobre a secreção das enzimas lacases e manganês peroxidases.

O estudo do efeito do estresse causado pela presença dos metais, na secreção das enzimas lacases e manganês peroxidases, foi realizado como parte de uma estratégia de investigação aplicada com o intuito de ampliar a compreensão dos processos envolvidos no mecanismo de biosorção de metais por *P. sajor-caju*. A soma de todos os estudos realizados no presente trabalho pretendeu contribuir para viabilizar o emprego de *P. sajor-caju* em bioprocessos que envolvam a remoção de metais.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar o crescimento e a capacidade de biosorção de metais pelo fungo *Pleurotus sajor- caju*, em cultivo líquido e em cultivo sólido.

Objetivos específicos:

- Verificar a capacidade de crescimento de *P. sajor-caju* em cultivo líquido e em cultivo sólido, na presença de soluções com diferentes concentrações dos sulfatos de cobre II, de ferro II, de alumínio, de zinco, de níquel II e de cromo III e na associação de todos estes sulfatos;
- Averiguar a capacidade de biosorção de metais pelo micélio de *P. sajor-caju* em cultivos líquidos;
- Determinar a capacidade de biosorção de metais pelos corpos de frutificação de *P. sajor-caju*;
- Analisar a capacidade de biosorção de *P. sajor-caju* crescido em cultivo líquido, perante a adição das soluções de metais em diferentes estágios de crescimento fúngico;
- Quantificar a atividade de lacases e manganês peroxidases em cultivo sólido *P. sajor-caju* na presença de metais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Geração de resíduos industriais, poluição ambiental e remoção de metais

A poluição da água, ar e solo por metais pesados, é um dos mais importantes e difíceis problemas ambientais e tem um alcance mundial. Os metais pesados como chumbo, cobre, cádmio, zinco e níquel estão entre os poluentes mais comuns encontrados em efluentes industriais (Sheng *et al*., 2004). Celaya *et al*. (2000) afirmam que os metais pesados geralmente formam compostos que podem ser tóxicos, carcinogênicos ou mutagênicos, mesmo em baixas concentrações e observaram que de todos os metais ou elementos com características metálicas, trinta, podem formar compostos que são tóxicos para o homem.

Em muitos países a aplicação de resíduos sólidos provenientes de plantas de tratamento de resíduos, em terras cultiváveis, é uma prática comum. Esta prática tem causado novos problemas tanto para o ambiente como para a saúde humana, devido à contaminação de solos, água e alimentos, causada por metais pesados, compostos orgânicos e agentes biológicos (Mougin *et al*., 2002).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) criou uma proposta de resolução em 04 de Abril de 2006, na qual estão contemplados os critérios e valores orientadores referentes à presença de substâncias químicas tais como alumínio, cromo, cobre, ferro, níquel e zinco, visando a proteção da qualidade do solo e das águas subterrâneas (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de valores orientadores para solos e para águas subterrâneas

Substâncias	**Solo (mg.kg^{-1} de peso seco)**				**Água Subterrânea (µg.L^{-1})**
	Intervenção				
	Prevenção	Agrícola APMax	Residencial	Industrial	Intervenção
Alumínio	-	-	-	-	200
Cobre	60	200	400	600	2.000
Cromo	75	150	300	400	50
Ferro	-	-	-	-	300
Níquel	30	70	100	130	20
Zinco	300	450	1.000	2.000	5.000

Fonte: CONAMA- Proposta de resolução de 04 de Abril de 2006.

Metais como zinco, níquel, cromo, cobre e selênio são amplamente empregados em processos industriais e o efeito destes elementos quando encontrados em pequenas concentrações têm sido investigado. É também conhecido que Zn, Cu, Cr e Fe, podem influenciar na estabilidade das membranas celulares bem como na síntese de ácidos nucléicos e na estabilização da dupla hélice de DNA durante a formação de pontes de hidrogênio (Zetic *et al*., 2001).

Embora Cu e Zn sejam elementos essenciais, altos níveis destes elementos causam efeitos prejudiciais à saúde. O cobre é também tóxico a uma variedade de organismos aquáticos, mesmo em baixas concentrações. A presença de cobre em elevada concentração nos solos causa redução na fixação do carbono, alteração na absorção de nutrientes e redução no crescimento de plantas. Em mamíferos expostos a elevados níveis de cobre há efeitos diversos como anorexia, anemia e danos ao fígado (Sheng *et al*., 2004).

Zinco é um elemento essencial para ativadores enzimáticos em humanos, mas é tóxico em níveis de 100-500 mg/dia. O zinco não é tão tóxico quanto o cobre para mamíferos, embora uma exposição crônica interfira na absorção do cobre e pode levar a

letargia e problemas gastrointestinais. Zinco está envolvido em funções enzimáticas das plantas, metabolismo do carbohidratos e síntese de proteínas (Toler *et al*., 2005).

No que se refere ao níquel, o efeito adverso mais comum é uma reação alérgica, podendo originar em maiores concentrações câncer de pulmão e nasal. A Environmental Protection Agency (EPA) determina que os níveis de cobre, zinco e níquel em água potável não podem ultrapassar, respectivamente a, 1,3; 5 e 0,04 $mg.L^{-1}$ (Sheng *et al*., 2004).

A exposição a metais como chumbo, alumínio, cádmio e também ao benzeno, resulta na incidência de anemia, pois estes compostos exercem seu efeito tóxico preferencialmente sobre o sistema hematopoiético (Pyszel *et al*., 2005).

O efeito tóxico de alumínio também foi observado em árvores da espécie *Picea abies* que quando crescidas em locais de alta concentração deste metal, apresentam uma redução na absorção de cálcio e magnésio por suas raízes (Eldhuset *et al.,* 2006).

Bolan *et al.* (2003) afirmam que um dos metais mais freqüentemente encontrados nos resíduos sólidos industriais, tanto de indústrias de metalurgia como de curtimento, é o cromo hexavalente (Cr^{+6}). Cromo hexavalente é altamente tóxico e carcinogênico mesmo em baixas concentrações na água, sendo a concentração máxima de Cr^{+6}, recomendável pela EPA, é de 0,05 $mg.L^{-1}$ na água potável e de 0,1 $mg.L^{-1}$ para águas de superfície.

Existem diversos processos físicos e químicos que estão disponíveis para remoção de cromo de resíduos líquidos, no entanto alguns destes métodos não são efetivos para presença de Cr^{+6} em concentrações menores do que 100 $mg.L^{-1}$ (Garg *et al*., 2004).

Enquanto Cr^{+3} é facilmente retido no solo, Cr^{+6} é pouco absorvido pelo solo e fica facilmente disponível para absorção de plantas e contaminação da água. Cromo hexavalente pode ser reduzido quimicamente ou bioquimicamente a cromo trivalente em

ambientes onde há uma fonte de elétrons disponível, tornando-se mais facilmente removível (Bolan *et al.*, 2003).

Segundo Dias *et al.* (2002) a geração de resíduos sólidos e líquidos ricos em vários metais com alto valor econômico agregado, mas potencialmente poluentes é comum a um grande número de indústrias, como as de mineração, produção de papel, refino de petróleo e outras.

Espécies metálicas mobilizadas e liberadas no ambiente por atividades tecnológicas tendem a persistir indefinidamente, circulando e, eventualmente, acumulando através da cadeia alimentar, causando sérios problemas para o ambiente, animais e humanos. Deste modo, um metal somente é 'removido' de uma solução quando está apropriadamente imobilizado. Além dos lentos processos naturais de mineralização de metais, uma remoção mais efetiva ocorre quando o metal se torna concentrado, permitindo que o mesmo possa ser reprocessado, reutilizado (Volesky & Holan, 1995).

Brocchi & Jena (2002), afirmam que o desenvolvimento de processos ambientalmente adequados para o tratamento e disposição dos resíduos sólidos provenientes de várias indústrias e a minimização de sua geração, fazem parte dos esforços mundiais que visam o tratamento de resíduos industriais.

Neste contexto, o tratamento biológico com aplicação de fungos nos resíduos sólidos provenientes das indústrias metalúrgicas, pode se constituir em uma alternativa economicamente viável tanto para recuperação de áreas contaminadas, como para recuperação de bens metálicos (Kreiton *et al*., 1993).

De acordo com Andersson & Henrysson (1996) a utilização de fungos da podridão branca como *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* em solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos, indicam que estes organismos são úteis para processos de biorremediação que involvam poluentes com baixa biodisponibilidade.

3.2 Microrganismos: detoxificação de resíduos sólidos industriais e biosorção de metais

Compostos orgânicos tóxicos podem ser degradados a CO_2, água e sais por meios biológicos e químicos. Por outro lado, metais são permanentes e o meio de diminuir sua toxicidade é pela mudança de seus estados químicos ou físicos por meio de reações de oxidação/redução, solubilização, precipitação, entre outros (Celaya *et al*., 2000).

Uma das técnicas promissoras para remoção de metais é a que utiliza organismos vivos ou não-vivos e seus derivativos. Deste modo, uma ampla variedade de microrganismos é capaz de seqüestrar, mesmo em baixas concentrações, íons metálicos de soluções aquosas (Sheng *et al*., 2004).

Certos tipos de biomassa podem reter quantidades relativamente altas de metais por meio de processos passivos como biosorção, o qual é dependente da afinidade entre as espécies metálicas ou suas formas iônicas e os sítios de ligação da estrutura molecular das paredes das células. O processo é relativamente rápido e o fato de que é um fenômeno de superfície facilita a remoção do metal e o subseqüente uso do material como biosorbente, podendo a operação ser realizada mesmo quando a célula se encontra metabolicamente inativa ou morta (Celaya *et al.,* 2000).

Segundo Luna *et al*. (2005) a biosorção baseia-se na capacidade dos materiais biológicos de acumular metais pesados a partir de efluentes, ativamente ou por

mecanismos físico-químicos de sorção. O acúmulo de metais pesados por microrganismos é geralmente bifásico: uma rápida ligação com a superfície da célula, independente do metabolismo, é seguida de um acúmulo intracelular dependente do metabolismo e com gasto de energia. Neste acúmulo não dependente do metabolismo (biosorção), os cátions podem ser depositados na membrana via adsorção, precipitação orgânica ou ficarem adsorvidos a grupos aniônicos fixos, presentes na membrana da célula. O acúmulo independente do metabolismo é seguido de outro, dependente do metabolismo (biacumulação). Neste, os cátions são transportados através da membrana celular, provavelmente por proteínas de transporte, até o citosol, ondem ficam ligado a metaloproteínas.

Em procariontes foi constatado que há a existência de mecanismos que são sensores dos metais e que apresentam características comuns como: funcionam como homo-oligomeros; a principal determinante da seletividade de um íon metálico com a proteína de uma certa família, é ditada pela coordenação geométrica do metal quelado, gerenciado por mecanismos de ligação alostérica em proteínas que atuam como sensores de metais (Pennella & Giedroc, 2005).

Pesquisas sobre a acumulação de metal por microrganismos, têm recebido atenção especial principalmente por sua potencial aplicação na detoxificação e recuperação de resíduos industriais. A biosorção de metais pesados como Cu, Zn, Cd, Pb, Fe, Ag, Ni, Th, Ra e U, por biomassa microbiana, tem sido observada para várias espécies de microrganismos incluindo fungos filamentosos como *Aspergillus niger, Rhizopus oryzae*, leveduras como *Saccharomycxes cerevisae*, algas como *Chlorella vulgaris* e bactérias como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Jain *et al*., 1989).

Segundo Zetic *et al.* (2001), os íons de metais podem ser acumulados por fungos mesmo em baixas concentrações externas e as leveduras têm várias propriedades que podem levar a um aumento da resistência a metais tóxicos. Já Volesky & Holan (1995) relatam que em trabalhos realizados com preparações de parede celular pura de *Bacillus subtilis*, a parede celular microbiana pode remover e reter íons de elementos de alto número atômico, tais como metais radioativos como urânio e tório.

Em estudos realizados por Celaya *et al*. (2000) com *Thiobacillus ferroxidans*, foi observado que a máxima biosorção de perclorato de zinco hexahidratado foi de 9,7 mg Zn (II)/g de biosorbente seco, quando foi empregada biomassa sem pré-tratamento. Estes valores chegaram a capacidade máxima de 82,61 mg de Zn (II)/g de biosorvente seco, quando a biomassa foi pré-tratada quimicamente com 0,075M de NaOH. O pré-tratamento físico ou químico da biomassa tem efeitos positivos na capacidade de biosorção de metais. Este efeito pode ser devido a uma troca de permeabilidade na parede celular, no caso de bioacumulação. Isto pode ocorrer devido ao aumento da disponibilidade de sítios de ligação ou a remoção de polissacarídeos que bloqueiam o acesso a estes sítios de ligação. Como o processo de biosorção ocorre rapidamente, pode se dizer que este é um fenômeno de superfície.

No entanto, segundo Dias *et al*. (2002) os fungos filamentosos parecem ser mais adequados para estes propósitos do que os demais microrganismos, pela sua alta tolerância a metais, capacidade de união à parede celular e absorção intracelular do metal. Fungos podem acumular metal por mecanismos físico-químicos e biológicos, incluindo ligação extracelular por metabólitos e polímeros.

Fungos apresentam a habilidade de acumular metais mesmo quando estes se encontram externamente em baixas concentrações. A capacidade de bioabsorção de íons de

metais pela biomassa fúngica está diretamente relacionada ao número de grupos presentes na parede fúngica (carbonil, amina, hidroxil, fosfato) capazes de ligar-se aos íons metálicos. Por sua vez, a eficiência da translocação de metais para o corpo de frutificação do fungo depende da espécie de fungo envolvida, solubilidade do metal e condições ambientais como pH, temperatura, aeração e inibidores metabólicos (Deng & Ting, 2005a).

Existem várias pesquisas documentando a habilidade dos fungos da podridão branca como os do gênero *Pleurotus* sp., de remediar solos contaminados e de reduzir a toxicidade de diferentes tipos de resíduos sólidos (McFarland & Qiu, 1995**;** Bogan *et al*., 1996). Segundo Andersson & Henrysson (1996), há a possibilidade da ocorrência da biorremediação realizada por fungos da podridão branca em sinergia com bactérias, em situações que envolvam a degradação hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes em solos contaminados.

Acredita-se que quando há a incorporação covalente dos materiais poluentes como hidrocarbonetos, na matéria orgânica do solo, presumivelmente ocorre a copolimerização do poluente e/ou sua degradação em produtos e precursores orgânicos de ácidos húmicos, catalisados pelas enzimas extracelulares dos fungos da podridão branca (Burgos *et al*., 1996). Estes aspectos têm sido demonstrados para pentaclorofenol (Rüttiman-Johnson & Lamar, 1996), outros clorofenóis (Sarkar *et al*., 1998) e certos herbicidas (Min *et al*., 2001). A formação de resíduos polimerizados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) por fungos da podridão branca, também tem sido demonstradas em misturas de areia e palha colonizadas por fungos (Wolter *et al*., 1997).

Os estudos de tratamento utilizando fungos envolvem inoculação no local contaminado de uma linhagem selecionada, seguida da adição de nutrientes (se

necessário), irrigação e aeração para fornecer condições ótimas de crescimento fúngico. A mistura poderá ser realizada com equipamentos ou '*in situ'* pela colocação e mistura do inóculo no local contaminado (Kreiton *et al*., 1993). Como resultado da atividade fúngica, os componentes tóxicos podem ser transformados tornando-se biologicamente inativos e assim não apresentarão problemas de toxicidade (Rama *et al*., 2001).

Segundo Lestan & Lamar (1996) os fungos podem ser colocados no solo via vários substratos orgânicos como pedaços de madeira, misturas granulares de vermiculita, grãos de cereais e esferas de alginato. Estes substratos devem conter uma reserva de nutrientes para sustentar a colonização fúngica no resíduo sólido contaminado. Em caso de inóculo fúngico com baixo potencial de colonização, faz-se necessária aplicação de taxas de inóculo na ordem de 10% a 40% (peso seco) em relação ao peso seco da amostra sólida.

Estudos feitos por Jain *et al*. (1989) utilizando soluções contendo diferentes concentrações de Mn, Zn, Cu, Ni, Fe, Co, Cd, Pb adicionadas ao meio de cultivo de *P. sajor-caju*, indicaram que a concentração de metais nos corpos de frutificação do fungo foi aumentada quando meios de cultivo apresentaram um conteúdo de metal alto, o que indicou a translocação de metais pesados do meio de cultivo para os corpos de frutificação. Relatam também que quanto maior a quantidade de um determinado metal no meio de cultivo, maior foi a translocação para o corpo de frutificação do referido metal.

De qualquer maneira, a efetividade do processo depende da capacidade de sobrevivência e da atividade do microrganismo aplicado no meio sólido (Lestan & Lamar, 1996). Purkayastha *et al*. (1994) afirmam que uma menor ou maior absorção de metais por um fungo dependerá da permeabilidade e sensibilidade da membrana da célula do organismo estudado. Em seus estudos observaram elevada absorção de Pb^{+2} pelo micélio de *P. sajor-caju*, associada a uma redução do conteúdo de proteína do fungo, relacionando

a este fato a ligação de Pb^{+2} a várias enzimas, o que poderia interferir na síntese de proteínas realizada pelo fungo.

A oxidação de Cr^{+3} a Cr^{+6} tem sido demonstrada ocorrer em solos, mas requer a presença de manganês de alta valência no solo, como um aceptor de elétrons para a ocorrência da reação. A absorção de Cr^{+6} em meio sólido ocorre tipicamente com componentes de carga positiva tais como ferro e óxidos de alumínio (Bolan *et al*., 2003).

Ramana & Sastry (1994) observaram que a toxicidade exercida por alguns metais para diversas bactérias pode ter seus efeitos revertidos se Mg^{+2} bem como Fe^{+3} estiverem presentes no meio de cultivo. A adição de Fe^{+3} leva a um aumento da síntese do centro heme, beneficiando primariamente o Mg^{+2} pela supressão da absorção do íon de metal tóxico. Por outro lado, com relação ao Cr^{+6}, adicionado ao meio de cultivo de *Neurospora crassa*, foi observada a inibição do crescimento que não foi revertida pela adição de Fe^{+3} (2mM/10mg peso seco) mesmo quando associado à concentração de 4mM/10mg de peso seco, de outros íons de metais fisiologicamente importantes tais como Mg^{+2}, Ca^{+2}, Mn^{+2} e Zn^{+2}. No entanto a adição de sulfato de ferro III em excesso (80 mM/10mg de peso seco) foi hábil em reverter a inibição do crescimento.

Em procariontes a homeostase do íon metálico é regulada pela transcrição de genes que codificam proteínas responsáveis pela detoxificação, sequestro, efluxo e absorção de metais. Estas proteínas sensíveis a metal ligam um amplo espectro de íons metálicos específicos, diretamente e por sua vez, regula alostericamente o aumento ou decréscimo da afinidade da ligação do metal à proteína (Pennella & Giedroc, 2005).

Segundo Dias *et al.* (2002) a bioacumulação de metais por fungos é um processo lento, mas eficaz, em comparação aos processos que envolvem resinas de troca iônica, carvão ativado e óxidos metálicos. Para a efetividade do processo e aplicações com

propósitos industriais a imobilização da biomassa fúngica pode ser essencial para manutenção da atividade celular em um ambiente tóxico.

No entanto, segundo Rama *et al*. (2001), o sucesso de um procedimento de biorremediação depende do desenvolvimento de microrganismos inoculados no solo e da expressão das enzimas degradativas. Os fatores abióticos (tipo de solo, pH, toxicidade química...) e biológicos (competição, predação...) também desempenham um papel crítico na determinação da colonização microbiana ou fúngica. No caso de fungos, a presença de um inóculo denso e ativo suplanta alguns destes problemas.

Os mecanismos envolvidos na tolerância de fungos ectomicorrizos a um ambiente com excesso de metaisl incluem a quelação extracelular que reduz a entrada de metais no citosol; a quelação de metais no citosol por ligantes como glutationa e metalotioneínas, bem como o aumento do efluxo de metais do citosol, representam mecanismos chaves na tolerância a metais. Estes mecanismos parecem ser comuns espécies de fungos que não são ectomicorrizos, indicando mecanismos de tolerância comuns a diferentes tipos de fungos (Bellion *et al*., 2006).

3.3. Características gerais de *Pleurotus* sp. e sua capacidade de biosorção de metais

Acredita-se que existam cerca de 200.000 espécies diferentes de fungos distribuídos na natureza. Entre estas espécies, vários basidiomicetes têm sido empregados na produção de corpos de frutificação (Bononi *et al*., 1999). O gênero *Pleurotus* sp., comumente conhecido como ‘cogumelo ostra’, está classificado na classe dos basidiomicetes, ordem Agaricales e família Polyporaceae (Putzke & Putzke, 2002).

Segundo Cohen *et al*. (2001) muitos compostos foram isolados dos corpos de frutificação de basidiomicetes, inclusive de *Pleurotus* sp. sendo constatadas as propriedades medicinais de várias substâncias, como β-D-glucano com atividade antioxidante, antitumoral e antibacteriana.

Os basidiomicetes do gênero *Pleurotus* sp. têm sido estudados desde a década de 90, como uma alternativa para os tratamentos de biorremediação (Barr & Aust, 1994).

Entre os basidiomicetes, *Pleurotus sajor-caju* e *Phanerochaete chrysosporium* têm sido propostos como microrganismos com potencial para serem utilizados em bioprocessos como a remoção de cor de efluentes industriais (Chagas & Durrant, 2001), além de exibirem potencialmente melhor crescimento em solos contaminados com pentaclorofenol e hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (Cohen *et al*., 2001). Devido à ação das suas enzimas lignolíticas eles também apresentam a habilidade de metabolizar e degradar fenóis clorados, dioxinas, pesticidas, dicloroanilinas e corantes (Paszczynski *et al*., 1992).

As enzimas lignolíticas mais importantes, secretadas por *Pleurotus* sp. são as fenol-oxidases lacases e manganês peroxidases (MnP). A MnP é considerada uma enzima chave na lignólise realizada pelos fungos da podridão branca (Sasaki *et al*., 2001), sendo responsável pela oxidação de muitos compostos fenólicos.

Lacases e manganês peroxidases são enzimas amplamente distribuídas em plantas superiores e fungos (Thurston, 1994), sendo que lacases tem recebido atenção particular pela sua habilidade de causar a oxidação de um amplo espectro de moléculas contendo anéis aromáticos. Sua baixa especificidade faz de lacases uma promissora ferramenta na transformação de muitos compostos fenólicos e não-fenólicos tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Collins *et al*., 1996; Majcherczyk *et al*., 1998.)

Alguns fungos secretam lacases para remover tanto fenóis potencialmente tóxicos liberados durante a degradação da lignina, como para metabolizar toxinas produzidas por outros organismos. Como conseqüência, a enzima tem aplicação potencial na remoção de corantes, na indústria têxtil ou de papel, bem como na degradação de vários xenobióticos, que são reconhecidos como poluentes ambientais (Rama *et al*., 1998, Jolivalt *et al*. 1999, Mougin *et al*., 2000). Recentemente, sugeriu-se que as lacases também podem oxidar compostos não-fenólicos da lignina na presença de um radical mediador apropriado (Min *et al*., 2001).

A MnP é considerada uma enzima chave na lignólise realizada pelos fungos da podridão branca (Sasaki *et al*., 2001). As MnP utilizam o peróxido de hidrogênio para promover a oxidação dos compostos químicos pela retirada de um elétron, com a formação de radicais livres; elas oxidam preferencialmente Mn^{+2} para Mn^{+3} na presença de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos quelantes como ácido láctico (Sundaramoorthy *et al*., 1994), sendo que o Mn^{+3} é responsável pela oxidação de muitos compostos fenólicos.

A MnP tem sido amplamente estudada em anos recentes, pois a maioria dos fungos da degradação branca, não produzem LiP (Cohen *et al*., 2001). De acordo com Zadrazil & Puniya (1995), fungos como *P. sajor-caju e L. edodes*, apresentam níveis de atividade de manganês peroxidases (MnP) variáveis em relação à concentração de nitrogênio. Este aspecto pode ser explicado em parte, pela habilidade dos dois fungos de crescerem em diferentes resíduos lignocelulósicos.

Em relação à absorção de metais pesados, outras observações feitas por Bano & Rajarathnam (1988) indicam que *P. sajor-caju*, juntamente com *P. flabellatus*, quando comparados a outros basidiomicetes do gênero *Pleurotus* sp. são os melhores coletores de metais pesados e também apresentam altas taxas de degradação do meio. Isto leva à

conclusão de que a mobilização de metais pesados do meio e a subseqüente transferência para corpos de frutificação estão relacionadas ao grau de degradação do meio.

Deste modo, a inoculação de *Pleurotus* sp. em resíduos industriais é mais uma possibilidade de aplicação dos fungos de podridão branca, na medida em que eles têm habilidade de metabolizar hidrocarbonetos poliaromáticos, bifeniles, pentaclorofenóis e outros aromáticos clorados (Cripps *et al.*, 1990), o que torna possível a sua utilização para descontaminação tantos de efluentes como de resíduos sólidos (Zadrazil & Puniya, 1995).

3.4 **Enzimas de *Pleurotus sajor-caju*: produção e aplicações**

Os fungos da podridão branca (basidiomicetes) desempenham um importante papel na degradação da lignina, sendo este processo catalisado por enzimas lignolíticas as quais são hábeis em clivar oxidativamente os anéis aromáticos da estrutura deste polímero natural. Manganês peroxidases (MnP) e lacases de basidiomicetes são as mais importantes entre as enzimas lignolíticas e são também hábeis em degradar polímeros aromáticos e xenobióticos persistentes como poluentes ambientais (Scheel *et al.,* 2000).

Segundo Mougin *et al*. (2002) as enzimas fúngicas apresentam um amplo alcance da ação, que inclui a sua utilização tanto na remoção de xenobióticos em efluentes líquidos como na aplicação em resíduos sólidos e biorremediação de solos, podendo ser usadas como biomarcadores para avaliação da contaminação ambiental.

Couto & Herrera (2006) afirmam que lacases e MnP apresentam aplicações em diversos processos biotecnológicos que incluem desde a detoxificação de efluentes da indústria papeleira, têxtil e petroquímica, até seu uso como ferramentas para diagnóstico médico, agentes de biorremediação, como catalisadores para manufatura de medicamentos

anti-câncer e mesmo como ingredientes em cosméticos. No entanto, os altos custos e a fácil inativação enzimática, restringem economicamente o emprego das mesmas. Deste modo, Rogalski *et al.* (2006) afirmam que se faz necessário estudar os fatores de cultivo e de meio ambiente que influenciam a atividade enzimática, para melhorar a produtividade do processo e assim obter alternativas para a produção das enzimas lignolíticas extracelulares em escala industrial.

Estudos realizados por Galhaup & Haltrich (2001) com o basidiomicete *Trametes pubescens* MB 89, indicaram que a suplementação de cobre durante a fase exponencial de crescimento promove o efeito máximo na atividade de lacases, no entanto, a adição de cobre durante a fase estacionária, na qual a enzima já está formada, resultou em uma redução da produtividade de lacases.

Ogel *et al*. (2006) obtiveram melhor produção de lacases em cultivo líquido quando foi adicionado ao meio de crescimento 160 mM de $CuSO_4$ .5 H_2O e 3 mM de ácido gálico. A atividade enzimática também foi aumentada pela presença de bromido cetiltrimetilamônio (CTAB), polivinilpirrolidona (PVP), pela presença do solvente orgânico dimetil sulfóxido (DMSO) e etanol.

Quanto à produção de lacases do fungo basidiomicete *Trametes trogii* 201, submetido a diferentes condições de crescimento, Colao *et al.* (2003) constataram que a expressão do gene lcc1 para lacases foi aumentada pela adição de nitrogênio orgânico ao meio. O nível de transcrição do gene foi ainda maior quando o meio sintético foi suplementado com extrato de levedura, quando comparado aos meios nos quais foram adicionadas peptona ou triptona.

A adição de álcool veratrílico como indutor enzimático foi testada por Mansur *et al*. (1997), que constataram aumento na produção de lacases do basidiomicete I-62, de até 10

vezes em relação ao meio sem adição. O uso de frutose em substituição à glicose como fonte de carbono, resultou em aumento de 100 vezes na atividade específica de lacases.

Compostos aromáticos e manganês também têm sido indicados como indutores ou mediadores das enzimas lignolíticas. A suplementação de um meio de crescimento com Mn^{+2}, álcool veratrílico ou derivados de ácidos húmicos, origina melhora significante na atividade das enzimas extracelulares (Scheel *et al*., 2000).

No que se refere à produção de MnP, esta pode ser melhorada pela presença de íons de Mn^{+2}, em culturas líquidas (Steffen *et al*., 2002). Dombrovs'ka & Kostyshyn (1999) indicam que além de íons de Mn^{+2}, ácido vanílico e compostos aromáticos podem induzir a produção de MnP por *Pleurotus floridae* em cultura líquida. Cohen *et al*. (2001) ressaltam a importância dos íons Mn^{+2} também em cultivos sólidos, pois observaram que a adição de Mn^{+2} é fundamental para a degradação da lignina em diferentes condições nutricionais e de crescimento, sendo indispensáveis para a produção de MnP em *Pleurotus ostreatus*, cultivados em meio sólido.

A presença de peptona no meio de cultivo do basidiomicete *Nematoloma frowardii*, é um fator que também afeta positivamente a produção de isoenzimas de MnP em meio líquido, bem como a presença de glicose ($16g.L^{-1}$), Mn^{2+}(2mM) e baixa quantidade de nitrogênio (1,36 mM de N adicionado como tartarato de amônio). Nestas condições, a produtividade enzimática das células imobilizadas de N. *frowardii*, foi 1,4 vezes mais alta do que a obtida sem a imobilização fúngica, o que indica a viabilidade da aplicação de técnicas de imobilização como alternativa complementar para obtenção de maior quantidade de enzimas, associada à possibilidade de reutilização do micélio imobilizado (Rogalski *et al.*, 2006).

Ziegenhagen & Hofrichter (2000) aplicaram a imobilização do basidiomicete *Clitocybula dusenii* em celulose e polipropileno como carreadores do micélio fúngico. Com este procedimento, conseguiram obter altas quantidades de MnP em cultivo líquido (acima de 3.000 $U.L^{-1}$), com a recuperação da biomassa e sua utilização em etapas posteriores de produção, tornando economicamente mais viável a obtenção desta enzima.

Os fungos basidiomicetes do gênero *Pleurotus* sp., são amplamente empregados em estudos que envolvem a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, antracenos e benzopirenos (Anderson & Henrysson, 1996) , no entanto, poucos estudos tem sido realizados até o presente momento, a respeito da possibilidade do emprego de fungos como *P. sajor-caju* na biosorção de metais, tanto em solos como em meio líquido.

Neste contexto, a presente tese pretendeu contribuir para elucidação de alguns dos mecanismos que envolvem a aplicação de *P. sajor-caju* e suas enzimas em bioprocessos de remoção de metais presentes em solos e/ou efluentes contaminados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para que a compreensão do item ‘Material e Métodos’ ocorra de uma forma mais fácil e eficaz, optou-se por dividir este item nos seguintes subitens:

– Fungo, meios de manutenção e meios de cultivo básicos.

Neste subitem será abordada a característica da linhagem do fungo utilizado, bem como os meios de manutenção da linhagem e os meios de cultivo básicos, indispensáveis para a execução de qualquer ensaio que vise a obtenção do fungo, tanto em cultivos líquidos como em cultivos sólidos.

– Procedimentos experimentais para realização dos diferentes estudos de crescimento e da capacidade de biosorção do fungo cultivado em meio líquido perante a adição das soluções de sais de metais;

Este subitem enfocará a metodologia utilizada para realização dos diferentes ensaios em cultivo líquido, dos quais inicialmente será coletada a massa micelial para quantificar o crescimento fúngico e posteriormente para a obtenção e preparação de amostras para quantificação da biosorção micelial.

– Procedimentos experimentais para medidas de pH durante o desenvolvimento fúngico em meio líquido, perante a adição das soluções de sais de metais;

Este subitem abordará os procedimentos executados para a determinação do pH, durante o desenvolvimento fúngico em meio líquido, nos diferentes tipos de ensaios realizados.

– Procedimentos experimentais para estudos da biosorção do fungo crescido em meio sólido, perante a adição das soluções de sais de metais;

Este subitem enfocará a metodologia utilizada para realização dos diferentes ensaios em cultivo sólido, para a coleta dos corpos de frutificação e para a preparação das amostras obtidas no cultivo sólido.

– Procedimentos experimentais para estudos da extração enzimática do fungo crescido em meio sólido, perante a adição das soluções de sais de metais;

Este subitem descreverá os procedimentos experimentais executados para a determinação das enzimas lacases e manganês peroxidases, durante o crescimento fúngico em meio sólido.

– Metodologia para determinação e quantificação de elementos químicos presentes no fungo, nos diferentes tipos de ensaios realizados.

Enfoca a metodologia PIXE, empregada para a quantificação da biosorção encontrada nas amostras obtidas dos diferentes ensaios realizados.

– Análises estatísticas.

Indica os métodos estatísticos selecionados para avaliação dos dados obtidos no crescimento micelial e na produção das enzimas lacases e manganês peroxidases.

4.1 Fungo, meios de manutenção e meios de cultivo básicos

Fungo

Linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju* da coleção de microrganismos da Divisão de Processos Biotecnológicos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, proveniente da empresa Brasmicel Ltda (Nova Poá - São Paulo). Esta linhagem é empregada na produção comercial de corpos de frutificação.

Meio de manutenção (SPA)

Meios de manutenção formulado com 2% (m/v) de serragem de *Pinus* spp, 2% (m/v) de farelo de trigo moídos e intumescidos em água destilada, 0,2% (m/v) de carbonato de cálcio e 2% (m/v) de ágar-ágar. Posteriormente o meio foi autoclavado a 120°C e 1 atm, por 30 minutos.

Crescimento e manutenção de linhagens

Cultivos das linhagens foram desenvolvidos em tubos inclinados contendo o meio SPA, a 25ºC, durante 14 dias, e para manutenção da linhagem foram armazenados a 4°C e transferidos a cada 6 meses.

Meio para a produção de micélio em cultivo líquido (MCL)

Para a produção de micélio em cultivo líquido foi utilizado o meio MCL, baseado em Mandels & Reese (1957), contendo 1% de glicose. A solução 10 vezes concentrada consistiu da seguinte composição ($g.L^{-1}$): K_2HPO_4, 20; $(NH_4)_2SO_4$, 14; uréia, 3; $MgSO_4$, 3; $CaCl_2$, 4; $FeSO_4.7H_2O$, 0,05; $MnSO_4$, 0,0156; $ZnSO_4$, 0,014; $CoCl_2$, 0,02.

Preparação do inóculo para cultivo no estado sólido

Como inóculo, foram utilizadas colônias de oito dias, desenvolvidas em placas de Petri contendo o meio SPA, iniciadas a partir de um disco de ágar colonizado de 8mm de diâmetro, disposto no centro da placa.

Figura 1. Placa de Petri contendo colônias de *Pleurotus sajor-caju* com 8 dias de desenvolvimento.

Meio para cultivo sólido (MCS)

O meio utilizado para o cultivo sólido foi preparado com 94% (m/m) de serragem de *Pinus* spp, acrescida de 5% (m/m) de farelo de trigo e 1% (m/m) de carbonato de cálcio, como descrito por Tan & Wahab (1997). Sacos de polipropileno (fermentadores) com dimensões de 15,5 x 25 cm, foram utilizados para o crescimento fúngico e cada saco continha 100g (peso seco) do meio de cultivo. Para manutenção do teor de umidade em valores próximos a 66%, condições consideradas ideais para o desenvolvimento fúngico, foi acrescentada água destilada. Posteriormente os meios foram esterilizados por autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante duas horas (Silva, 2004).

Figura 2. Meio de cultivo sólido antes da inoculação de *Pleurotus sajor-caju.*

4.2 Procedimentos experimentais para realização dos estudos de crescimento e capacidade de biosorção do fungo cultivado em meio líquido perante a adição das soluções de sais de metais

Crescimento em cultivo líquido na presença de metais

Para o cultivo líquido na presença de metais foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio MCL. Como inóculo foi utilizado o micélio crescido na superfície de uma placa de Petri contendo o meio SPA. Este foi desprendido da superfície da placa por raspagem com alça de platina e ressuspenso em 5mL de água destilada e esterilizada. As sextuplicatas dos frascos correspondentes a cada tipo de tratamento foram mantidas a 28ºC em agitação orbital (180 rpm), sendo realizada a coleta do total da massa micelial obtida no 7º dia, 14º e 21º dia de desenvolvimento. Com relação aos frascos controle (sem adição de metais), utilizou-se o mesmo procedimento sendo a massa micelial coletada no mesmo período de desenvolvimento dos demais frascos.

As amostras coletadas foram utilizadas para determinação da biosorção de metais, pela metodologia PIXE , descrita no item 4.6 dessa seção.

Adição de metais ao cultivo líquido

As soluções concentradas de metais utilizadas para as adições nos frascos contendo 100 mL de meio MCL foram constituídas de sulfato de cobre II ($CuSO_4.5H_2O$), sulfato de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$), sulfato de ferro II ($FeSO_4.7H_2O$), sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3.8\ H_2O$), procedentes dos Laboratórios Sigma e sulfato de cromo III ($Cr_2(SO_4)_3\ .xH_2O$) e sulfato de níquel II ($NiSO_4.6\ H_2O$), procedentes dos Laboratórios Merck. Foram pesadas 30mg de cada sal a ser testado e diluídas nos 100mL do meio MCL. Cada adição correspondeu a um tratamento diferente que foi adicionado ao meio MCL, imediatamente após a realização do inóculo.

Foram testadas também soluções nas quais todos os sais, a constar: sulfato de cobre II, sulfato de zinco, sulfato de ferro II, sulfato de alumínio, sulfato de cromo III e sulfato de níquel II, foram mesclados em uma solução única e adicionados ao meio de cultivo, imediatamente após o inóculo fúngico. Para realização deste ensaio foram pesadas 5,0mg de cada sal, totalizando 30mg de sais adicionados aos 100mL do meio MCL, sendo este ensaio denominado ‘Td1’.

Para a realização do ensaio denominado ‘Td2’, foi adotado o mesmo procedimento do ensaio todos, com exceção de que foram pesados 10mg de cada sal, totalizando 60mg de sais adicionados aos 100mL do meio MCL. Este ensaio foi realizado com o objetivo de determinar o crescimento e secreção enzimática na presença de concentrações duas vezes superior a empregada no ensaio denominado ‘Td1’.

Adicionalmente, para verificar-se o comportamento fúngico perante a adição das soluções de metais, em um período de tempo correspondente a 7 dias após a realização do

inóculo, novos testes foram realizados utilizando o meio de cultivo líquido. Nestes testes, soluções de 30mg.100mL^{-1} dos sais sulfato de cobre II, sulfato de alumínio, sulfato de ferro II e sulfato de zinco, foram adicionados separadamente, em cada ensaio, quando o período de desenvolvimento fúngico correspondia a 7 dias de cultivo.

Determinação da massa seca em cultivos líquidos

Para determinação do crescimento fúngico em cultivo líquido, foram feitos cultivos específicos para esta finalidade, em triplicatas. A massa micelial obtida dos frascos em triplicatas, foi separada por filtração e lavada com água destilada. Após lavagem, foi seca em estufa a 70ºC, até o peso manter-se constante. Os dados obtidos relativos ao peso seco da massa micelial foram utilizados para determinação do crescimento fúngico.

Quantificação de metais presentes no micélio obtido dos cultivos líquidos

O micélio obtido dos cultivos líquidos nos quais ocorreram as adições das distintas soluções de metais e do controle (sem adição de metais) foram submetidos à análise por PIXE (Particle–Induced X-Ray Emission). Para a realização da análise, o total da massa micelial seca coletada das sextuplicatas obtidas nos 7º, 14º e 21º dias de desenvolvimento, foram separadas por filtração, lavadas com água destilada e misturadas de acordo com os respectivos tratamentos. Posteriormente, foram acondicionadas em placas de Petri e encaminhadas a estufa, a uma temperatura de 70ºC, até obtenção do peso constante. Depois da secagem, as amostras foram maceradas em cadinho de porcelana, com a utilização de nitrogênio líquido, e encaminhadas à análise por PIXE (descrita no item 4.6 dessa seção), para determinação da concentração elementar presente nas amostras.

4.3 Procedimentos experimentais para medidas de pH durante o desenvolvimento fúngico em meio líquido, perante a adição das soluções de sais de metais

Para determinação da variação do pH durante o desenvolvimento fúngico em meio líquido, foram retiradas alíquotas de 5mL do meio MCL, em quadruplicatas, dos diferentes ensaios realizados. As amostras foram retiradas no tempo zero, imediatamente após a adição ao meio MCL da solução do metal a ser estudado e, posteriormente, no 7º, 14º e 21º dias de cultivo. No caso dos frascos controle, o tempo zero correspondeu à retirada de amostras do meio MCL, momentos antes da adição do inóculo fúngico. Para todas as determinações de pH, utilizou-se o pH-metro digital da marca Orion, modelo 920A.

4.4 Procedimentos experimentais para estudos da capacidade de biosorção de *Pleurotus sajor-caju* crescido em meio sólido, perante a adição das soluções de sais de metais

Cultivos em estado sólido

Os sistemas de cultivo contendo os diferentes tratamentos foram constituídos de seis sacos de polipropileno para cada tratamento, preenchidos com meio MCS. Estes, após autoclavagem, foram inoculados pela disposição de um disco de 1,5 cm de diâmetro, retirados com cilindro de vidro, a partir da extremidade de placas preparadas para inóculo.

Os sacos de polipropileno contendo os meios foram inoculados e mantidos à temperatura de 28°C, para o desenvolvimento micelial, durante 21 dias. Após esse período foram levados à estufa, à 25ºC, para crescimento. As amostras em sextuplicatas foram coletadas para análises de determinação das enzimas lacases e manganês peroxidases. Os

corpos de frutificação obtidos, foram coletados e utilizados para análises de biosorção de metais.

Adição de metais ao MCS

Em uma etapa inical de estudos**,** aos sacos de cultivos contendo o MCS, adicionaram-se soluções de sulfato de cobre II ($CuSO_4.5H_2O$), sulfato de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$), sulfato de ferro II ($FeSO_4.7H_2O$) e sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3.8H_2O$). Para as adições ao meio sólido foram pesadas 30mg de cada sal a ser testado, e estas após diluição em 100mL de água destilada, foram adicionadas as 100g do MCS.

Em uma etapa posterior dos estudos foram realizados novos cultivos nos quais foram testados, isoladamente, sulfato de cromo III ($Cr_2(SO_4)_3.x\ H_2O$) e sulfato níquel II ($NiSO_4.6\ H_2O$) em concentrações de $30mg.100g^{-1}$, para cada sal estudado. A solução de metais adicionada contribuiu para a manutenção da umidade necessária para o desenvolvimento fúngico. Outros dois testes foram realizados, um deles denominado 'Td1' nos quais todos os sais foram adicionados em concentrações de 5 mg de cada sal, constituindo uma única solução com 30mg adicionadas aos 100mL de água destilada, adicionada as 100g do meio MCS; o outro teste foi denominado 'Td2' nos quais 10mg de cada sal foi adicionada aos 100mL de água destilada e agregado as 100g do meio MCS, totalizando uma concentração final de $60mg.100g^{-1}$. Todas as soluções empregadas em todos os ensaios foram adicionadas após a autoclavagem do meio sólido.

Quantificação de metais presentes nos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*

Os corpos de frutificação obtidos do MCS ao qual foram adicionados os distintos metais, foram submetidos à análise por PIXE. Para a realização da análise, os corpos de frutificação coletados obtidos após 21º dia de desenvolvimento micelial, foram secos em

estufa à 70ºC, até peso constante. Posteriormente foram macerados com nitrogênio líquido e, encaminhados à análise por PIXE. Adicionalmente, amostras de serragem de *Pinus* spp, do MCS e dos corpos de frutificação do meio controle (sem metais), também foram submetidos aos mesmos procedimentos de extração de amostras aplicados para os corpos de frutificação dos meios com metais, e encaminhados à análise por PIXE.

4.5 Procedimentos experimentais para estudos da produção enzimática do fungo crescido em meio sólido, perante a adição das soluções de sais de metais

Preparo do extrato aquoso para análise enzimática do cultivo sólido

O conteúdo dos sacos de cultivo foi homogeneizado manualmente e duas alíquotas de 25g, de cada uma das sextuplicatas dos tratamentos aplicados, foram suspensas em 50 mL de água destilada gelada, agitadas por 30 min a 160 rpm a 5°C. Os sólidos foram removidos por filtração à vácuo, com papel filtro e o filtrado centrifugado a 5000g, 30 min. O extrato aquoso (sobrenadante) foi utilizado para as determinações de enzimas.

Determinações das atividades enzimáticas

Todas as atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais por mL ($U.mL^{-1}$), definidas como número de μmol liberado do produto por mL, por minuto, nas condições do teste.

Lacases

A atividade de lacases foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional para ABTS continha 0,45 mM do ABTS, 90 mM de tampão acetato de sódio pH 5,0, e 1 mL de amostra adequadamente diluída. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 seg a 25°C, utilizando-se $\varepsilon = 3,6 \times 10^4\ cm^{-1}.M^{-1}$ (Wolfenden & Wilson, 1982).

Manganês peroxidases

A atividade de manganês peroxidases foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistiu de 50 $\mu g.mL^{-1}$ de vermelho de fenol, 50 μM de sulfato de manganês, 50 μM de H_2O_2, 12,5 mM de lactato de sódio, 500 $\mu g.mL^{-1}$ de albumina bovina e tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de amostra. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 μL de NaOH, 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610nm), sendo considerado a absorbância zero, uma amostra com tempo zero de reação e utilizando-se $\varepsilon_{610} = 4{,}46\ 10^4\ M^{-1}cm^{-1}$.

4.6 Metodologia para determinação e quantificação de metais biosorvidos pelo fungo, nos diferentes tipos de ensaios realizados

Utilização da técnica PIXE para a determinação e quantificação de metais

Para a determinação das concentrações elementares utilizou-se a técnica PIXE (Particle–Induced X-Ray Emission) que é baseada na emissão de raios-X característicos dos elementos presentes em uma amostra quando esta é irradiada por feixes de íons carregados (prótons, partículas alfa...), sendo eficiente para análises que envolvam determinação de elementos-traço. A técnica requer íons acelerados que penetrem no material a ser estudado (Yoneama & Dias, 2004).

Neste trabalho as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-URFGS) e analisadas no acelerador Tandetron.

Para que a análise seja realizada, é necessário que as amostras estejam preparadas de maneira adequada, isto é, geralmente devem ser sólidas, homogêneas e sem rugosidades. As amostras devidamente secas e homogeneizadas foram submetidas à maceração em cadinho de porcelana, ao qual foi agregado nitrogênio líquido. Elas devem conter quantidade suficiente de material para formação de uma pastilha sólida do material a ser analisado. O produto resultante da maceração das amostras, foi prensado e transformado em finas pastilhas, que foram levadas ao acelerador Tandetron para a análise.

a

b

Fonte: Instituto de Física da UFRGS.

Figuras 3a e b: Acelerador Tandetron do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A análise quantitativa dos espectros de raios-X característicos das amostras foi realizada pelo programa GUPIX (Maxwell, 1995 apud Yoneama & Dias, 2004), desenvolvido na Universidade de Guelph (Canadá). O programa GUPIX leva em conta um amplo banco de dados que inclui todas as quantidades físicas relevantes, bem como os processos envolvidos na técnica, sendo as concentrações obtidas, expressas em partes por milhão (ppm).

A escolha da técnica PIXE para a realizaçãodas análises, é justificada pelo um amplo espectro de elementos detectáveis, que apresentam desde o número atômico 11 até o 38, além do bário e chumbo, e pela precisão dos resultados (ppm). Assim, foi possível a inclusão de elementos invisíveis e complexos que podem ser independentes ou estar estequiometricamente relacionados com elementos cujos raios-X são visíveis no espectro.Adicionalmente, poucas universidades no Brasil, a citar Universidade de São Paulo (USP) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (URFGS), dispõem do equipamento necessário a execução deste tipo de análise, o que contribui para a confiabilidade dos dados obtidos.

4.7 Análises estatísticas

Análises Estatísticas

Os dados referentes ao crescimento micelial por terem sido obtidos em triplicatas, e os dados de biosorção de metais, por seguirem as instruções de preparo de amostras requeridas pela técnica de análise empregada (PIXE), nos quais as sextuplicatas de cada tratamento são misturadas e transformadas em uma única pastilha, não foram submetidos aos testes estatísticos que requerem a determinação da normalidade de dados.

Para os ensaios envolvendo massa micelial, os dados obtidos nos tratamentos com as adições de metais, foram comparados individualmente com os dados obtidos no meio controle (sem metais), sendo para tal análise, aplicado o Teste-t de student, disponível no programa GraphPadPrism versão 3.00 da GraphPad Software Incorporation. Quando a comparação feita entre cada grupo e o controle, resulta em letras diferentes, isto significa que os grupos comparados diferem estatisticamente com um índice de precisão de 95%.

Os resultados obtidos das amostras correspondentes à secreção enzimática, foram analisados estatisticamente, sendo submetidos ao teste de normalidade Dunkey –Smirnoff disponível no programa SPSS versão14.0. Neste tipo de análise, os dados obtidos apresentaram uma distribuição normal sendo então submetidos ao Teste-t de student, disponível no programa GraphPadPrism versão 3.00 da GraphPad Software Incorporation. Tratamentos com letras iguais, obtidas em um mesmo tempo de cultivo, indicam que estes tratamentos não diferem estatisticamente, com 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento desta tese, foram realizados primeiramente estudos relativos à possibilidade de crescimento do fungo *Pleurotus sajor-caju* na presença dos sais sulfato de cobre II ($CuSO_4$. $5H_2O$), de zinco ($ZnSO_4.7H_2O$), de ferro II ($FeSO_4.7H_2O$) e de alumínio ($Al_2(SO_4)_3.8H_2O$), adicionados isoladamente em meio líquido. Constatada a possibilidade de crescimento fúngico na presença dos metais anteriormente estudados, foram realizados novos ensaios nos quais foram adicionados ao meio de cultivo líquido, os sulfatos de cromo III ($Cr_2(SO_4)_3$. x H_2O), e de níquel II ($NiSO_4.6H_2O$), além da associação de todos os metais estudados, constituíndo soluções com duas diferentes concentrações: $30mg.100mL^{-1}$ (Td1) e $60mg.100mL^{-1}$ (Td2).

Em todas as condições testadas ocorreu o crescimento fúngico, deste modo, na seqüência dos estudos, foram realizados ensaios enfocando tanto a biosorção dos metais pela massa micelial do fungo crescido em meio líquido, quanto a biosorção dos corpos de frutificação do fungo crescido em meio sólido.

Adicionalmente foram realizados ensaios nos quais objetivou-se analisar a influência do tempo de desenvolvimento fúngico em relação à capacidade de biosorção de metais pelo micélio, na presença das soluções dos sais sulfato de cobre II, de zinco, de ferro II e de alumínio, adicionados ao meio líquido, em ensaios específicos para cada sulfato a ser avaliado.

Como complementação dos estudos desenvolvidos, foram feitas as medidas para determinação da variação do pH em cultivo líquido e também a avaliação das atividades das enzimas lacases e manganês peroxidases no cultivo sólido.

Os resultados de todos os ensaios desenvolvidos são apresentados a seguir, levando em consideração a seguinte ordem de apresentação: crescimento fúngico em meio de cultivo líquido; biosorção de metais em meio de cultivo líquido; variação do pH em meio de cultivo líquido; biosorção de metais em meio de cultivo sólido; biosorção micelial perante a adição de soluções de metais ao meio de cultivo líquido, em diferentes estágios de crescimento fúngico e a análise da produção enzimática em meio de cultivo sólido.

Visto que os mecanismos envolvidos nos processos de retenção de metal pelo fungo podem ocorrer tanto independentemente do metabolismo, como envolvendo gasto energético, no presente trabalho adotou-se o termo 'biosorção' para genericamente nomear os distintos processos físico-químicos envolvidos.

5.1 Massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* em cultivo líquido com adição de metais

Analisou-se inicialmente o crescimento do fungo *P. sajor-caju* em cultivo líquido na presença dos metais cobre, zinco, ferro e alumínio na forma de sulfatos, sendo estes adicionados separadamente em cada ensaio, para possibilitar uma concentração final de 30mg do metal estudado, para cada 100mL de meio MCL. Os ensaios que enfocaram a produção da massa micelial fúngica em cultivo líquido, foram submetidos à análise estatística com a aplicação do Teste-t de student.

A Figura 4 refere-se ao desenvolvimento da massa micelial da linhagem PS 2001 de *P. sajor-caju* em 7, 14 e 21 dias de cultivo líquido, em meios nos quais foram agregados os quatro metais inicialmente selecionados. Constatou-se que em uma etapa inicial de desenvolvimento correspondente aos 7 dias de cultivo, os sais sulfato de cobre II e sulfato de alumínio promoveram um acentuado desenvolvimento micelial, em comparação ao

controle e aos meios onde os demais metais foram adicionados. A aplicação do teste-t em uma mesma etapa de desenvolvimento resultou na obtenção de letras iguais (‘a’), para os tratamentos nos quais sulfato de cobre II e sulfato de alumínio foram adicionados ao meio de cultivo indicando que estes tratamentos não diferem pelo Teste-t de student (p>0,05) e pela obtenção de letras diferentes (‘b’ e ‘c’) no controle e nos ensaios aos quais foram adicionados sulfato de zinco e sulfato de ferro II.

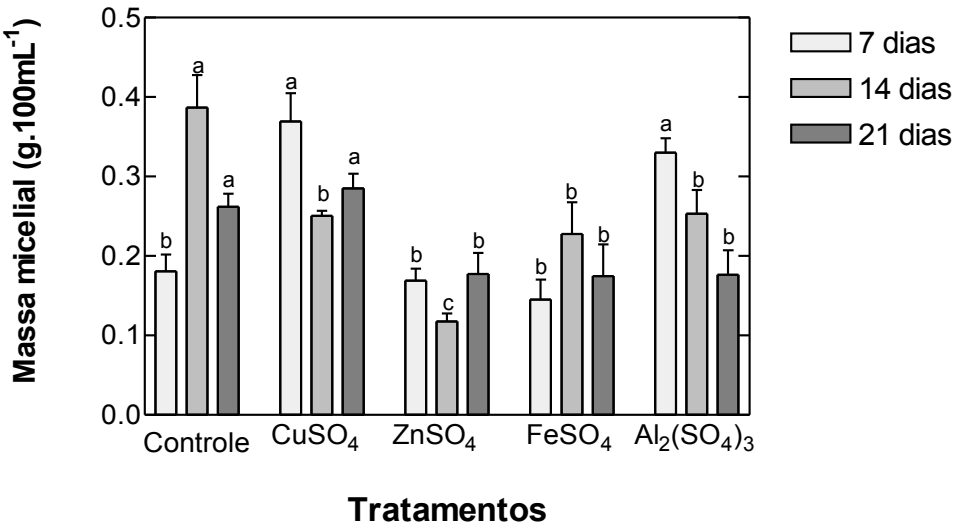


Figura 4. Massa micelial de *Pleurotus sajor-caju*, em meio de cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.
Os tratamentos que apresentam as mesmas letras no mesmo período de desenvolvimento, não diferem pelo teste t (p>0,05).

Nos dados relativos ao 14º dia de desenvolvimento observa-se um maior desenvolvimento micelial do controle em relação aos meios aonde foram adicionados os metais. O maior valor de massa no controle no 14º dia pode sugerir um crescimento tardio do controle, em relação aos meios nos quais sulfato de cobre II e sulfato de alumínio foram adicionados e nos quais a maior massa micelial foi obtida em um menor período de tempo (7 dias). Por sua vez, o decréscimo da massa nos meios com sulfato de cobre II e sulfato de

alumínio (14º dia), podem indicar que o pico da massa foi alcançado próximo aos sete dias de crescimento, ocorrendo a partir de então, a lise celular.

A obtenção de menor conteúdo de massa micelial em relação aos demais tratamentos, nos meios aos quais foi utilizado sulfato de zinco pode indicar uma inibição no crescimento causada pela adição deste sal ao meio de cultivo, principalmente se considerarmos que neste estudo *P. sajor- caju* foi submetido a uma concentração de sulfato de zinco equivalente a 300mg.L^{-1}. Este dado é corroborado por Lopez-Errasquín & Vázquez (2003), que ao estudarem o fungo *Trichoderma atroviride*, constataram uma redução de 50% do crescimento deste microrganismo na presença de 200 mg.L^{-1} de zinco no meio de cultivo.

No 21º dia de desenvolvimento, o controle e o meio de cultivo no qual sulfato de cobre II foi adicionado, apresentaram massa micelial quantitativamente maior em comparação aos meios com os demais tratamentos, no entanto, os valores de massa micelial desta etapa de desenvolvimento foram menores do que os obtidos anteriormente pelo controle (14º dia) e pelo sulfato de cobre II (7º dia). Com relação ao fungo *P. sajor-caju*, não foram encontradas na literatura observações relativas ao aumento de massa fúngica na presença de altas concentrações de metais.

Em estudos feitos com o fungo *Trichoderma atroviride* crescido em meios de cultivo líquido aos quais foi adicionado cobre, constatou-se que o microrganismo consegue sobreviver a concentrações entre 0-300mg.L^{-1} deste metal, com os níveis constantes de crescimento de biomassa, no entanto o crescimento decresce em 80% na concentração de 350mg.L^{-1} e, nenhum crescimento foi observado, na presença de 400mg.L^{-1} (Lopez-Errasquín & Vázquez, 2003).

Posteriormente novos ensaios (Figura 5), foram feitos para verificar-se o comportamento fúngico na presença de sulfato de cromo II e sulfato de níquel II. Nestes ensaios, foram pesadas 30mg do sal a ser testado e diluídas nos 100mL do MCL. Na medida em que estes metais, considerados letais mesmo em baixas concentrações para muitos microrganismos, não se mostraram tóxicos ao desenvolvimento fúngico, optou-se por realizar ensaios nos quais 5 mg de cada um dos seis metais estudados, foram mescladas e adicionadas aos 100mL que constituíam o meio MCL, chegando a uma concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio, em um ensaio denominado 'Td1'. Um outro ensaio denominado 'Td2', caracterizou-se pela adição de 10mg de cada um dos seis metais estudados nos 100mL que constituíam o meio MCL, alcançando uma concentração final correspondente a 60mg de sais em 100mL de meio de cultivo.

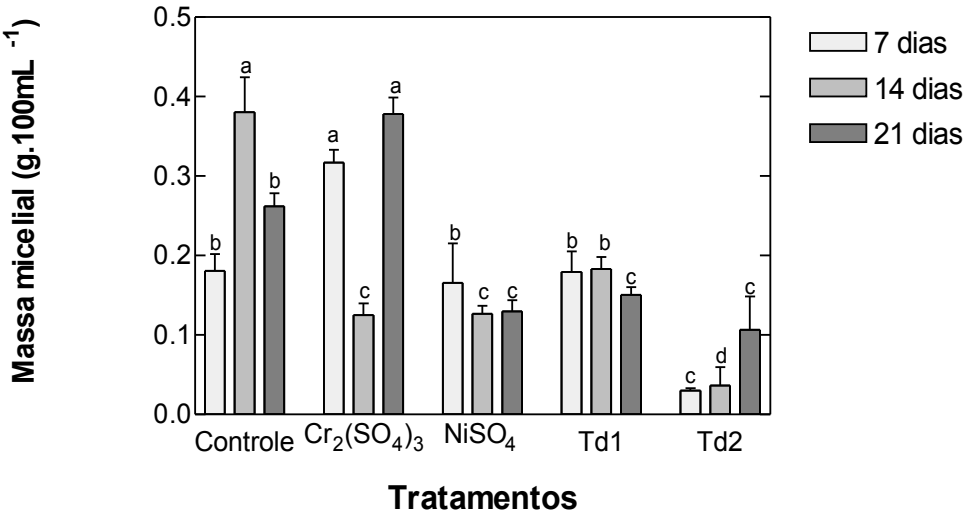


Figura 5. Massa micelial de *Pleurotus sajor-caju*, em meio de cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Td1 – Mescla de todos os sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.
Td2 – Mescla de todos os sais metálicos na concentração final de 60mg.100mL^{-1} de meio.
Demais meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.
Os tratamentos que apresentam as mesmas letras no mesmo período de desenvolvimento, não diferem pelo teste t ($p>0,05$).

A Figura 5 indica que mesmo em concentrações duplicadas em relação àquelas anteriormente empregadas, os metais apesar de restringirem o crescimento fúngico em alguns ensaios, não foram letais ao *P. sajor-caju.* Deve-se enfatizar que em meios nos quais houve a adição de cromo, nas etapas correspondentes aos 7 e 21 dias de desenvolvimento, obtiveram-se valores de massa micelial superiores àqueles encontrados no meio controle, indicando que este metal na forma de sulfato, foi promotor do crescimento fúngico.

Com relação à adição de metais, estudos realizados por Baldrian (2003), com o basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* indicaram que o crescimento da biomassa deste fungo foi limitado na presença de 50 ppm de Ni, Cd, e Pb, enquanto que na presença de Co and Cu, foi observado um decréscimo na taxa de crescimento na concentração de 150 ppm.

Santhiya & Ting (2006) em estudos realizados com o fungo *Aspergillus niger*, visando à adaptação deste fungo aos íons metálicos Ni, Mo e Al, observaram uma longa fase 'lag' (5 dias), seguida de um menor crescimento e produção de biomassa, na linhagem adaptada a níquel, indicando que este metal foi o mais tóxico ao fungo.

Experimentos com o fungo *Lentinula edodes* envolvendo inibição de crescimento, indicaram que a seqüência decrescente de toxicidade para os metais e concentrações aplicadas no meio líquido foi de Cd (0,0087mM) > Ni (0,35mM) >Zn (0,62mM) >Cu (1,3mM) >Pb (2,7mM) e constataram também que concentrações de 0,05mM de Cd e Hg inibem completamente o crescimento fúngico (Hatvani & Mécs, 2003).

Nos ensaios, representados por 'Td2', nos quais os metais mesclados constituíram soluções de 60mg.100mL^{-1}, observou-se que nas etapas iniciais de desenvolvimento, ocorreu um menor desenvolvimento fúngico, quando comparado com os demais ensaios,

indicando que concentrações elevadas aliadas à associação de todos os metais, retardam o desenvolvimento micelial. Alternativamente, observações de inibição fúngica na presença de associação de metais feitas por Santhiya & Ting (2006) em *Aspergillus niger* previamente adaptado a Ni, Mo e Al, constataram que este microrganismo é capaz de tolerar a associação destes metais em concentrações de até 100 $mg.L^{-1}$ de Ni, 200 $mg.L^{-1}$ de Mo e 600 $mg.L^{-1}$ de Al e concentrações de até 1000 $mg.L^{-1}$ de Ni, 1200 $mg.L^{-1}$ de Mo e 2000 $mg.L^{-1}$ de Al quando os metais foram estudados isoladamente. Estes dados sugerem que a presença de multi-metais atua em sinergia para impor um ambiente mais tóxico para o crescimento fúngico, em comparação a testes nos quais um único metal foi adicionado separadamente.

5.2 Determinação da biosorção de metais por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo líquido

Em uma primeira etapa de estudos sobre a capacidade de biosorção de metais pela massa micelial de *P. sajor-caju* desenvolvida em cultivo líquido foram feitos ensaios nos quais ocorreu a adição de soluções de sulfato de zinco, sulfato de cobre II, sulfato de ferro II e sulfato de alumínio. Para cada metal foram realizados ensaios específicos que se caracterizaram pela adição ao meio MCL, do sulfato a ser estudado, na forma de soluções que apresentavam a concentração final de 30$mg.100mL^{-1}$ de meio líquido.

A Figura 6 apresenta frascos contendo a massa micelial de *P. sajor-caju*, desenvolvendo-se em ensaios relativos ao cultivo líquido.

Figura 6. Frascos contendo micélio de *Pleurotus sajor-caju* desenvolvendo-se em cultivo líquido.

As figuras a seguir mostram as concentrações de metais no micélio fúngico, detectados e quantificados pela técnica PIXE, nos diferentes ensaios realizados, em estágios de desenvolvimento micelial correspondentes respectivamente, a 7, 14 e 21 dias de cultivo.

Das análises do micélio (Figura 7) foi constatada uma pequena quantidade de zinco (0,0448 $mg.g^{-1}$ de micélio) nos frascos do controle, que possivelmente tenha sido proveniente da presença deste metal no meio de cultivo controle, visto que a solução de micronutrientes do meio controle contém 1,4 $mg.L^{-1}$, de $ZnSO_4$. 7 H_2O. Posteriormente foram analisadas amostras da massa micelial com 14 dias de desenvolvimento e os dados indicaram que o fungo assimilou valores de zinco de até 29,14 $mg.g^{-1}$, que correspondeu a um aumento na quantidade de zinco superior a 650 vezes, em relação aos valores encontrados no micélio do controle.

Segundo Baldrian (2003), o fungo *Pleurotus ostreatus* crescido em meio com adição de 5mM de $ZnSO_4$, conseguiu acumular em 7 dias de cultivo, 5 $\mu g.g^{-1}$ em peso seco de zinco, o que ressalta a toxicidade do metal e a dificuldade do fungo que se encontra em estágios iniciais de desenvolvimento de biosorver-lo.

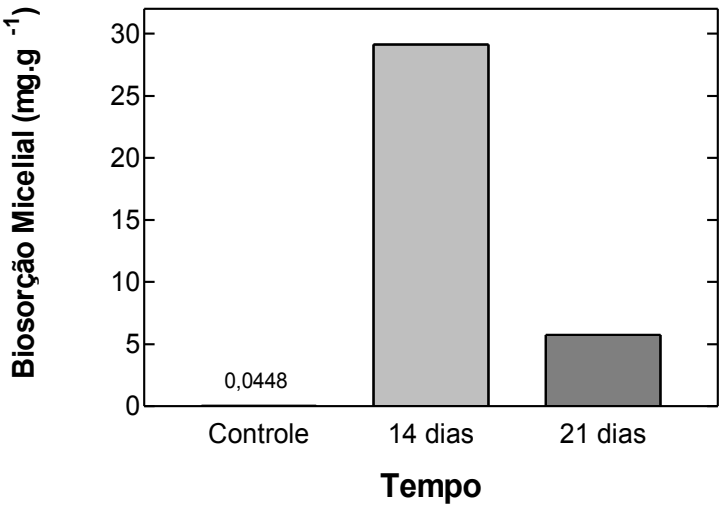


Figura 7. Biosorção de zinco pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.

Ainda na Figura 7, verifica-se que os cultivos com 21 dias de desenvolvimento apresentaram uma biosorção de zinco de 5,734 $mg.g^{-1}$, o que representa uma diminuição na capacidade de biosorção deste metal, quando comparadas com os de 14 dias de desenvolvimento. Este fato pode indicar uma possível lise celular, em etapas mais tardias de desenvolvimento fúngico (após 14º dia de cultivo), com uma conseqüente liberação do metal previamente assimilado no meio de cultivo. Deve-se destacar também que o desenvolvimento micelial do fungo nos 7 dias iniciais de cultivo foi lento (Figura 4), havendo a formação de pequena quantidade de massa micelial, o que tornou inviável a

realização das análises da biosorção micelial de zinco neste período de tempo. A pouca quantidade de massa micelial obtida nesta etapa inicial de desenvolvimento, pode indicar uma resposta adaptativa do fungo ao metal presente no meio, com posterior incremento na biosorção de zinco, indicada pelos dados obtidos nos 14 dias de desenvolvimento.

A toxicidade do zinco para o fungo, refletida por um lento crescimento inicial, e a capacidade de adaptação do microrganismo, manifestada com o posterior crescimento, também foi constatada por Tuszynska *et al.* (2006) que analisaram os efeitos do $ZnSO_4$ no fungo *Paxillus involutus.* As mitocôndrias deste fungo tratadas com $ZnSO_4$ nas concentrações de 1-100mM apresentaram perda da tubularidade e a motilidade de vacúolos também foi afetada, dependendo do tempo de exposição e concentrações aplicadas. Os vacúolos tornam-se esféricos em concentrações superiores a 5mM de $ZnSO_4$ e em um tempo de exposição superior a 15 minutos; as mitocôndrias fragmentaram-se após 30 min. na presença de 25mM de $ZnSO_4$, mas recuperam sua tubularidade com o tempo, independentemente do fato do sulfato de zinco ser removido ou não da solução, sinalizando uma resposta adaptativa do microrganismo à presença do sulfato de zinco.

A Tabela 2 representa alguns dos elementos presentes na massa micelial de *P. sajor-caju* quando adicionado sulfato de zinco ao meio de cultivo líquido. Os dados indicam que no período em que foram obtidos os maiores valores para zinco (14º dia de desenvolvimento), corresponderam aqueles em que houve maior biosorção dos metais sódio, potássio, cálcio, magnésio e manganês.

Constatou-se também que no 21º de desenvolvimento houve uma redução da biosorção de zinco e também dos elementos sódio, potássio, cálcio, magnésio e manganês. No entanto, destacou-se uma diminuição acentuada na concentração de sódio em valores

proporcionais àquela que ocorreu com o zinco, o que sugere mecanismos de interação entre os íons de zinco e sódio, e a biosorção pela membrana fúngica.

Tabela 2. Concentração de metais presentes na massa micelial de *P. sajor caju* crescidos em meios com adição de sulfato de zinco.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)		
Elementos	**Controle**	**14 dias**	**21 dias**
Zn	**0,0448**	**29,14**	**5,734**
Fe	0,262	0,155	0,526
Cr	LOD	LOD	LOD
Cu	0,012	0,156	0,976
Ni	Zero	LOD	LOD
Al	2,006	1,711	10,669
Mn	0,015	0,166	0,054
Na	3,024	9,882	2,151
P	2,658	28,948	15,426
S	1,558	1,912	4,063
K	3,148	10,298	4,907
Ca	1,474	9,47	3,415
Mg	0,519	1,495	0,716

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

Supõem-se que os gastos energéticos envolvidos no transporte ativo dos íons de zinco para o interior das células fúngicas também tenha interferido no crescimento fúngico, fazendo com que este se mantivesse em patamares similares nos distintos estágios de desenvolvimento, como constatado na Figura 4.

A Figura 8 apresenta a assimilação de ferro, pela massa micelial de *P. sajor-caju* desenvolvido em cultivo líquido. O ferro já existente no fungo em condições normais corresponde a 0,262 $mg.g^{-1}$, sendo que nos 7 dias iniciais de desenvolvimento os frascos com ferro apresentaram uma biosorção de 20,453 $mg.g^{-1}$, valor que corresponde a um aumento de 78 vezes a quantidade normal deste metal presente no fungo.

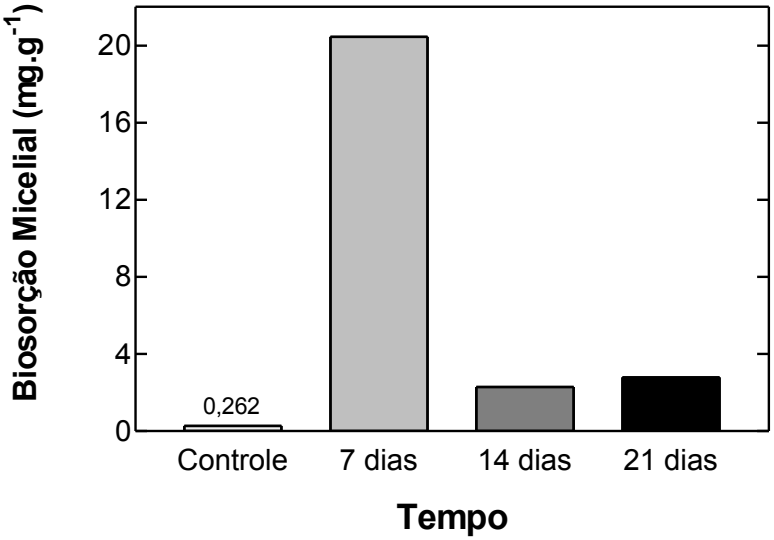


Figura 8. Biosorção de ferro pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.

Nas etapas correspondentes aos 14º e 21º dias de desenvolvimento, constata-se diminuição na concentração de ferro, sendo observados valores correspondentes respectivamente, a 2,275 e 2,773 mg.g^{-1} (Figura 8). A diminuição nos valores biosorvidos pode indicar que ação tóxica do metal ocorre ao longo do tempo de cultivo. Segundo Haas (2003), em situações ambientais de acumulação de ferro, fungos têm que suplantar problemas relativos à insolubilidade e toxicidade do metal. Como estratégias para adaptação a este contexto ambiental, muitos fungos excretam quelantes específicos para os íons de ferro – os sideróforos – para imobilizar este metal. O ferro ligado ao sideróforo é utilizado via assimilação redutiva e a presença de sideróforos intracelulares, é comum em muitos fungos como componentes do processo de armazenamento de ferro.

Paralelamente, o período correspondente ao 21º dia de desenvolvimento correspondeu ao de maior biosorção de cobre, manganês, sódio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio e

magnésio, conforme indicado na Tabela 3. Já a biosorção de magnésio, foi menor no 7º dia de desenvolvimento, que coincidiu com o período de maior biosorção de ferro. Ainda conforme a Tabela 3, o período de desenvolvimento em que foi constatada a presença de magnésio no limite de detecção, correspondeu a uma maior biosorção de ferro, indicando uma provável correlação entre os cátions bivalentes, magnésio e ferro, na disputa de sítios específicos da membrana celular.

Tabela 3. Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de ferro II.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)			
Elementos	**Controle**	**7 dias**	**14 dias**	**21 dias**
Fe	**0,262**	**20,453**	**2,275**	**2,773**
Zn	0,0448	0,137	0,0141	0,232
Cr	LOD	Zero	LOD	LOD
Cu	0,012	Zero	LOD	6,235
Ni	Zero	Zero	LOD	LOD
Al	2,006	1,655	0,268	2,268
Mn	0,015	LOD	0,005	0,041
Na	3,024	2,743	LOD	4,358
P	2,658	9,897	2,906	65,521
S	1,558	0,608	0,416	24,158
K	3,148	5,409	1,308	32,632
Ca	1,474	1,988	0,301	4,471
Mg	0,519	LOD	0,199	4,349

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

As estratégias de bioacumulação de ferro, por *Saccharomyces cerevisiae* indicam que as vias para acumulação de ferro pela levedura, incluem além dos sideróforos, ferro permeases e transportadores não-específicos do íon bivalente do metal. Todas as vias de acumulação estudadas para *S. cerevisiae* dependem diretamente ou indiretamente da

atividade de metaloredutases, expressadas extracelularmente na membrana plasmática (Kosman, 2003).

A assimilação de alumínio pela massa micelial de *P. sajor-caju* está representada na Figura 9. Os dados obtidos indicam que quantitativamente houve menor biosorção do alumínio, quando comparada aos valores obtidos nos meios onde foi adicionado foi adicionado zinco (Figura 7) ou ferro (Figura 8).

O alumínio presente no fungo quando crescido no meio controle corresponde a 2,006 $mg.g^{-1}$, sendo que o fungo assimilou 8,666 $mg.g^{-1}$ do metal, em um período de 7 dias de cultivo, indicando uma provável assimilação do metal simultânea ao desenvolvimento micelial nos 7 dias iniciais de cultivo.

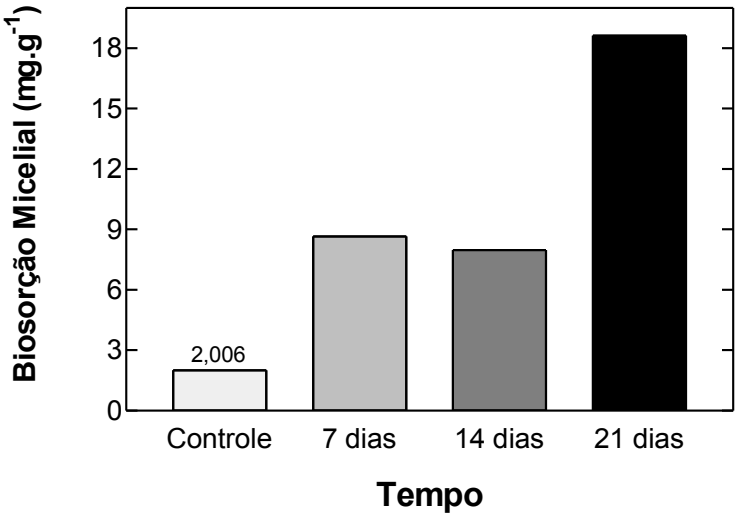


Figura 9. Biosorção de alumínio pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de $30mg.100mL^{-1}$ de meio.

Ainda na Figura 9, observa-se que ao atingir o 14º dia, os valores de alumínio assimilados pelo fungo chegaram a 7,969 $mg.g^{-1}$, o que pode indicar uma liberação do

metal no meio de cultivo, ocasionada pela associação de diferentes fatores, como lise celular – suposição corroborada pela análise da Figura 4, em que se constata uma diminuição da massa micelial no 14º dia de desenvolvimento, desorção do metal previamente assimilado e alterações do pH do meio de cultivo. Segundo Baldrian (2003) em estudos com diferentes fungos e metais pesados, a biosorção de chumbo pelo micélio de *Pleurotus sanguineus* foi acompanhada pela troca iônica e liberação de cálcio do micélio; também observou que o mecanismo de troca iônica tem repetidos ciclos de biosorção/desorção possivelmente influenciado pela alteração do pH do meio.

Os dados obtidos nos 21 dias de desenvolvimento sugerem que o fungo apresentou novamente capacidade de biosorção do metal presente no meio de cultivo, o que está representado pela biosorção de alumínio de 18,630 $mg.g^{-1}$, correspondendo a valores 9 vezes superiores ao do controle, valores alcançados pelo fungo mesmo quando ocorreu a redução da biomassa fúngica, representada na Figura 4. Baldrian (2003) afirma que a capacidade de ligação do metal depende da idade do micélio e da composição do meio de cultura usado para o cultivo, devido provavelmente a mudanças que ambos fatores ocasionam na parede celular; a ligação do metal também pode ser afetada por tratamentos químicos ou físicos do micélio, mas sua efetividade depende do metal e da espécie de fungo utilizada.

De acordo com os dados da Tabela 4, relativos à presença dos demais metais biosorvidos pelo fungo quando foi adicionado ao meio líquido sulfato de alumínio, constata-se que no 21º dia de desenvolvimento correspondente aos valores mais altos de biosorção de alumínio, também corresponderam aos maiores valores de biosorção para ferro, sódio e potássio.

Tabela 4. Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de alumínio.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)			
Elementos	**Controle**	**7 dias**	**14 dias**	**21 dias**
Al	**2,006**	**8,666**	**7,969**	**18,630**
Zn	0,0448	0,087	0,025	0,031
Cr	LOD	LOD	LOD	Zero
Cu	0,012	0,011	0,019	0,011
Ni	Zero	Zero	Zero	LOD
Fe	0,262	0,445	0,448	0,625
Mn	0,015	0,023	LOD	Zero
Na	3,024	2,126	2,567	4,110
P	2,658	15,837	16,430	18,050
S	1,558	1,912	2,864	2,623
K	3,148	9,768	2,007	3,303
Ca	1,474	1,373	0,499	0,895
Mg	0,519	0,723	Zero	Zero

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

No 14º dia de desenvolvimento foram obtidos os menores valores de biosorção de potássio e cálcio que corresponderam simultaneamente aos menores valores de biosorção de alumínio pelo fungo, como indicado na Tabela 4.

Com relação ao comportamento fúngico quando da adição de sulfato de cobre II ao meio, observa-se que a biosorção de cobre foi crescente ao longo do tempo de cultivo (Figura 10), chegando a valores de 10,502 $mg.g^{-1}$em 21 dias de desenvolvimento, o que representou um aumento superior a 875 vezes, em relação à quantidade presente no controle (0,012 $mg.g^{-1}$).

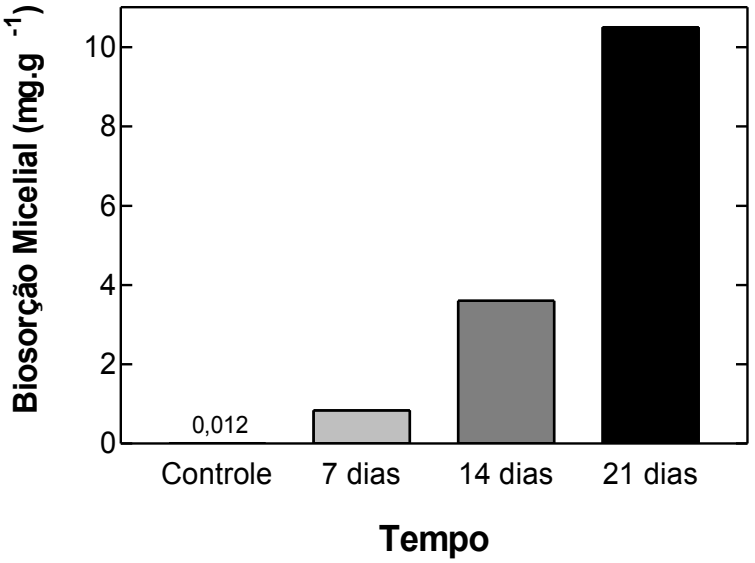


Figura 10. Biosorção de cobre pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.

Segundo Veit *et al*. (2005) a capacidade máxima de biosorção de cobre (II) encontrada para biomassa morta dos fungos *Pleurotus pulmonarius* e *Schizophyllum commune* foi, respectivamente, de 6,20 e 1,52 mg. g^{-1} de biomassa. A biomassa de *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Schizophyllum commune* apresentaram, respectivamente, capacidade de biosorção de 2,61, 4,77, 3,69 e 3,94 mg de cobre (II) por grama de biomassa úmida (Gabriel *et al.*, 2001) e *Aspergillus niger* foi capaz de biosorver 2,66 mg de cobre (II) por grama de biomassa seca (Kapoor *et al.*, 1999).

Em estudos nos quais 100mg.L^{-1} de cobre (II) estiveram presentes no meio de cultivo líquido, de diferentes fungos basidiomicetes, os valores máximos de biosorção encontrados para o metal foram de 8,77 mg.g^{-1} em peso seco para *Oudemansiella mucida*, 6,29 mg.g^{-1}

para *Lepista nuda*, 5,08 $mg.g^{-1}$ para *Pycnoporus cinnabarinus* e 4,77 $mg.g^{-1}$ para *Pleurotus ostreatus* (Gabriel *et al*., 2001). A biosorção de 10,502 $mg.g^{-1}$ de micélio seco, obtida por *P. sajor-caju* no presente estudo, evidencia a grande capacidade de biosorção deste metal pelo fungo, nas condições estudadas, quando comparada aos dados encontrados na literatura.

Os dados da Tabela 5 indicam as concentrações dos demais metais presentes na massa micelial cultivada em meio líquido quando agregado ao meio de cultivo o sulfato de cobre II e indicam que a maior biosorção de cobre, correspondeu simultaneamente a uma maior biosorção de alumínio, ferro, sódio, fósforo e cálcio e aos menores valores de zinco e manganês.

Tabela 5. Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de cobre II.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)			
Elementos	**Controle**	**7 dias**	**14 dias**	**21 dias**
Cu	**0,012**	**0,835**	**3,609**	**10,502**
Zn	0,0448	0,041	0,044	LOD
Cr	LOD	LOD	LOD	Zero
Al	2,006	0,446	1,110	1,832
Ni	Zero	LOD	LOD	LOD
Fe	0,262	0,189	0,287	0,508
Mn	0,015	LOD	1,465	1,763
Na	3,024	2,126	2,567	4,110
P	2,658	4,608	3,933	3,522
S	1,558	1,434	2,165	1,277
K	3,148	2,058	2,668	2,429
Ca	1,474	0,788	0,905	1,484
Mg	0,519	LOD	LOD	LOD

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

Segundo Holcombe *et al.* (1999), em estudos para pré-concentrar quantidades traços de Cd, Cu, Co e Ni usando biomassas de algas (*Stichococcus-bacillares*) observaram que a presença de íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos não afeta a adsorção de outros íons metálicos. Para *P. sajor-caju*, como constatado na Tabela 5, a maior concentração de sódio e de cálcio, coincidiu com período de maior biosorção de cobre, sendo que a redução na biosorção destes elementos também foi seguida de redução de biosorção de cobre. A biosorção não foi dificultada pela presença destes metais alcalinos e alcalinos terrosos, no entanto, é provável que tenham ocorrido mecanismos que envolvam o transporte ativo e outros mecanismos de interação complementar entre estes íons e o cobre, na medida em que a maior ou menor biosorção destes íons, resultou em um comportamento similar de biosorção de cobre pela biomassa fúngica.

De acordo com Baldrian (2003) a biosorção de íons de Cu^{+2} pelo micélio de *Ganoderma lucidum* foi baseada na substituição do íon Ca^{2+}, no entando para *Phanerochaete chrysosporium*, foi constatado que a troca iônica correspondeu a somente 1% da assimilação de íons de Cu^{+2} o que pode indicar que a assimilação do cobre foi atribuída principalmente a adsorção de colóides de hidróxido de cobre, extremamente pequenos, formados ao redor do pH 6,0. *Pleurotus ostreatus* conseguiu acumular, em 7 dias de crescimento em meio contendo 5 mM de cobre (II), 10 $\mu g.g^{-1}$ em peso seco de cobre sendo que deste valor, somente 2,4 $\mu g.g^{-1}$ estavam ligados a proteínas no citosol, formando metaloproteínas.

Os mecanismos de acumulação de metais por fungos da podridão branca, como os do gênero *Pleurotus* sp. são pouco conhecidos, mas para outros fungos sabe-se que os sistemas de biosorção de metais essenciais (Zn, Cu, Mn, Fe...) estão presentes nas membranas das células; com relação aos metais não essenciais (Cd, Cr, Hg...), eles são

geralmente co-transportados usando os mesmos transportadores, devido a sua baixa especificidade. A biosorção depende do potencial da membrana e geralmente está ligada ao transporte de cálcio, sendo que para o transporte de cádmio pelo fungo *Paxillus involutus*, foi constatado que 50% do metal estava ligado à parede celular, 30% permaneceu no citoplasma e 20% foram transportados para o interior dos vacúolos (Baldrian, 2003).

Os resultados referentes à assimilação dos metais estudados sugerem a existência de mecanismos eficientes de biosorção que respondem diferentemente para cada metal estudado. Muitos destes mecanismos podem estar relacionados a transporte ativo, pois o metal passa a concentrar-se no interior do micélio, o que envolve gastos energéticos. Segundo Tsekova & Galabova (2003) em estudos feitos com *Rhizopus delemar* na presença de cobre, constataram que as ligações reversíveis entre o metal e a biomassa ocorrem quando estão presentes os grupos funcionais hidróxido e amida, que por serem bases fracas, se ligam fracamente aos metais, sendo mais comum que os sítios envolvidos na biosorção de metais, contenham ligantes carboxilatos ou fosfato ou ambos. As ligações não-reversíveis, envolvendo a biosorção de cobre pela biomassa de *R. delemar* geralmente são executadas por mecanismos de complexação, envolvendo sítios da parede celular que contenham carboxil, fosfato e outros constituintes, sendo difícil determinar a importância destes ligantes. As diferenças nas características de biosorção entre os fungos, são provavelmente devido aàs diferentes proporções de tais ligantes presentes em suas paredes celulares.

Segundo Zafar *et al*. (2007) um determinado organismo pode realizar diretamente ou indiretamente várias estratégias de sobrevivência como por exemplo, a síntese de metalotioninas ou γ-glutamil peptídeos, como um mecanismo de resistência à presença de íons Cu^{2+} em meios de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. A ligação do cobre com as

membranas, sua precipitação ao redor das paredes celulares, bem como o transporte intracelular, também são componentes dos mecanismos de resposta da célula.

De acordo com os dados da Tabela 5, foram obtidos maiores valores de biosorção de potássio no micélio do controle do que em qualquer outra etapa de desenvolvimento fúngico, em meio no qual o cobre esteve presente, o que pode sugerir a ocorrência do efluxo deste elemento causada pela presença de cobre. Tal indicação é corroborada por Baldrian (2003) que em estudos com basidiomicetes observou que o cobre exerce seu efeito diretamente na membrana plasmática fúngica, causando mudanças em sua composição. A presença do cobre interfere no transporte de metais solubilizados e provoca o efluxo de potássio que por sua vez está associado à permeabilização e outras mudanças na composição da membrana.

Adicionalmente, constata-se que no período de desenvolvimento fúngico que correspondeu a obtenção da maior massa micelial (Figura 4), foi o período em que ocorreu a menor biosorção de cobre, como indicado na Tabela 5, corroborando a hipótese de que a biosorção de cobre envolve gasto energético, o que poderia ocasionar, por um mecanismo compensatório, uma diminuição das reações metabólicas que promoveriam o crescimento micelial.

A partir da constatação de que o fungo apresentava condições de desenvolvimento micelial na presença dos metais estudados e também capacidade de biosorção destes metais, foram realizados novos estudos enfocando metais normalmente reconhecidos como tóxicos às células, como níquel e cromo que também foram adicionados aos meios de cultivo na forma de sulfatos, nas concentrações de 30mg.100mL^{-1}de meio. Adicionalmente foi realizado um teste (Td1), no qual todos os sais foram mesclados e adicionados em concentrações de 5mg de cada sal, totalizando 30mg.100mL^{-1} de meio. Este estudo foi

realizado para analisar-se o comportamento do fungo perante situações comuns em áreas de contaminação ambiental nas quais misturas de distintos metais aparecem como contaminantes. Também com o objetivo de observar o comportamento do fungo na presença de todos os metais associados em uma concentração superior a inicialmente testada, foi realizado um ensaio (Td2) no qual foram adicionadas ao meio de cultivo, 10mg de cada sal estudado, totalizando 60mg.100mL^{-1} de meio.

Os dados que seguem representam o comportamento do fungo nos estágios de desenvolvimento micelial correspondente aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento, perante cada uma das novas adições testadas.

A Figura 11 representa os ensaios ao qual cromo foi adicionado ao meio de cultivo, constatou-se que em 7 e 14 dias de desenvolvimento, os valores de absorção de cromo foram respectivamente, de 14,704 e 13,975 mg.g^{-1}. No controle não foi constatada a presença de cromo no meio. A assimilação do metal decaiu no 21º dia de desenvolvimento a valores de 10,152 mg.g^{-1} o que pode indicar que o fungo atingiu o período estacionário de desenvolvimento que foi seguido de morte fúngica e provável liberação do metal no meio de cultivo.

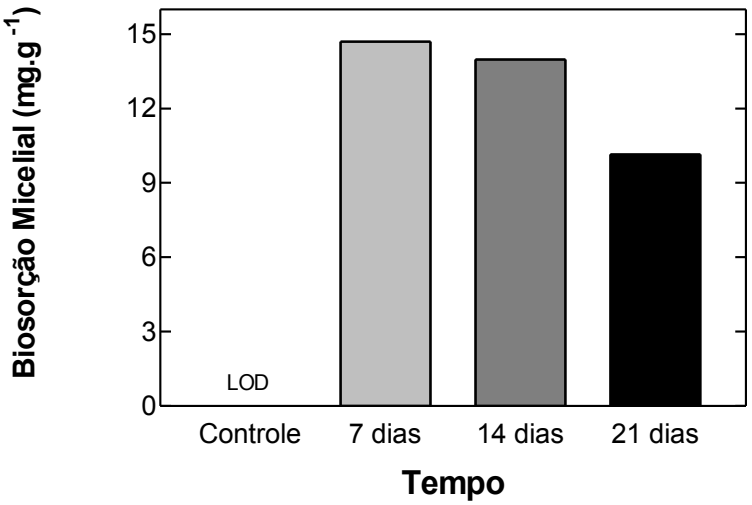


Figura 11. Biosorção de cromo pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, com 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.

Kaszycki *et al.* (2004) sugerem que os microrganismos atuam com diferentes mecanismos e reações fisiológicas ao '*stress*' causado pelo cromo, tais como a indução de proteínas de stress, reações de oxi-redução, interação com organelas celulares, ligação de moléulas citosólicas, encapsulamento do cromo dentro de cápsulas das membranas, precipitação do metal, quelação e efluxo ativo foram observados para leveduras e outros organismos ou foram supostos hipoteticamente. Assim, é possível que parte do metal acumulado por *P. sajor-caju* em uma etapa inicial de desenvolvimento, possa ter sido liberado novamente para o meio, devido a mecanismos que envolvam não somente a lise celular, mas também o efluxo ativo do metal para o meio líquido.

Neste estudo o valor máximo de biosorção de cromo obtido para *P. sajor-caju* foi de 14,704mg de $Cr^{+3}.g^{-1}$ de micélio em peso seco, valor altamente significativo quando comparados aos 5,1, 10 e 11,1mg de $Cr^{+3}.g^{-1}$ de peso seco biosorvidos, respectivamente, por células de *Rhizobium*, *Pichia guilliermondii* e *Candida curvata*, tratadas com cromo imobilizado (Kaszycki *et al.*, 2004). O fato de não ter sido observada toxicidade do cromo, associada à alta capacidade de assimilação do metal, reforçam a possibilidade de aplicação do *P. sajor-caju* em tratamentos de efluentes contaminados com este metal.

A Tabela 6 representa os demais metais biosorvidos pelo fungo crescido em meio líquido quando adicionado o sulfato de cromo III ao meio, indicando que os valores de maior biosorção de cromo corresponderam também aos maiores valores de biosorção de alumínio, ferro e sódio. Adicionalmente, alguns íons presentes no controle, como cobre e manganês, foram encontrados somente em níveis próximos ao limite de detecção, o que pode indicar uma possível inibição da assimilação destes íons pela presença de íons de Cr^{+3}

no meio de cultivo. A maior biosorção de sódio pode significar também que há uma correlação da presença deste metal e o transporte ativo do cromo.

Tabela 6. Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de cromo III.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)			
Elementos	**Controle**	**7 dias**	**14 dias**	**21 dias**
Cr	**LOD**	**14,704**	**13,975**	**10,152**
Zn	0,0448	0,145	0,151	0,075
Cu	0,012	LOD	LOD	LOD
Al	2,006	2,531	0,906	2,130
Ni	Zero	LOD	Zero	Zero
Fe	0,262	0,644	0,641	0,276
Mn	0,015	LOD	LOD	LOD
Na	3,024	3,871	1,526	2,943
P	2,658	5,019	10,979	6,313
S	1,558	0,308	1,298	0,499
K	3,148	3,384	3,537	2,158
Ca	1,474	1,466	5,180	4,324
Mg	0,519	LOD	0,634	LOD

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

A Figura 5 que representa a massa micelial de *P. sajor-caju* em meios aos quais foi adicionado sulfato de cromo III, indica que os menores valores de massa micelial foram alcançados no 14º dia de desenvolvimento, que corresponderam aos de maior biosorção de cromo e menor assimilação do sódio, compensada provavelmente pela maior biosorção de potássio e cálcio (Tabela 6). Estes dados corroboram a hipótese de que estes íons estão diretamente envolvidos tanto no crescimento fúngico, como na biosorção do cromo, processos estes que ocorrem mediante gastos energéticos, e provavelmente parte da energia utilizada na biosorção do cromo deixa de ser utilizada pelo fungo no seu crescimento micelial.

Em ensaios nos quais foi adicionado níquel aos meios de cultivo, constatou-se que nos 7 dias iniciais de desenvolvimento, o fungo apresentou uma assimilação pequena do metal presente no meio (0,657 mg.g^{-1}) em relação aos valores observados em etapas posteriores de desenvolvimento, sendo que no controle não foi constatada a presença de níquel (Figura 12). Esta constatação pode indicar a existência de um período de adaptação fúngica à presença do metal no meio, com conseqüente incremento da capacidade de biosorção de níquel pela massa micelial. O valor máximo de biosorção de níquel alcançado pelo fungo foi de 1,873 mg.g^{-1} no 14º dia de desenvolvimento.

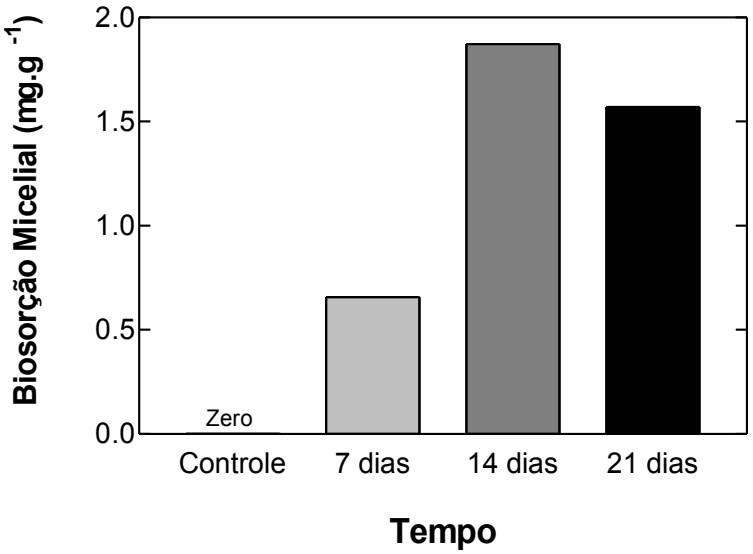


Figura 12. Biosorção de níquel pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, com 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.

Dilek *et al.* (2002) afirmam que o níquel (II) é um metal com baixa afinidade de biosorção pelos microrganismos, e que esta dificuldade pode ser minimizada quando estudos empregam células metabolicamente inativas. Eles sugerem que em alguns casos

estas células são mais eficientes na realização da biosorção e apresentam a vantagem de evitar custos adicionais envolvidos na geração e manutenção de biomassa viva.

Como representado na Tabela 7, os meios de cultivo nos quais foi adicionado sulfato de níquel II, constatou-se maiores valores de biosorção para os metais como zinco, ferro, alumínio, sódio, enxofre, potássio e magnésio, na mesma etapa de desenvolvimento em que foram encontrados os maiores valores de biosorção de níquel pelo fungo, correspondente ao 14º dia de cultivo.

Tabela 7. Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de níquel II.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)			
Elementos	**Controle**	**7 dias**	**14 dias**	**21 dias**
Ni	**Zero**	**0,657**	**1,873**	**1,571**
Zn	0,0448	0,058	0,236	0,217
Cu	0,012	LOD	LOD	Zero
Al	2,006	1,328	1,699	1,532
Cr	LOD	LOD	LOD	LOD
Fe	0,262	0,384	1,012	0,425
Mn	0,015	0,018	0,045	0,060
Na	3,024	2,095	2,517	2,251
P	2,658	3,878	4,783	5,553
S	1,558	0,881	1,440	0,948
K	3,148	1,919	4,404	1,967
Ca	1,474	1,468	3,225	6,706
Mg	0,519	0,398	0,638	0,504

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

A flutuação dos valores de biosorção de sódio e potássio, os principais íons envolvidos no transporte ativo das células, foi correspondente à flutuação dos valores de biosorção de níquel, o que indica o envolvimento deste tipo de mecanismo, nos processos

de incorporação do níquel pela massa micelial fúngica. Este dado é corroborado quando observa-se que os menores valores de biosorção de níquel também corresponderam aos menores valores de biosorção de sódio e potássio pelo fungo (Tabela7).

O gasto energético envolvido nos processos de transporte ativo pode ter contribuído para uma menor biosorção de níquel quando este metal é comparado aos demais metais empregados isoladamente, e para a obtenção de pequenos valores de crescimento micelial nos ensaios em que sulfato de níquel foi adicionado ao meio de cultivo, como constatado na Figura 5. Segundo Tuszynska (2006), as hifas do fungo ectomicorrizo *Paxillus involutus* tratadas com $NiSO_4$ na concentração de $1mmol.L^{-1}$, apresentaram perda da tubularidade dos vacúolos e o rompimento da rede mitocondrial causada por Ni^{+2}, indicando que a presença destes íons no meio de cultivo, induz a modificações na morfologia de organelas e microtúbulos. Após a remoção do sulfato de níquel II do meio de cultivo, os vacúolos tubulares conseguiram reestruturar-se, no entanto, a rede mitocondrial foi reestabelecida mesmo na presença de $NiSO_4$, sugerindo mecanismos celulares de detoxificação específicos para este metal.

Hatvani & Mécs (2003) afirmam que os mecanismos de tolerância/sensibilidade, crescimento e processos enzimáticos envolvendo fungos e metais pesados ainda necessitam ser esclarecidos. Como resíduos industriais são geralmente complexas misturas de vários xenobióticos, incluindo sais de metais pesados, os efeitos inibitórios destes devem ser levados em consideração quando são realizados estudos envolvendo biorremediação.

A Figura 13 representa o comportamento do fungo em ensaios denominado ‘Td1’, nos quais todos os metais foram mesclados e adicionados ao meio de cultivo na concentração de 5mg de cada sal, totalizando $30mg.100mL^{-1}$ de meio de cultivo. Nesta

figura pode-se constatar que os ensaios apresentaram diferentes tipos de comportamento com relação à biosorção dos metais, sendo que esta foi crescente ao longo do tempo para cobre e zinco, e decrescente ao longo do tempo de cultivo para ferro, cromo e alumínio, embora a biosorção de alumínio tenha se mostrado em patamares semelhantes no 14º e 21º dia de desenvolvimento. Com relação ao níquel, a biosorção manteve-se em valores semelhantes ao longo do tempo de cultivo, sendo levemente superior no 14º dia de desenvolvimento fúngico.

Entre os metais adicionados verifica-se que zinco foi o metal assimilado em maior quantidade pelo fungo, tal como observado quando foi adicionado isoladamente (Figura 7). Este fato reforça a possibilidade da existência de mecanismos preferenciais para a entrada de deste metal na membrana fúngica, fato que não é alterado nem mesmo pela presença de outros íons metálicos no meio de cultivo.

A biosorção da ordem de 1,194 $mg.g^{-1}$ para o alumínio foi inferior ao valor encontrado no controle (Tabela 4), nos quais constatou-se a presença de 2,006 $mg.g^{-1}$ deste metal. Os demais metais apresentaram uma biosorção em valores superiores ao controle, no entanto estes valores foram menores quando comparados àqueles obtidos nos ensaios em que os metais foram adicionados isoladamente. Como exemplo, o zinco quando adicionado em conjunto com outros metais apresentou biosorção máxima no 14º dia de cultivo, de 2,955 $mg.g^{-1}$ e quando isoladamente adicionado ao meio de cultivo, como indica a Tabela 2, apresentou valores de biosorção máxima de 29,14$mg.g^{-1}$, também no 14º dia de cultivo.

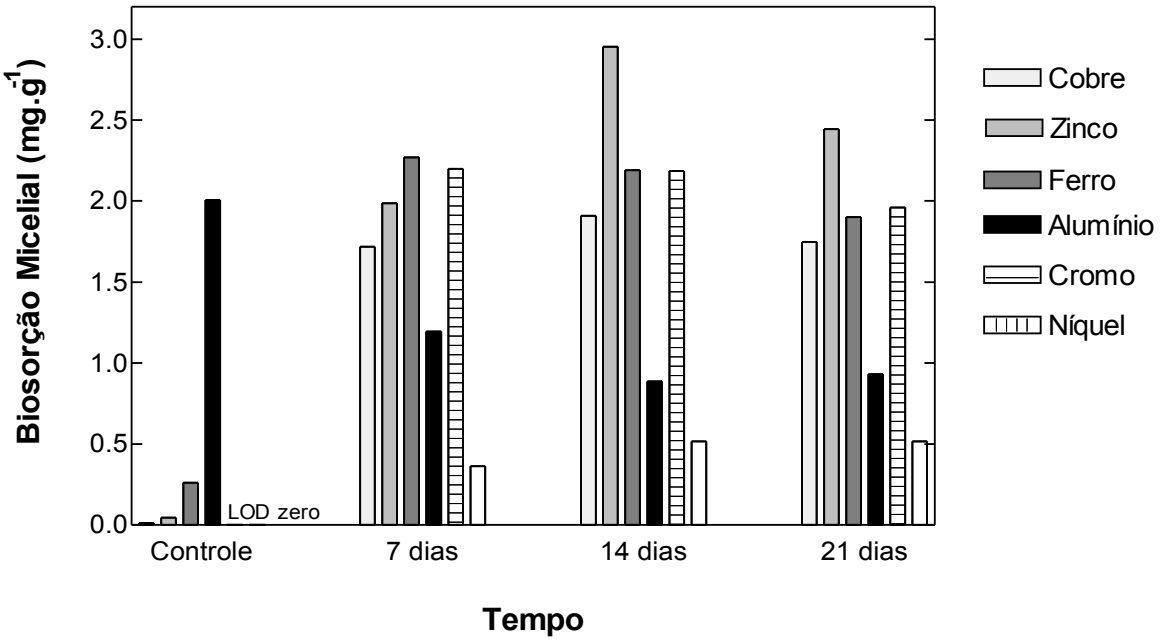


Figura 13. Biosorção de metais pela massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* obtida em cultivo líquido, aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento, quando da adição da solução 'Td1'.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100mL^{-1} de meio.

Bayramolu *et al.* (2003) em estudos sobre a capacidade de biosorção do fungo imobilizado *Trametes versicolor,* crescido em meio de cultivo contendo a associação dos íons de Cu^{2+}, Pb^{2+} e Zn^{2+}, relatam que em uma biosorção competitiva, as diferenças nas afinidades de biosorção podem ser originadas por interações complexas de vários fatores, tais como, carga iônica, preparação da massa fúngica imobilizada, pH do meio e concentração de metais no meio, sendo que a temperatura do meio, quando entre 15 e 45ºC, não afeta significantemente a capacidade de biosorção.

A Tabela 8 representa a concentração dos diferentes elementos presente na massa micelial de *P. sajor-caju*, quando crescido em meio de cultivo contendo uma mescla de

sulfato de cobre II, sulfato de zinco, sulfato de ferro II, sulfato de alumínio, sulfato de cromo III e sulfato de níquel II.

Tabela 8. Concentração de metais presentes na massa micelial de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em ensaio denominado 'Td1'.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)			
Elementos	**Controle**	**7 dias**	**14 dias**	**21 dias**
Cu	0,012	1,717	1,909	1,748
Zn	0,0448	1,988	2,955	2,446
Cr	LOD	2,199	2,186	1,961
Al	2,006	1,194	0,887	0,932
Fe	0,262	2,270	2,191	1,902
Ni	Zero	0,363	0,516	0,516
Mn	0,015	0,052	LOD	LOD
Na	3,024	LOD	0,914	1,073
P	2,658	7,681	6,417	6,001
S	1,558	1,590	0,992	0,984
K	3,148	4,024	2,300	1,889
Ca	1,474	2,68	4,095	4,214
Mg	0,519	LOD	LOD	0,451

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção.

Os valores obtidos para à biosorção dos metais adicionados em conjunto ao meio de cultivo (Tabela 8), foram inferiores àqueles obtidos quando os metais foram adicionados isoladamente ao meio de cultivo, indicando prováveis interações de biosorção competitiva entre os íons adicionados e os sítios de ligação disponíveis na biomassa fúngica.

Segundo Errasquín & Vasquez (2003), em estudos com *Trichoderma atroviride*, a combinação de vários íons afetou a biosorção de cada metal individualmente, sendo que ocorreu um decréscimo de 75% da biosorção de cobre e zinco, quando os dois estiveram em combinação, indicando que a acumulação seletiva de metais pesados por microrganismos é determinada por competição interiônica nas quais os cátions metálicos

competem pelos sítios de ligação da parede celular. Os resultados obtidos na Tabela 8, quando comparados aos da Tabela 9, indicam que o mesmo ocorreu para *P. sajor-caju,* na medida em que foram obtidos valores superiores a 75% de decréscimo de biosorção de cobre e zinco, quando da adição ao meio, destes metais combinados com outros íons metálicos.

Fungos como *Pleurotus ostreatus*, *Daedalea quercina* e *Trametes versicolor* acumularam mais zinco de uma solução na qual somente zinco esteve presente, do que em soluções nas quais o zinco esteve em associação com outros metais como cádmio, cobre e chumbo. O resultado obtido sustenta a idéia de que quando o crescimento fúngico ocorre com um permanente contato entre os metais pesados e o zinco, este freqüentemente é substituído pelos demais metais pesados (Curkova *et al*., 2004). Mohapatra & Gupta (2005) observaram que em um sistema binário no qual cobre e zinco, foram adicionados simultaneamente ao meio de crescimento da alga *Oscillatoria angustissima*, o cobre inibiu fortemente a biosorção de zinco e no entanto, sua biosorção permaneceu praticamente inalterada. A capacidade de biosorção de um único metal decresceu na odem Zn(II) > Cu(II), em pH 4,0 e na concentração de 0,5mM de cada metal.

Estudos realizados durante o crescimento do fungo basidiomicete *Daedalea quercina* em meio contendo quantidades equimolares de alumínio, cobre, zinco e chumbo, constataram que as concentrações de íons de metal acumulado decresceram na seguinte ordem Zn > Cu > Pb > Al, o que indica que a preferência por determinados metais é específica para cada espécie de microrganismo estudado (Baldrian, 2003). Tal observação é condizente com os valores obtidos para *P. sajor-caju* no presente estudo, pois como indica a Tabela 8, nos 14 dias de desenvolvimento, quanto ocorreram ensaios nos quais foi

realizada a associação de todos os metais, a maior biosorção foi encontrada para zinco, seguida por cobre e alumínio.

Na análise da Tabela 8, destacam-se ainda os valores elevados de fósforo, cálcio e potássio presentes na massa micelial, e também a menor presença de sódio, quando comparados com os valores encontrados no controle.

As amostras relativas aos ensaios denominados 'Td2', foram encaminhadas ao IF-URFGS, no entanto, não foi possível a realização das análises por problemas técnicos no acelerador Tandetron, que não foram solucionados até a data do término da redação da presente tese de doutorado.

Para realizar-se uma análise comparativa complementar foi construída a Tabela 9, que representa os valores máximos de biosorção dos distintos metais quando aplicados separadamente aos meios de cultivo, comparados com os controles, nos quais não houve a adição de metais, e o período de desenvolvimento fúngico no qual foi constatada a biosorção máxima.

Tabela 9. Comparação entre a máxima absorção micelial e os estágios de desenvolvimento de *Pleurotus sajor-caju* em relação aos metais aplicados isoladamente.

Metais (sulfatos)	**Controle ($mg.g^{-1}$)**	**Absorção Máxima ($mg.g^{-1}$)**	**Absorção Máxima (vezes)**	**Tempo de Cultivo (dias)**
Zinco	0,0448	29,14	650	14
Ferro	0,262	20,45	78	7
Alumínio	2,006	18,63	9	21
Cobre	0,012	10,50	875	21
Cromo	Zero	14,70	-	7
Níquel	Zero	1,87	-	14

Verifica-se um comportamento heterogêneo da capacidade de biosorção pelo fungo em relação aos diferentes metais testados. Esta heterogeneidade pode ser observada pelas diferentes concentrações de metais já presentes no controle, pela biosorção máxima obtida para cada metal e também pela variação no período de tempo necessário para que esta biosorção máxima fosse alcançada pelo fungo.

A ordem preferencial de biosorção de metais, obtida para *P. sajor-caju* neste estudo, com exceção da ordem cobre/níquel, é semelhante àquela encontrada por Hefnawy & Razak (1998) em estudos feitos com uma linhagem de *Fusarium oxysporum* tolerante a cobre. Os pesquisadores observaram que as paredes das células obtidas de micélio crescido a 200 e 400 $mg.L^{-1}$ de cobre, podem religar-se individualmente a metais mais facilmente do que as paredes das células do controle podem fazê-lo, e seguem a ordem preferencial religação de Zn > Fe > Ni > Cu > Co.

Constata-se que a biosorção do alumínio foi reduzida em comparação a biosorção dos demais metais, no entanto, este metal é o que se apresenta em maior quantidade no controle, podendo ser conseqüência tanto da concentração de alumínio já existente no controle, como também de mecanismos preferenciais de ligação na membrana. Por outro lado, a menor concentração de alumínio em relação aos demais metais pode ser conseqüência de interferência dos demais íons metálicos presentes no meio de cultivo.

Os metais cobre e zinco, foram mais facilmente biosorvidos pelo fungo, provavelmente devido a mecanismos específicos de transporte, que envolvam gastos energéticos. Tal fato foi constatado por Silva & Prado-Filho (1998) em estudos sobre a

acumulação de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae*, indicando um provável transporte destes cátions para o interior das células por meio de proteínas específicas de transporte até o citosol, onde então ficariam ligados a metaloproteínas. Segundo Luna *et al.* (2005) em estudos sobre os mecanismos de biosorção de Cu^{+2} pela alga *Sargassum sp.*, um limite na concentração inicial de Cu^{+2} superior ao valor de 250ppm origina a formação de agregados que dificultam a sorção. No entanto a alga apresenta em sua parede um biopolímero (ácido algínico), um polisacarídeo estrutural com importantes propriedades de troca iônica, com habilidade de formar blocos poliméricos com grupos carregados negativamente, que são responsáveis pela imobilização dos íons de Cu^{+2} em sítios intersticiais, sem quebra de ligações químicas no biopolímero.

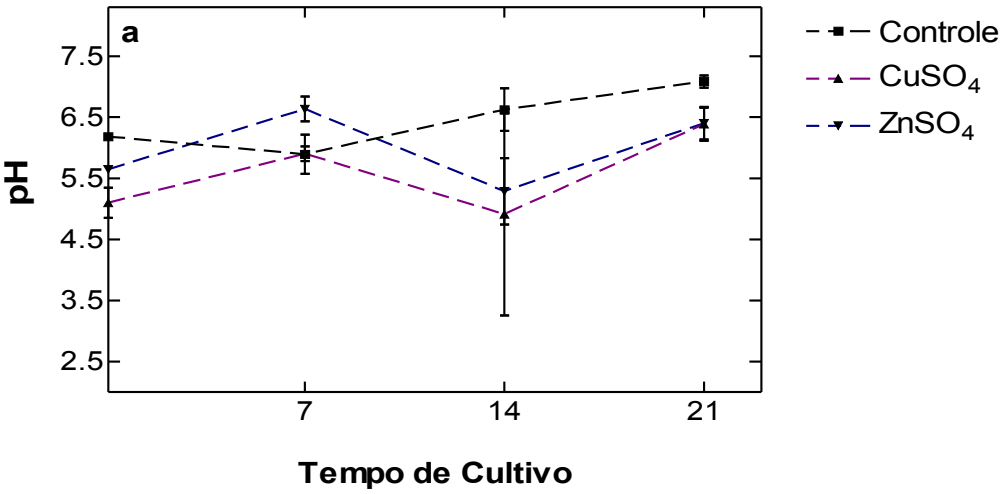
Malik (2004) relata que metais recalcitrantes como níquel apresentam baixa capacidade de ligação a células vivas o que dificulta a efetividade do processo de remoção de metais. No entanto, o fungo apresentou habilidade para biosorver os metais cromo e níquel, conhecidos por serem tóxicos a microrganismos, indicando o potencial que *P. sajor-caju* apresenta para ser aplicado em tratamentos de efluentes contaminados com tais metais.

Em nenhuma das condições testadas, os metais e as concentrações empregadas foram letais ao fungo *P. sajor-caju* e, ao contrário, este se mostrou altamente capacitado para assimilar metais nas condições testadas, o que favorece seu uso em processos de biorremediação que envolvam remoção e recuperação de metais.

5.3 Determinação do pH durante o desenvolvimento de *Pleurotus sajor-caju* em meio líquido

Durante a realização dos estudos sobre a capacidade de biosorção de metais pela massa micelial de *P. sajor-caju* desenvolvida em cultivo líquido, inicialmente foram feitas análises de pH nos diferentes ensaios nos quais ocorreu a adição de soluções de sulfato de zinco, sulfato de cobre II, sulfato de ferro II e sulfato de alumínio. As medidas de pH 70
foram realizadas para cada ensaio, no momento da adição das respectivas soluções de sulfatos ao meio de cultivo, indicadas como tempo zero, e aos 7, 14 e 21 dias de 70
desenvolvimento fúngico.

A Figura 14 representa a variação do pH e os valores obtidos nos diferentes ensaios nos quais foram adicionados metais, quando comparados ao controle. Todos os meios, independentemente do tipo de sulfato adicionado, apresentaram uma diminuição do pH no 14º dia de cultivo e patamares semelhantes de pH no 21º de cultivo, chegando a valores próximos àqueles obtidos no controle na mesma etapa de desenvolvimento.



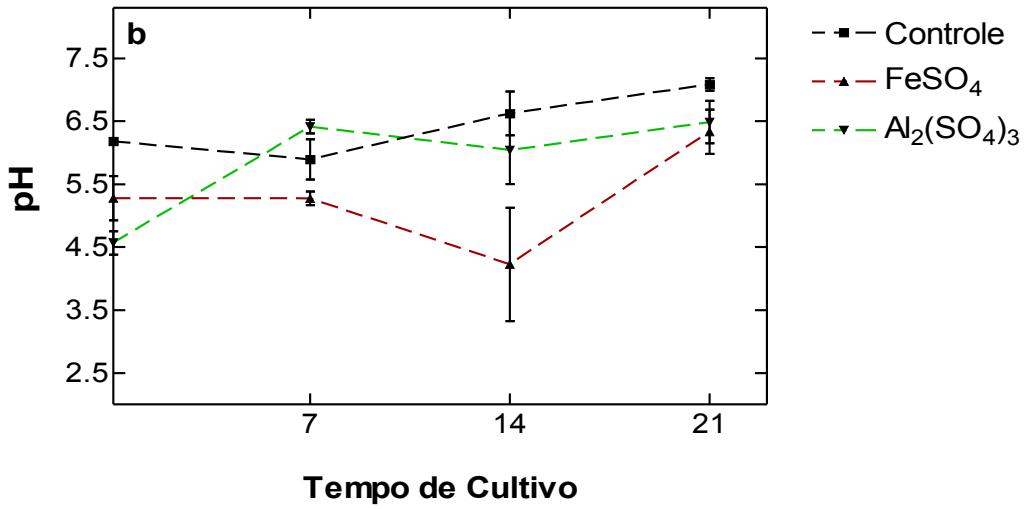


Figura 14. Variação do pH em meio de cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju*, no tempo zero e aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

a- Variação do pH em meio controle e em meios com sulfato de cobre II e sulfato de zinco.

b- Variação do pH em meio controle e em meios com sulfato de ferro II e sulfato de alumínio.

Santhiya & Ting (2006) observaram que durante a fase inicial de crescimento de linhagens do fungo *Aspergillus niger*, adaptadas ao Mo, Ni e Al, houve um decréscimo do pH do meio de cultivo, devido a presença de metabólitos excretados pelo fungo, entre os quais incluem-se prótons e ácidos orgânicos, como ácido cítrico, oxálico e glucônico. O pH da cultura adaptada a Ni, Mo e Al decresceu rapidamente de 5,5 a 2,73 em dois dias e manteve-se relativamente constante depois de 25 dias, indicando crescimento moderado. Todas a linhagens adaptadas, exceto a adaptada somente a alumínio, excretaram altas quantidades de ácido oxálicos, quando comparadas com as linhagens não adaptadas. O tipo e a concentração dos ácidos orgânicos excretados por *A. niger* foi dependente da presença de certos metais pesados e elementos traço e originaram um decréscimo do pH, manifestado durante o crescimento fúngico.

Em alguns estudos foi constatada que a remoção de cobre por *Penicillium spinulosum* decresce, com o decréscimo do pH; a biosorção de Pb, Cd, Ni and Zn por *Penicillium digitatum* foi fortemente inibida em pH menor que 3,0; a biosorção de zinco por *Saccharomyces cerevisiae* ocorreu em pH acima de 4,0 (Galun *et al.* 1983 apud Yan & Viraraghavan, 2003).

Celaya *et al.* (2000) ao realizarem estudos sobre a capacidade de biosorção de zinco por *Thiobacillus ferrooxidans* observaram que o pH da solução tem efeito marcante na capacidade de biosorção de zinco adicionado na forma de $Zn(ClO_4)_2$, principalmente devido a protonização que ocorre a valores baixos de pH e ao efeito que isso origina na química da solução. Constataram que a capacidade de adsorção é aumentada quando o pH chega a valores próximos a 6,0.

Baldrian (2003) observou através de microscopia eletrônica, que os fungos da podridão branca, como os do gênero *Pleurotus* sp., apresentam grande capacidade de assimilação de cobre, que é atribuída a diferentes mecanismos, entre eles, a adsorção de pequenos colóides de hidróxido de cobre formados ao redor do pH 6,0 o que indica o efeito do pH na adsorção do metal.

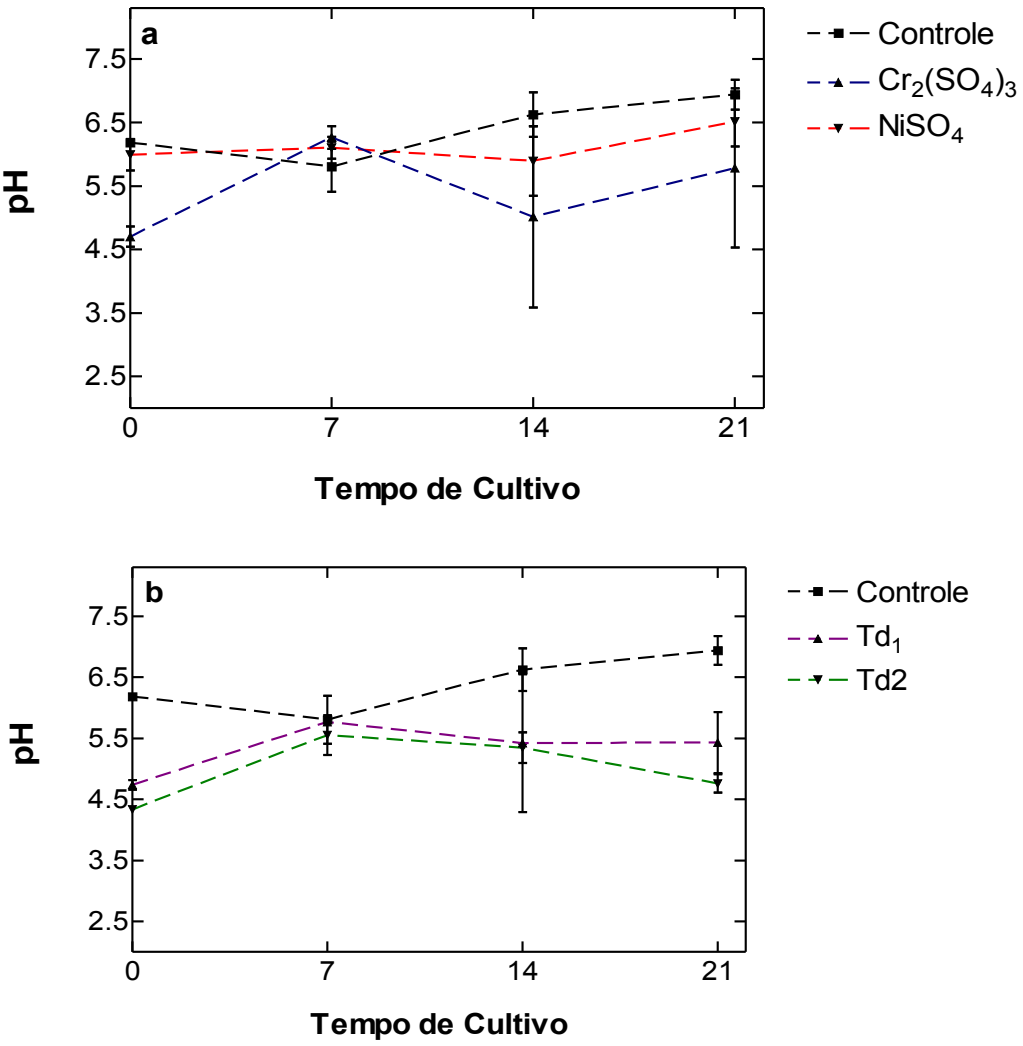


Figura 15. Variação do pH em meio de cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju,* no tempo zero e aos 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento.

a- Variação do pH em meio controle e em meios com sulfato de cromo III e sulfato de níquel II.
b- Variação do pH em meio controle e nos meios 'Td1' e 'Td2'.

A Figura 15 representa a variação do pH nos meios de cultivo aos quais foram adicionados em cada ensaio separadamente, soluções de sulfato de cromo III, sulfato de níquel II, 'Td1' que representa a mescla de todos os metais na concentração final de

30mg.100mL^{-1} em cada meio de cultivo e 'Td2' que representa meios aos quais foram adiconados a mescla de metais na concentração final de 60mg.100mL^{-1}.

Pode-se constatar ao se analisar a Figura 15, que todos os meios aos quais foram adicionados metais apresentaram aumento de pH nos 7 dias iniciais e decréscimo do mesmo no 14º dia de cultivo, comportamento semelhante ao observado nos demais ensaios representados na Figura 14, mas comportamento contrário ao observado para o controle no qual não foram feitas adições de metais. Ao final dos 21 dias de cultivo, tanto o controle como os demais ensaios com metais, apresentaram aumento do pH. Segundo Yan & Viraraghavan (2003), o aumento final de pH nas soluções nas quais estão presentes metais, pode ser devido à adsorção de íons de hidrogênio da solução aquosa pela biomassa fúngica ou neutralização de íons H^+ com OH^- liberado da biomassa.

Deng & Ting (2005b) em estudos sobre a capacidade de biosorção de Cr^{+6} por *Penicillium chrysogenum* verificaram a presença de Cr^{+3} na superfície da biomassa em uma faixa de pH de 2,5 até 10,5, sugerindo que Cr^{+6} foi reduzido a Cr^{+3} durante o processo de assimilação do metal. As análises por eles realizadas indicaram que a reações de redox ocorreram na superfície da biomassa e, dependendo do pH do meio, os íons Cr^{+3} foram liberados na solução ou adsorvidos pela biomassa.

No presente estudo a maior biosorção de cromo (III) ocorreu nos 7 dias iniciais de desenvolvimento, que coincidiram com o período em que o pH do meio de cultivo esteve em valores médios de 4,7. Este dado é corroborado por Chen *et al.* (2006) que ao aplicarem os sub-produtos do cultivo do basidiomicete *Lentinus edodes* como biosorvente para cromo constataram que a maior biosorção de cromo, ocorreu em um pH ao redor de 4,0.

Para níquel, o período de desenvolvimento (14º dia de cultivo) que correspondeu a um menor pH (média de 5,85), foi contrariamente o de maior biosorção do metal. Em estudos sobre a capacidade de biosorção de chumbo, cádmio, níquel e zinco pela biomassa viva ou morta do fungo *Mucor rouxii* tratada com NaOH, Yan & Viraraghavan (2003) observaram que no caso da biomassa morta, um pH baixo resulta em decréscimo da capacidade de biosorção. Em um pH 2,0 ou menor, ocorre a inibição da biosorção dos íons metálicos estudados, exceto para níquel; em um pH 4,0 ou superior, a biosorção dos íons metálicos cresce rapidamente e em pH acima de 5,0 a biosorção manteve-se relativamente constante.

Estudos sobre a capacidade de biosorção da alga *Oscillatoria angustissima* na presença de zinco, cobalto e cobre, constataram que as interações entre metais podem ser estudadas em um pH mais baixo, entre 4,0-5,0 o que facilitaria a disponibilidade adequada de íons metálicos (Mohapatra & Gupta, 2005).

De acordo com Kapoor *et al.* (1999) as superfícies microbianas normalmente são negativamente carregadas (em pH entre 3-6), pela ionização de grupos funcionais o que contribui para a ligação dos metais. Em um pH mais baixo, ocorre a protonação dos sítios de ligação existentes e alguns grupos funcionais podem ser positivamente carregados ou terem a intensidade da carga negativa reduzida e não interagirem com os íons de metal. Assim, cada microrganismo apresenta características próprias de biosorção, para cada metal presente no meio de cultivo, sendo que estes por suas características de solubilidade química têm diferentes valores de pH ótimo.

A sensibilidade de células vivas a pH extremos ou a altas concentrações de metais e a necessidade de fornecimento de energia para o metabolismo são alguns fatores que podem restringir o emprego destas células em biorremediação (Bakkaloglu *et al.*, 1998).

5.4 Determinação da biosorção de metais por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo sólido

Paralelamente aos estudos desenvolvidos em meio líquido, foram realizados estudos sobre o crescimento e capacidade de biosorção de metais de *P. sajor-caju* em cultivo sólido, pela análise de teores de metais presentes nos corpos de frutificação. Os ensaios constaram da adição dos metais zinco, ferro, alumínio, cobre, cromo e níquel. Em todos os ensaios, cada metal foi adicionado isoladamente aos sacos de cultivo contendo 100g (peso seco) do MCS, na forma de soluções de sulfatos, sendo que 30mg do sulfato a ser testado, foi adicionada a 100mL de água destilada, e estas soluções foram mescladas ao meio de cultivo, constituindo uma concentração final de 30 $mg.100g^{-1}$.

A Figura 16 representa os diferentes meios de cultivo sólido em sala de crescimento, para obtenção dos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju.*

Figura 16. Meios de cultivo sólido em sala de crescimento, para desenvolvimento dos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*.

Para a identificação e quantificação dos possíveis metais presentes no material constituinte do MCS, foram feitas amostras da serragem de *Pinus* spp. (serragem pura-SP), da serragem de *Pinus* spp. com a adição de 5% de farelo de trigo e 1% de $CaCO_3$ (Sadições) e dos corpos de frutificação obtidos do meio MCS, que constituiu o meio controle, no qual não houve adição de metais. Os dados obtidos, representados na Figura 17, foram comparados com aqueles encontrados nos corpos de frutificação de *P. sajor-caju* obtidos do controle, e serviram de orientação quanto aos valores de metais já presentes no meio de cultivo e no controle.

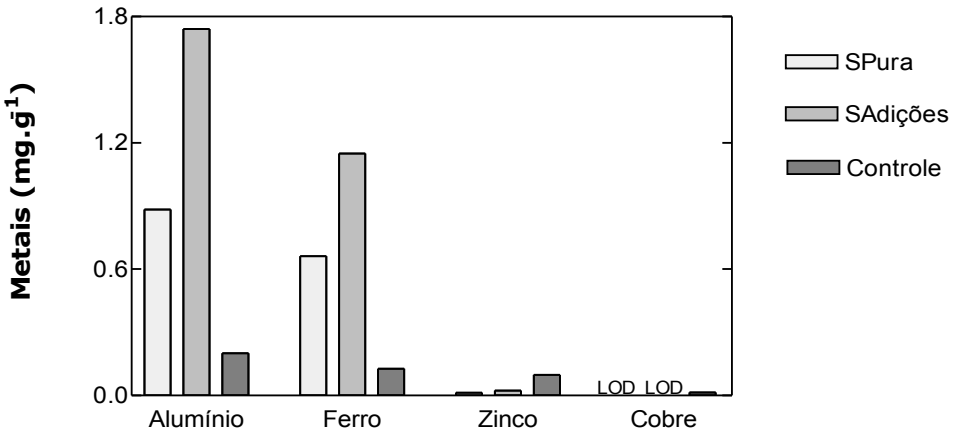


Figura 17. Quantificação dos metais presentes na serragem pura, serragem com adições e controle (corpo de frutificação) de *Pleurotus sajor-caju.*

SPura: serragem de *Pinus* spp. sem adições
Sadições: serragem de *Pinus* spp. (94%) com adição de farelo de trigo (5%) e $CaCO_3$ (1%)
Controle: corpos de frutificação obtidos do meio contendo serragem de *Pinus* spp. (94%), farelo de trigo (5%) e $CaCO_3$ (1%).

De acordo com a Figura 17, os metais alumínio, ferro e zinco foram os únicos que estiveram presentes na serragem pura (SPura), na serragem com adições e inóculo (SAdições) e também nos corpos de frutificação obtidos do controle. O cobre foi encontrado em níveis próximos ao limite de detecção (LOD) tanto na serragem pura como na serragem com adições, e encontrado em níveis de quantificação somente no corpo de frutificação de *P. sajor-caju*, onde aparece como metal constituinte das enzimas fúngicas.

As figuras a seguir indicam o comportamento do fungo perante cada um dos ensaios feitos com as adições de metais, em estágios de desenvolvimento micelial correspondente a 21 dias de cultivo, nos quais foram analisadas as amostras obtidas dos corpos de frutificação do fungo crescido nestas condições.

A análise da Figura 18, representa os ensaios onde foram adicionados sulfato de zinco II e os ensaios nos quais foi adicionado sulfato de cobre II ao meio de cultivo sólido. A biosorção de zinco corpo de frutificação de *P. sajor-caju*, foi de 0,112 $mg.g^{-1}$ de cogumelo, sendo este valor 14% superior ao encontrado no controle (0,0981 $mg.g^{-1}$). Quanto ao cobre, a biosorção foi de 0,049 $mg.g^{-1}$ de cogumelo, que indica um aumento de biosorção superior a 3,6 vezes, quando comparado com o valor presente no controle (0,0135 $mg.g^{-1}$).

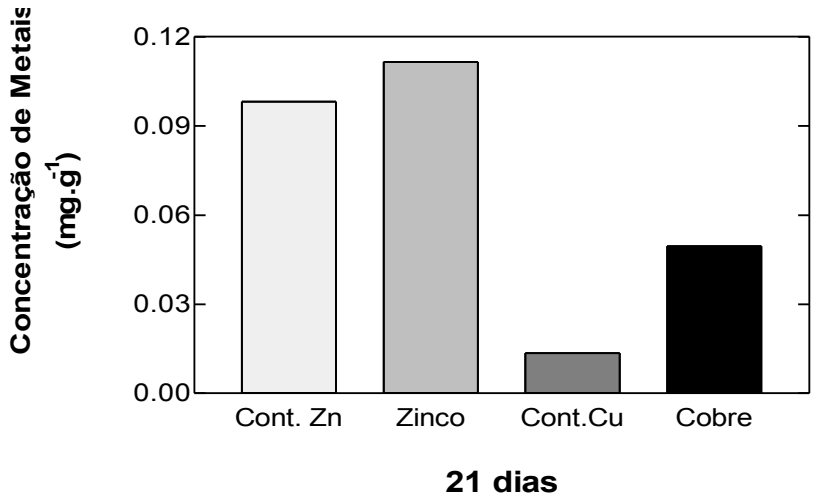


Figura 18. Biosorção de zinco e cobre pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento.

Cont. Zn e Cont. Cu – Referem-se a quantificação do metal presente nos corpos de frutificação obtidos do meio controle.
Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30$mg.100g^{-1}$.

A Tabela 10 indica alguns dos elementos presentes nos corpos de frutificação de *P. sajor-caju* quando adicionado sulfato de zinco e quando adicionado sulfato de cobre II aos meios de cultivo sólido.

Tabela 10. Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de zinco e em meios com adição de sulfato de cobre II.

	Concentração (mg.g^{-1})		
		Zinco	**Cobre**
Elementos	**Controle**	**21 dias**	**21 dias**
Zn	**0,0981**	**0,112**	0,0278
Cu	**0,0135**	0,039	**0,049**
Fe	0,127	1,015	0,053
Cr	Zero	Zero	Zero
Ni	LOD	LOD	Zero
Al	0,201	LOD	0,274
Mn	0,008	0,050	0,018
Na	Zero	Zero	Zero
P	17,84	12,87	12,45
S	2,934	1,235	1,243
K	43,74	44,67	42,15
Ca	1,044	1,246	0,573
Mg	3,093	3,328	2,275

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção

Quando analisada a Tabela 10, verifica-se a ausência do sódio nos cultivos sólidos nas condições estudadas, e a presença de altos valores de potássio, inversamente ao que foi observado em todos os estudos envolvendo cultivos líquidos. Adicionalmente, nos estudos com sulfato de zinco no meio de cultivo sólido, verifica-se valores superiores ao controle com relação a biosorção de cobre, ferro, manganês, potássio, cálcio e magnésio, indicando uma provável interação positiva ou negativa nos processos de biosorção destes íons pela membrana fúngica.

Nos meios sólidos em que houve a adição de sulfato de cobre II (Tabela 10), a quantidade de zinco biosorvida foi inferior a encontrada no controle; no entanto, nos meios sólidos nos quais foi realizada a adição de sulfato de zinco, houve uma biosorção de cobre superior aos valores encontrados no controle. Este comportamento oposto sugere que a

presença de zinco no meio de cultivo favorece a biosorção dos íons de cobre pelo corpo de frutificação e que a presença de cobre adicional, dificulta a biosorção dos íons de zinco. Há a possibilidade de que ocorram reações que favoreçam a incorporação do cobre pela membrana fúngica, na medida em que este elemento é indispensável para a formação de enzimas fúngicas como as lacases.

Os valores obtidos para cálcio, inferiores ao encontrado no controle, reforçam a hipótese já discutida anteriormente para cultivo líquido, de que os íons de cobre e cálcio estejam diretamente envolvidos nos mecanismos de troca iônica que ocorrem na parede da célula fúngica.

Na Figura 19 estão representados os ensaios nos quais houve a adição de sulfato de ferro II ao meio de cultivo e também aqueles ensaios nos quais foi adicionado sulfato de alumínio ao meio de cultivo. O valor de ferro presente nos corpos de frutificação do controle foi de 0,127 $mg.g^{-1}$ e nos corpos de frutificação coletados após 21 dias de desenvolvimento foi de 0,080 $mg.g^{-1}$, indicando um decréscimo superior a 30% na biosorção deste metal pelo cogumelo.

Ainda na Figura 19, ao analisar-se o alumínio, observa-se que a biosorção obtida pelos cogumelos do controle (0,2011 $mg.g^{-1}$), é semelhante a encontrada nos cogumelos crescidos em meios aos quais foram adicionados sulfato de alumínio (0,2007 $mg.g^{-1}$), indicando que a adição do metal ao meio não representou uma incorporação do mesmo pelo corpo de frutificação do fungo, como observado também para ferro.

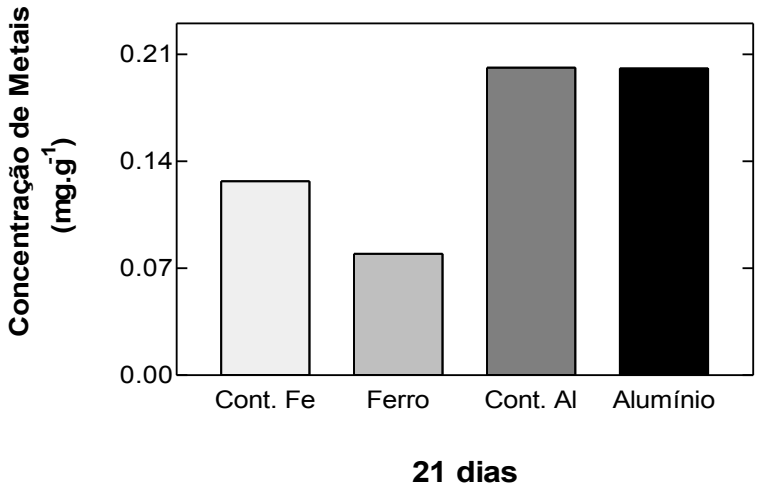


Figura 19. Biosorção de ferro e alumínio pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento.

Cont. Fe e Cont. Al – Referem-se a quantificação do metal presente nos corpos de frutificação obtidos do meio controle.

Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100g^{-1}.

Os dados representados na Figura 19 sugerem que foi alcançado o limite máximo de capacidade de biosorção destes metais já alcançado pelo fungo, devido à presença de ferro e alumínio na serragem constituinte do meio de cultivo. Neste caso, o fungo apresentaria os sítios de ligação adequados a estes metais já previamente preenchidos pelos íons de ferro e alumínio presentes no meio, de modo que mesmo adições posteriores não ocasionaram maior acúmulo do metal pelo fungo.

Quando analisados todos os metais presentes no corpo de frutificação nos diferentes estágios de desenvolvimento fúngico, como indicado na Tabela 11, observa-se que nos meios aos quais foi adicionado sulfato de ferro II, houve uma maior biosorção de manganês e potássio e menor biosorção de cálcio, quando comparados ao controle. Nos ensaios nos quais foi empregado sulfato de alumínio, ocorreu um comportamento semelhante, com uma maior biosorção de manganês, potássio, tendo como fator

diferencial, a presença de elevadas concentrações de cálcio, em comparação ao controle, indicando uma provável interação positiva entre os íons cálcio e os íons de alumínio.

Tabela 11. Concentração de metais presentes nos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor- caju* crescidos em meios com adição de sulfato de ferro II e em meios com adição de sulfato de alumínio.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)		
		Ferro	**Alumínio**
Elementos	**Controle**	**21 dias**	**21 dias**
Fe	**0,127**	**0,080**	0,068
Al	**0,201**	LOD	**0,2007**
Zn	0,0981	0,0259	0,0347
Cu	0,0135	0,0032	LOD
Cr	Zero	Zero	Zero
Ni	LOD	Zero	Zero
Mn	0,008	0,020	0,037
Na	Zero	Zero	Zero
P	17,84	13,89	15,74
S	2,934	1,403	1,461
K	43,74	54,28	44,38
Ca	1,044	0,353	1,476
Mg	3,093	2,936	3,141

LOD - Concentração próximas ao limites de detecção

Quando é realizada a análise comparativa, com relação à biosorção do potássio, observa-se que nos cultivos onde sulfato de ferro II foi adicionado, os valores de biosorção de ferro, foram inferiores àqueles encontrados no controle e a biosorção de potássio (54,28 $mg.g^{-1}$) correspondeu ao valor mais alto já alcançado, quando comparados todos os cultivos realizados, como indica a Tabela 11. Deste modo, é provável que existam interações químicas opostas com relação a biosorção de ferro pela membrana fúngica, quando na presença de potássio, sendo que quantidades mais elevadas deste elemento podem não ser favoráveis a biosorção de ferro.

A Figura 20 refere-se a biosorção de cromo e níquel em cultivo sólido de *P. sajor-caju*, em ensaios nos quais aos meios de cultivo foi adicionado sulfato de cromo III e ensaios nos quais foi adicionado sulfato de níquel II. Com relação aos testes realizados que consideraram os controles, níquel esteve presente nos corpos de frutificação em níveis próximos ao limite de detecção; o metal cromo não foi encontrado nos corpos de frutificação de *P. sajor-caju*, em nenhum dos testes realizados que consideraram os controles.

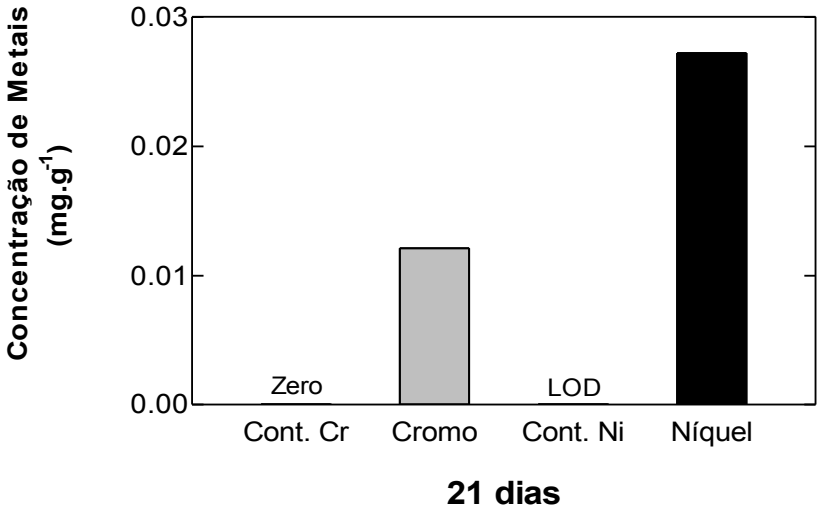


Figura 20. Biosorção de cromo e níquel pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento.

Cont. Cr e Cont. Ni – Referem-se a quantificação do metal presente nos corpos de frutificação obtidos do meio controle.
Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100g^{-1}.

A biosorção de cromo pelo corpo de frutificação de *P. sajor-caju* foi de 0,0121mg.g^{-1} e de níquel foi de 0,0272 mg.g^{-1}, demonstrando uma maior habilidade do fungo em assimilar níquel, quando comparado ao cromo. Este dado pode indicar que o fungo tenha tido dificuldades de biosorver o cromo, devido as características de estabilidade do mesmo, quando na forma de cromo III. Segundo Castilhos *et al.*, (2001) o

cromo na forma trivalente (Cr^{3+}) tem sido considerado um elemento estável no solo. Entretanto, alguns estudos com amostras de solos coletadas e mantidas com umidade natural, indicaram que o Cr^{3+} pode ser oxidado a Cr^{6+}, com permanência no solo por longo período de tempo.

A Figura 21 apresenta o corpo de frutificação obtido de meio de cultivo sólido ao qual foi adicionado sulfato de níquel II.

Figura 21. Corpo de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* obtido de cultivo sólido com sulfato de níquel II adicionado ao meio de cultivo.

Os corpos de frutificação obtidos dos cultivos nos quais sulfato de níquel II foi adicionado ao meio de cultivo, além de serem obtidos em pouca quantidade, apresentaram alterações morfológicas (Figura 21) quando comparados àqueles coletados dos meios controle, sem adições de metais.

A Tabela 12 representa a biosorção de outros elementos quando adicionado aos meios de cultivo sólido, sulfato de cromo III e quando adicionado sulfato de níquel II.

Tabela 12. Concentração de metais presentes nos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição de sulfato de cromo III e em meios com adição de sulfato de níquel II.

	Concentração ($mg.g^{-1}$)		
		Cromo	**Níquel**
Elementos	**Controle**	**21 dias**	**21 dias**
Cr	Zero	**0,0121**	LOD
Ni	LOD	Zero	**0,0272**
Zn	0,0981	0,0364	0,0411
Cu	0,0135	LOD	LOD
Fe	0,127	0,079	0,094
Al	0,201	LOD	LOD
Mn	0,008	0,022	0,017
Na	Zero	Zero	Zero
P	17,84	10,30	8,220
S	2,934	1,647	1,350
K	43,74	21,35	19,93
Ca	1,044	0,425	0,647
Mg	3,093	1,949	1,915

LOD – Concentrações próximas ao limite de detecção.

Todos os elementos analisados apresentaram biosorção menor quando comparados com os valores obtidos no controle, com exceção do manganês que se apresentou em concentração superior ao valor do controle. Este comportamento semelhante nos dois ensaios distintos pode sinalizar que o mesmo tipo de mecanismo químico está envolvido no processo de biosorção destes elementos, principalmente quando se considera que ambos metais não são encontrados em circunstâncias normais no fungo, em nenhum tipo de cultivo realizado.

Adicionalmente, foram feitos ensaios nos quais o comportamento do fungo crescido em meio sólido, foi observado em dois testes distintos: um teste denominado ‘Td1’ no qual houve a adição de 5mg de cada um dos sais de metais estudados, em 100mL de água

destilada, que foi adicionada ao MCS, correspondendo a uma concentração final de 30mg.100g^{-1} de meio sólido; o outro teste foi denominado ‘Td2’ nos quais foram utilizadas 10mg de cada um dos sais de metais estudados, diluídas em 100mL de água destilada, que foi adicionada ao MCS, representando uma concentração final de 60 mg.100g^{-1} de meio sólido.

Os resultados obtidos após a realização do teste denominado ‘Td1’ e os respectivos valores de biosorção alcançados pelos corpos de frutificação de *P. sajor-caju* com 21 dias de desenvolvimento, estão representados na Figura 22. Da análise dos resultados, constata-se que houve somente a biosorção dos metais ferro e zinco, sendo que os demais metais que constituíram as soluções adicionadas, a constar, cobre, cromo, níquel e alumínio, não foram encontrados nos corpos de frutificação. Este dado indica que em situações em que há interações entre diferentes metais, como na condição estudada, preferencialmente os metais ferro e zinco são assimilados, o que pode ocorrer por diversos mecanismos, entre eles maior solubilidade destes e/ou maior afinidade com a membrana fúngica, a presença de alumínio e ferro na serragem constituinte do MCS, interações químicas que podem potencializar o efeito citotóxico de um metal em relação ao outro, entre outras hipóteses.

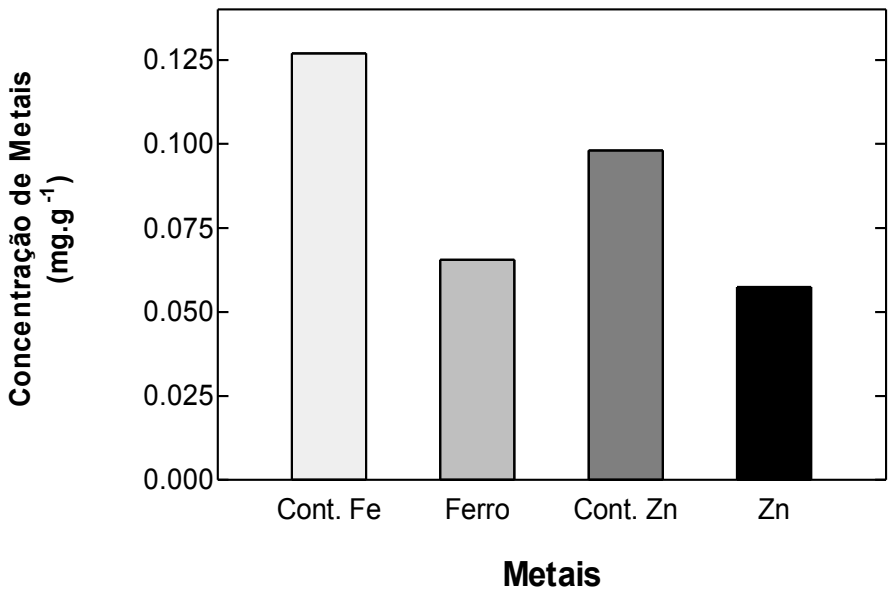


Figura 22. Biosorção de ferro e zinco pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento, quando da adição da solução 'Td1'.

Cont. Fe e Cont. Zn – Referem-se a quantificação do metal presente nos corpos de frutificação obtidos do meio controle.
Meios de cultivo com sais metálicos na concentração final de 30mg.100g^{-1}, adicionadas a 100g de meio de cultivo.

Os valores máximos de biosorção de ferro e zinco obtidos pelos corpos de frutificação de *P. sajor-caju*, quando a solução 'Td1' foi adicionada ao meio de cultivo, corresponderam, respectivamente, a 0,0656 mg.g^{-1} e 0,0574 mg.g^{-1} e foram inferiores aos encontrados no controle, que corresponderam a 0,127 mg.g^{-1} para ferro e 0,0981 mg.g^{-1} para zinco. Os menores valores de biosorção obtidos, em comparação aos do controle podem ser ocasionados pelas características dos fungos, que como outros microrganismos estão em constante competição por nutrientes limitantes, e quando há uma acumulação de ferro associada à presença de vestígios de outros metais, esta combinação de fatores, torna a ambos, por suas características de solubilidade e redox, relativamente bioindisponíveis e fortemente citotóxicos (Kosman, 2003).

Segundo Baldrian *et al.* (2005) durante o cultivo de *Pleurotus ostreatus* em palha de milho nos quais a presença de metais Cu, Mn, Pb, e Zn. foram adicionados ao meio na concentração de 10 $\mu.g^{-1}$ somente 3-6% (Fe, Pb) ou 30-45% (Cu, Mn, Zn) da quantidade total adicionada, foi extraível, e disponibilizada para o fungo. *Pleurotus cornucopiae* crescido em meio de cultivo contendo palha de milho suplementada com os metais cádmio e mercúrio, conseguiu translocar para os corpos de frutificação cerca de 3,5% de Cd e 12% Hg. A quantidade de translocação de Cd e Hg pelo micélio de *Agrocybe aegerita* decresceu com o aumento da concentração de metais, devido provavelmente à toxicidade ocasionada pela presença destes nos meios de cultivo.

A Tabela 13 representa a biosorção de outros elementos, pelo corpo de frutificação de *P. sajor-caju,* em meios aos quais todos os sulfatos foram adicionados simultaneamente, e sua comparação com o controle.

Com relação ao conteúdo de zinco, tem sido relatado que ele se apresenta em maior concentração em áreas não poluídas comparadas a áreas poluídas, isto deve-se ao fato do zinco ser um elemento biogênico e transportado facilmente na forma do cátion bivalente, desde o micélio fúngico até os corpos de frutificação, onde é preferencialmente conectado aos sítios de ligação fúngico, mas, no decorrer do tempo de exposição, pode ser substituído por outros metais (Curkova *et al*., 2004).

Tabela 13. Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em meios com adição da solução 'Td1' na concentração final de 30mg.100g^{-1}.

Concentração (mg.g^{-1})		
	Td1	
Elementos	**Controle**	**21 dias**
Cr	Zero	Zero
Ni	LOD	LOD
Fe	0,127	0,066
Zn	0,0981	0,0574
Cu	0,0135	LOD
Al	0,201	LOD
Mn	0,008	0,015
Na	Zero	LOD
P	17,84	12,38
S	2,934	1,980
K	43,74	31,77
Ca	1,044	0,148
Mg	3,093	1,866

LOD – Concentrações próximas ao limite de detecção.

Nos meios de cultivo aos quais os metais foram adicionados simultaneamente, houve uma diminuição da biosorção de todos os elementos biosorvidos, quando estes valores são comparados aos representados pelo controle (Tabela 13), indicando uma provável inibição causada pela presença de todos os metais associados. Destaca-se que em todos os estudos realizados envolvendo o cultivo sólido, em nenhum deles foi constatada a letalidade das adições para o fungo, na medida em que mesmo em condições em que o crescimento foi inibido, houve a obtenção de corpos de frutificação do *P. sajor-caju.*

O outro ensaio realizado, denominado 'Td2', também apresentou resultados semelhantes aos obtidos anteriormente no teste denominado 'Td1'. A Figura 23 representa os resultados deste teste com a respectiva biosorção alcançada pelo corpo de frutificação de *P. sajor-caju*, e constata-se que novamente, como representado na Figura 22, houve

biosorção somente dos metais ferro e zinco, sendo que os demais metais que constituíram as soluções adicionadas, não foram encontrados nos corpos de frutificação, corroborando a hipótese de que preferencialmente, os metais ferro e zinco são assimilados quando em agregados em soluções que contenham alumínio, cobre, cromo ou níquel, como na condição estudada.

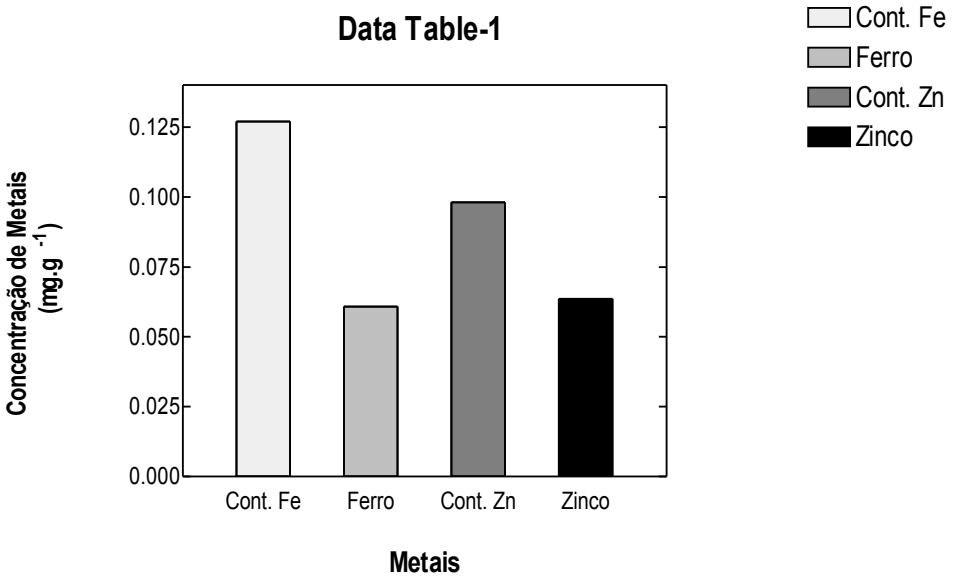


Figura 23. Biosorção de ferro e zinco pelos corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju*, obtidos em cultivo sólido com 21 dias de desenvolvimento, quando da adição da solução 'Td2'.

Cont. Fe e Cont. Zn – Referem-se a quantificação do metal presente nos corpos de frutificação obtidos do meio controle.
Meios de cultivo com sais metálicos contendo a solução 'Td2' contituída de todos os metais na concentração final de 60mg.100g^{-1}.

Os valores máximos de biosorção de ferro e zinco quando o ensaio denominado 'Td2' foi realizado, corresponderam respectivamente, a 0,0608 mg.g^{-1} e 0,0636 mg.g^{-1}, sendo estes valores bastante próximos aos obtidos quando realizado o teste denominado 'Td1', representado na Figura 18. Este dado indica que se por um lado, a solução denominada 'Td2', constituída por concentrações duas vezes superior as anteriormente

empregadas, não promoveu um aumento na biosorção fúngica, tampouco ocasionou uma letalidade que impedisse a formação dos corpos de frutificação de *P. sajor-caju.*

Tabela 14. Concentração de metais presentes em corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* crescidos em ensaios denominado 'Td2' com todos os sulfatos testados na concentração final de 60mg.100g^{-1}.

Concentração (mg.g^{-1})		
	Td2	
Elementos	**Controle**	**21 dias**
Cr	Zero	Zero
Ni	LOD	LOD
Fe	0,127	0,0608
Zn	0,0981	0,0636
Cu	0,0135	LOD
Al	0,201	LOD
Mn	0,008	0,012
Na	Zero	LOD
P	17,84	11,17
S	2,934	1,964
K	43,74	22,66
Ca	1,044	0,149
Mg	3,093	1,609

LOD – Concentrações próximas ao limite de detecção.

Comparando-se os dados obtidos na Tabela 13 como os da Tabela 14, observa-se que os valores de biosorção foram semelhantes nos dois ensaios realizados, no entanto, os valores de potássio apresentaram uma diminuição significativa no ensaio 'Td2', novamente corroborando a hipótese de comportamento semelhante quando da adição conjunta de todos os sais metálicos, mesmo que estas estejam em concentrações distintas. Tanto no ensaio 'Td1', como no ensaio 'Td2', os valores de biosorção encontrados para manganês, foram superiores ao obtidos para o controle.

Baldrian (2003) em experimentos usando os isótopos radioativos ^{109}Cd e ^{203}Hg observou que os corpos de frutificação do fungo comunicam-se com seu meio de cultivo. A comunicação entre os corpos de frutificação e os meios de cultivo, ocorre em ambas direções, como constatado para os metais aplicados nos corpos de frutificação de *Agrocybe aegerita* que foram parcialmente translocados para os meios de cultivo (palha de milho) em várias colheitas consecutivas. A sensibilidade dos corpos de frutificação à presença de metais, difere de espécie para espécie, sendo que *Agrocybe perfecta* não produz corpos de frutificação durante o crescimento em palha de milho com a concentração de cádmio de 0,05-1mM. A interação do fungo com os metais pesados, causou severas modificações nos processos fisiológicos, entretanto o fungo desenvolveu ativos mecanismos de defesa para aliviar a toxicidade de metais.

A concentração inicial de metais e outros fatores como tempo de contato, dosagem de biomassa, temperatura e pH, podem influenciar a biosorção de metais por fungos. A aparente falta de correlação entre a tolerância e a biosorção de metais por biomassas vivas ou não-vivas, pode ocorrer devido às diferenças nos mecanismos de resistência, os quais podem não estar ligados com os de biosorção (Zafar *et al*., 2007).

5.5 Capacidade de biosorção de *Pleurotus sajor-caju* em cultivo líquido, perante adição de metais em diferentes estágios de crescimento fúngico

Para ser testada a capacidade de crescimento e biosorção de *P. sajor-caju* quando os metais são adicionados em diferentes etapas de desenvolvimento, foram realizados ensaios nos quais os metais foram adicionados após o 7º dia de desenvolvimento fúngico em meio de cultivo líquido. Os resultados obtidos foram comparados com os

resultados dos demais ensaios realizados que sempre se caracterizaram pela adição dos metais no momento da inoculação do fungo ao meio de cultivo líquido. Os metais testados nestas condições foram empregados na forma de sulfatos de cobre II, alumínio, ferro II e zinco e a Tabela 15 apresenta os resultados comparativos destes ensaios.

Na Tabela 15 estão simbolizadas a biosorção de cobre, alumínio, ferro e zinco nos ensaios nos quais as soluções dos metais foram adicionadas ao meio de cultivo líquido no momento da inoculação do fungo (14a e 21a) e após 7 dias da realização do inóculo fúngico (14d e 21d); também estão representados para fins comparativos, as concentrações dos metais presente nos controles líquido e nos cultivos sólidos com 21 dias de desenvolvimento.

Tabela 15. Comparação entre as diferentes condições de cultivo e a biosorção dos metais cobre, alumínio, ferro e zinco, por *Pleurotus sajor-caju*.

Cultivo Líquido (Biosorção em mg.g^{-1})							**Cultivo Sólido (Biosorção mg.g^{-1})**	
Metais (sulfatos)	Controle	7 dias	14 dias (a)	14 dias (d)	21dias (a)	21 dias (d)	Controle	21 dias
Cobre	0,012	0,835	3,609	16,04	10,50	1,26	0,014	0,049
Alumínio	2,006	8,666	7,969	13,79	18,63	23,20	0,201	0,201
Ferro	0,262	20,453	2,275	26,46	2,77	27,37	0,127	0,080
Zinco	0,045	-	29,14	40,76	5,73	-	0,098	0,112

(a) adição da solução dos metais simultânea a inoculação fúngica.
(d) adição da solução dos metais 7 dias após a inoculação fúngica.

Constata-se que nos ensaios nos quais o sulfato de cobre II foi adicionado no momento da inoculação do fungo (14a) houve uma menor biosorção do metal em comparação com os cultivos nos quais ele foi adicionado 7 dias após a realização do inóculo fúngico (14d). Quando analisados todos os testes realizados nas diferentes condições estudadas, verifica-se que aquele em que sulfato de cobre II esteve presente, foi

o único em que houve maior biosorção de um metal adicionado no momento da inoculação (21a: 10,50 $mg.g^{-1}$) em comparação com o mesmo período de tempo (21d). Este dado pode indicar que ocorreu lise celular de algumas células fúngicas, na medida em que em uma etapa anterior de desenvolvimento (14d: 16,04$mg.g^{-1}$) já havia ocorrido a máxima biosorção de cobre no cultivo líquido, nas condições de estudo nas quais o sulfato de cobre II foi adicionado 7 dias após a inoculação fúngica.

Santhiya & Ting (2006) relatam que o micélio degradado naturalmente (por autólise), ou artificialmente (por calor ou por trituração) exibe altos níveis de biosorção de metais, provavelmente como uma conseqüência da disponibilidade de uma maior superfície de contato e da destruição das membranas das células, resultando na exposição de componentes intracelulares e sítios de ligação existentes na superfície destes componentes.

A comparação entre as distintas condições de cultivo testadas e a biosorção de alumínio por *P. sajor-caju* também está representada na Tabela 15, e observa-se que a biosorção de alumínio foi menor tanto no 14º (14a) como no 21º dia de desenvolvimento (21a), em condições de cultivo líquido nas quais a realização do inóculo e a adição do sulfato de alumínio foram simultâneas.

Nos demais testes representados na Tabela 15, referentes ao sulfato de alumínio, observa-se também que os dados obtidos de biosorção de alumínio foram superiores nos cultivos líquidos em relação a qualquer condição testada quando estas foram comparadas com os cultivos sólidos.

Os dados referentes a biosorção de ferro nas diferentes condições de cultivo, também estão indicados na Tabela 15. O fungo apresentou melhor condição de biosorver o metal quando este foi adicionado ao meio de cultivo 7 dias após o desenvolvimento do inóculo, pois no 14º (14d) e 21º dia de desenvolvimento (21d) , os valores de biosorção de ferro

foram respectivamente de 26,46 $mg.g^{-1}$ e 27,37 $mg.g^{-1}$, sendo 3,5 vezes superiores aqueles obtidos na mesma etapa de crescimento, mas com a adição do metal feita no momento da inoculação fúngica.

A biosorção de zinco também está representada na Tabela 15 e quando comparada à adição do sulfato de zinco no momento da inoculação fúngica observa-se que esta foi menos efetiva em termos de biosorção do metal do que aquela em que os ensaios foram feitos com a adição do metal 7 dias após o desenvolvimento fúngico.

Os dados obtidos sugerem que no caso da utilização de *P. sajor-caju* em condições ambientais nas quais o cobre, alumínio, ferro ou zinco estejam presentes como contaminantes do meio líquido, seria indicado que o fungo passasse por um período prévio de crescimento sem a presença do metal, para posteriormente ser empregado no meio onde o metal estivesse presente. Neste caso, a presença de um inóculo mais desenvolvido, resultaria em uma biosorção mais efetiva, considerando-se os diferentes tempos de biosorção máxima obtidos para cada metal.

A Figura 24 refere-se a variação do pH dos ensaios nos quais os metais foram adicionados no 7º dia de desenvolvimento. A medida do pH do tempo zero até o 7º dia coincide com os dados do controle, porque todos os frascos continham o mesmo MCL, sem a adição dos metais e, portanto, todos apresentavam a mesma composição química de meio, até o 7º dia de desenvolvimento, sendo que a análise do pH do 7º dia, foi realizada imediatamente antes da adição dos metais. A partir de então, alguns dos ensaios apresentavam os metais no MCL e outros continuaram sem a adição dos metais, constituindo o controle.

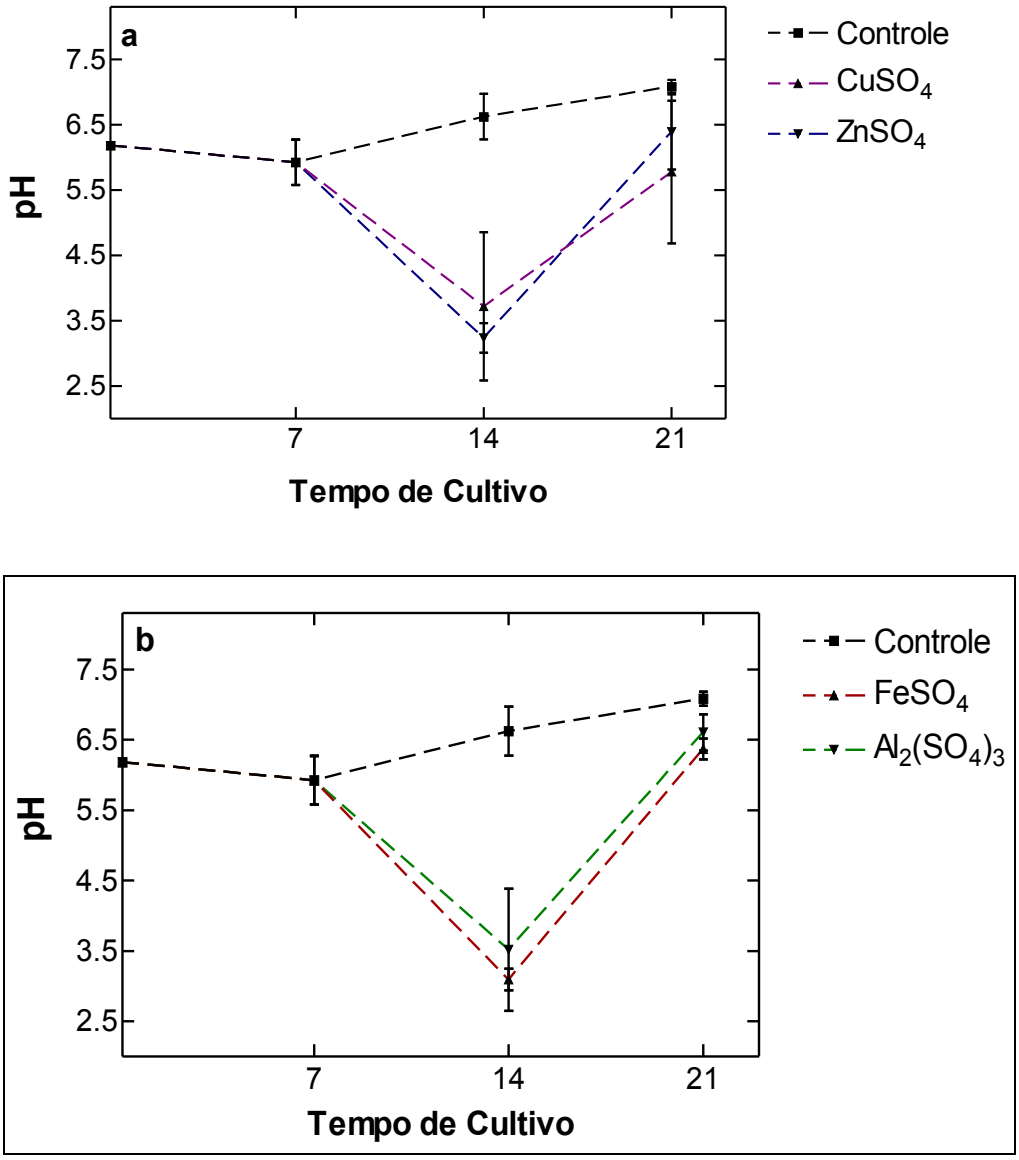


Figura 24. Variação do pH em meio de cultivo líquido de *Pleurotus sajor-caju* crescido em cultivo líquido, com adição de metais no 7º dia de desenvolvimento.

a- Variação do pH em meio controle e em meios com sulfato de cobre II e sulfato de zinco.
b- Variação do pH em meio controle e em meios com sulfato de ferro II e sulfato de alumínio.

Comparando-se os valores de pH obtidos nos ensaios nos quais os metais foram adicionados no momento do inóculo (Figura 14) com valores dos ensaios nos quais os

metais foram adicionados ao meio de cultivo no 7º dia de desenvolvimento (Figura 24), constata-se que a adição dos metais no primeiro ensaio (Figura 14), levando em consideração um período de tempo de 7 dias após esta adição, em geral ocasionou aumento do pH ($CuSO_4$, $Al_2 (SO_4)_3$ e $ZnSO_4$) ou leve declínio do pH ($FeSO_4$), ao contrário do observado na Figura 20, quando levado em conta um período de 7 dias após a adição dos metais (correspondente ao 14º de desenvolvimento), houve um decréscimo acentuado de pH, inclusive com valores inferiores ao pH 3,5, em todos os ensaios observados com exceção do controle.

Este dado pode ser relevante na medida que considerarmos que a adição de metais, realizada em uma etapa de mais avançada de desenvolvimento fúngico, gerou um decréscimo significativo do pH, o que pode ter sido causado por maior solubilidade dos íons com conseqüente maior disponibilidade dos mesmos para o fungo. Este conjunto de fatores pode ter contribuído para obtenção de valores superiores de biosorção fúngica (Tabela 15), quando comparados com os demais ensaios realizados, nos quais a adição de metais foi simultânea à inoculação fúngica.

Gabriel *et al.* (2001) observaram que o pH ótimo para biosorção de cobre, adicionados ao meio de cultivo dos basidiomicetes *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus*, na forma de $CuSO_4.7\ H_2O$ ($100mg.L^{-1}$), situa-se entre 3,5 e 4,0, com uma biosorção máxima destes elementos pelos fungos, respectivamente de, 5.08 $mg.g^{-1}$ e 4,77 $mg.g^{-1}$.

Coincidentemente, tanto os ensaios representados na Figura 14 como os da Figura 24, indicam que aos 21 dias de desenvolvimento, os valores de pH ficaram próximos a 6,0, independentemente de todas as variáveis constantes em cada ensaio, o que pode indicar a atuação conjunta de mecanismos distintos, como a diminuição de íons metálicos

disponíveis na solução, pela efetividade da biosorção fúngica, bem como uma menor excreção de ácidos orgânicos pelo fungo, na medida em que os íons de metais são biosorvidos, o que originaria um aumento do pH.

Quando são comparados os valores assimilação da massa micelial, obtidos em todos os ensaios realizados em cultivo líquido, constata-se que sempre ocorreu uma biosorção mais elevada neste tipo de cultivo em todas as condições testadas em relação aquelas nas quais o fungo foi crescido em meio sólido. Há a possibilidade de que este dado também indique que em cultivo líquido a adaptação fúngica ocorre mais facilmente, principalmente porque nas condições de cultivo líquido a interferência de fatores externos pode ser monitorada, bem como a adição de outros nutrientes além dos já presentes no meio de cultivo, o que possibilita um controle mais efetivo dos processos a serem estudados.

Em estudos feitos com o cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus* na presença de Cd, Cu, Pb e Zn, constatou-se que o conteúdo real de metais encontrados nos 'pellets' é várias vezes superior àqueles encontrados nos corpos de frutificação do fungo. A média das concentrações de metais pesados encontradas nos corpos de frutificação de diferentes espécies variou de acordo com a espécie selecionada, mas em geral, para cobre, as concentrações variam de 1-10 $\mu g\ g^{-1}$ (Curkova *et al*., 2004).

A possibilidade de uma distribuição desigual dos metais contidos nas soluções adicionadas ao cultivo sólido, também pode levar a formação do corpo de frutificação em um local do meio de cultivo no qual houve um crescimento micelial mais rápido devido a uma menor concentração de metais neste dado local. Assim, o fungo pode preferencialmente, inclusive por questões relativas a toxicidade celular causada pela presença dos metais, realizar primeiramente a colonização de áreas onde estes estejam menos concentrados e depois partirem para colonização de áreas de maior concentração

metálica. De acordo com os estudos realizados por Fomina *et al.* (2003) solos contaminados com metal, freqüentemente contêm uma distribuição heterogênea da concentração de metal e a habilidade do fungo de colonizar tais áreas contaminadas, pode ser influenciada pela disponibilidade das fontes nutricionais, como fonte de carbono disponível.

Os dados obtidos podem servir na definição de uma estratégia de tratamento de biorremediação a ser aplicada em condições de contaminação ambiental, onde tais metais encontrem-se presentes em meio líquido ou em meio sólido. Como parte da estratégia a ser aplicada é necessário levar em consideração as características de biosorção do fungo, perante cada metal eventualmente presente no local contaminado, o que indicará se será mais efetiva a inoculação do fungo simultânea à adição dos metais ou se um período prévio de crescimento fúngico seguido da adição dos metais, é mais indicado para obtenção de um processo mais efetivo de biosorção por *P. sajor-caju.* Deste modo verifica-se que a utilização da massa micelial de *P. sajor-caju* é indicada para a biosorção de metais como cobre, zinco, ferro, alumínio, cromo e níquel, presentes nos distintos meios líquidos.

5.6 Determinação da atividade enzimática em meio sólido perante a adição das soluções de metais

Os resultados a seguir referem-se a análise da secreção das enzimas lacases e manganês peroxidases em relação aos diferentes ensaios realizados nos cultivos sólidos, aos quais foram adicionados os sulfatos de cobre, zinco, ferro e alumínio em soluções de 30mg do metal a ser estudado diluídos em 100 mL de água destilada e agregados ao meio MCS, constituindo uma concentração final de 30mg.100g^{-1}.

A quantificação de lacases liberadas nos diferentes tratamentos após 7, 14 e 21 dias de cultivo sólido, mostrou-se claramente variável (Figura 25). Verifica-se que na fase inicial de desenvolvimento, correspondente a 7 dias de cultivo, o controle apresentou maior produção de lacases em um curto período de tempo, indicando uma provável inibição inicial da produção, pelos metais presentes no meio de cultivo. Quando o desenvolvimento micelial chegou ao 21º dia, houve um aumento da produção enzimática em todos os meios onde foram adicionados os metais e a manutenção da produção enzimática pelo controle em patamares próximos aos observados nas outras etapas de desenvolvimento.

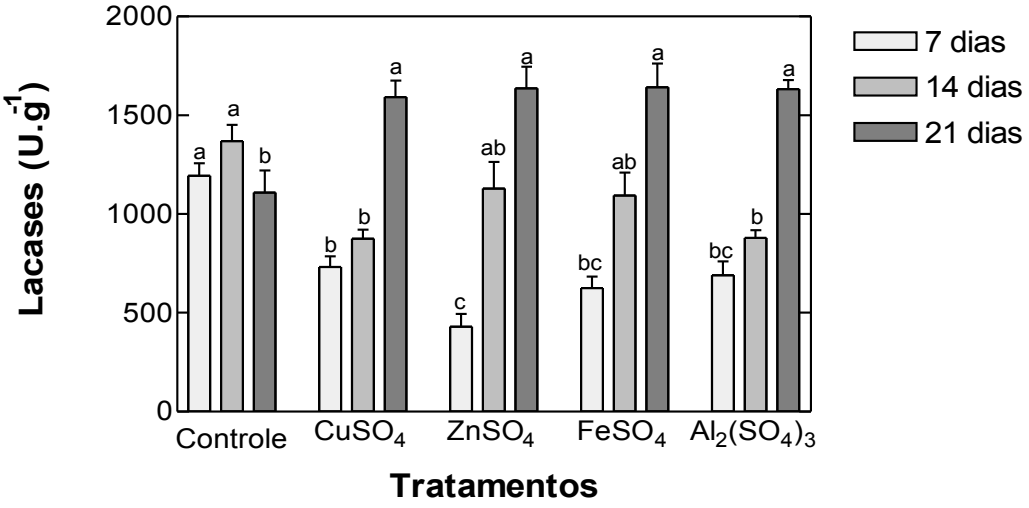


Figura 25. Atividade de lacases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo.

Os extratos enzimáticos dos tratamentos foram obtidos de 25g de massa úmida em 50mL de água destilada submetidos a 30 minutos em agitação.

Hatvani & Mécs (2003) observaram que a atividade de lacases de *Lentinula edodes 'in vitro'* foi inibida em 50% em concentrações de 1,4 μM de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$. Outros metais

como adicionados como $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, não inibiram a atividade da enzima em concentrações de até 3 mM e, ao contrário do observado para ferro, a adição dos sais de metais investigados, aumentou a produção de lacases.

A maior produção de lacases nos meios onde foram adicionados metais, em uma etapa mais longa de desenvolvimento, pode indicar uma resposta adaptativa do fungo ás altas concentrações de metais. Segundo Galhaup & Haltrich (2001), o basidiomicete *Trametes pubescens* MB 89 apresentou estimulação na formação de lacases quando Cu^{+2} foi usado em um meio de cultura simples em concentrações 1,5-2,0 mM. Os valores de máxima atividade, foram obtidos com a suplementação de cobre durante a fase exponencial de crescimento sendo que em adições realizadas durante a fase estacionária, houve acentuada redução na produtividade de lacases. Estudos realizados por Baldrian *et al*. (2005) constataram que a atividade de lacases em meios de cultivo sólido de *Pleurotus ostreatus*, nos quais foram adicionados Cu, Mn, Pb e Zn , foi aumentada em todos os meios, para todos os metais testados.

Os efeitos positivos de Hg, Cd, e Cu na atividade de lacases têm sido relatados e no caso do cobre especificamente, ocorreu não somente o aumento da secreção de lacases, mas houve também um efeito de estabilização das mesmas pela ação do metal. A presença de cobre induziu a transcrição do gene de lacases e afetou positivamente a atividade e estabilidade das enzimas. Os efeitos de outros metais pesados, necessitam ser esclarecidos. Os resultados deste estudo sugerem que sais de metais pesados podem ser usados para melhorar a produção e estabilização de enzimas durante a produção de lacases em larga escala e para aplicações biotecnológicas das mesmas (Hatvani & Mécs, 2003).

A Figura 26 representa diferentes estágios de desenvolvimento de *P. sajor-caju* crescido em meios sólidos, aos quais foram adicionados isoladamente, sais de cobre, zinco, ferro e alumínio, e a atividade de manganês peroxidases em resposta às distintas variações dos meios de cultivo.

A análise da Figura 26, indica uma alta secreção de MnP no meio de cultivo ao qual foi adicionado sulfato de alumínio, em uma etapa inicial de desenvolvimento correspondente aos 7 dias de cultivo. Durante as etapas posteriores de desenvolvimento, todos os meios aos quais foram adicionados os demais sais com metais, apresentaram secreção de MnP altamente superior aquelas encontradas no controle, indicando que a presença dos metais nas concentrações empregadas, foram favoráveis a secreção de MnP em todas as etapas de desenvolvimento.

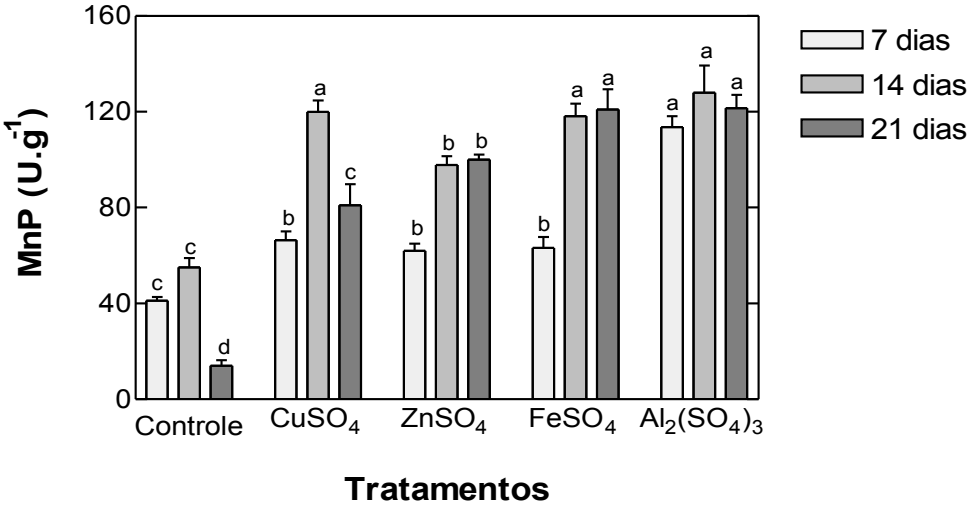


Figura 26. Atividade de manganês peroxidases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo.

Os extratos enzimáticos dos tratamentos foram obtidos de 25g de massa úmida em 50mL de água destilada submetidos a 30 minutos em agitação.

Rogalski *et al.* (2006) ao realizarem estudos da produção de MnP em cultivo líquido com o basiodiomicete *Nematoloma frowardii* indicaram que aeração, baixa concentração de nitrogênio ao meio e concentração de 2mM de Mn^{+2}, são fatores que aumentam a produtividade de MnP no processo fermentativo. No entanto, não foram encontrados dados na literatura relativos ao aumento de produção de MnP em cultivo sólido de *P. sajor-caju*, nos quais soluções de metais foram adiconadas ao meio de cultivo.

Hatvani & Mécs (2003) observaram que metais pesados como Zn, Cu, Fe e Cd, inibiram a produção de MnP e a descolorização de corantes por *L. edodes* crescido em meio sólido. Adicionalmente com excessão de cádmio e ferro, a atividade de MnP *'in vitro'* foi muito tolerante a altos níveis dos metais pesados testados. A atividade de MnP *'in vitro'* foi sensível a Cd e Fe, nas concentrações de 0,23 mM e 0,13 mM respectivamente, e causaram 50% de inibição da produção enzimática. Os outros metais pesados não inibiram a ativação da enzima em concentrações de até 3mM.

Para corroborar os dados que constituiram a Figuras 25 e a Figura 26, foi contruída a Tabela 16, que representa os dados dos controles, comparados com os tratamentos realizados, nas diferentes etapas de cultivo, tamto para a atividade de lacases como para manganês peroxidases. Os dados apresentados indicam quais tratamentos que apresentaram ou não apresentaram diferença significativa para $p<0,05$.

Tabela 16. Análise estatística dos dados que constituíram a Figura 25 e Figura 26.

Lacases (Figura 25)				Manganês Peroxidases (Figura 26)			
Dias de Cultivo	Tratamentos		Significância (r)	Dias de Cultivo	Tratamentos		Significância (r)
7	Controle	$CuSO_4$	0,918	7	Controle	$CuSO_4$	0,834
	Controle	$ZnSO_4$	0,920		Controle	$ZnSO_4$	0,825
	Controle	$FeSO_4$	0,972		Controle	$FeSO_4$	0,752
	Controle	$Al_2(SO_4)_3$	0,946		Controle	$Al_2(SO_4)_3$	0,973
14	Controle	$CuSO_4$	0,839	14	Controle	$CuSO_4$	0,949
	Controle	$ZnSO_4$	0,402*		Controle	$ZnSO_4$	0,986
	Controle	$FeSO_4$	0,246*		Controle	$FeSO_4$	0,921
	Controle	$Al_2(SO_4)_3$	0,867		Controle	$Al_2(SO_4)_3$	0,854
21	Controle	$CuSO_4$	0,677	21	Controle	$CuSO_4$	0,929
	Controle	$ZnSO_4$	0,724		Controle	$ZnSO_4$	0,985
	Controle	$FeSO_4$	0,879		Controle	$FeSO_4$	0,954
	Controle	$Al_2(SO_4)_3$	0,827		Controle	$Al_2(SO_4)_3$	0,978

*Tratamentos que não apresentaram diferença significativa para $p<0,05$.
Demais tratamentos apresentam diferença significativa.

Em uma etapa posterior dos estudos, conforme indicado na Figura 27, foram realizados ensaios com sulfato de cromo III, sulfato de níquel, todos os sais associados em outros dois ensaios, o denominado ‘Td1’, com concentração final de $30mg.g^{-1}$ e o ‘Td2’,

utilizando todos os sais associados, mesclados ao meio de cultivo sólido em uma concentração final de 60mg.100g^{-1}.

105

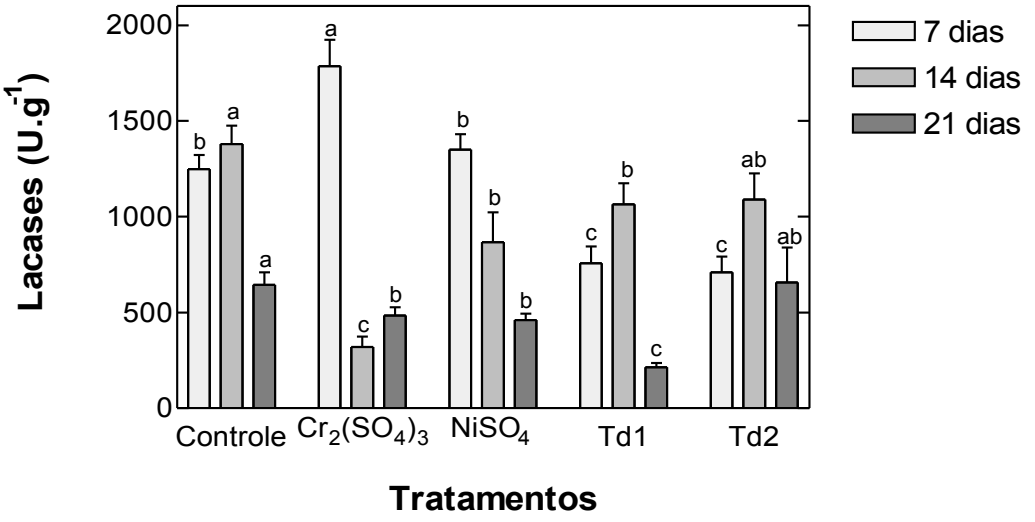


Figura 27. Atividade de lacases em meios contendo metais após 7,14 e 21 dias de cultivo.

Os extratos enzimáticos dos tratamentos foram obtidos de 25g de massa úmida em 50mL de água destilada submetidos a 30 minutos em agitação.

A atividade de lacases em cultivos com 7 dias de desenvolvimento foi altamente estimulada pela presença de sais de cromo ao meio, decrescendo posteriormente aos 14 dias de cultivo (Figura 27). Os resultados obtidos indicam que a presença de sais de cromo no meio de cultivo, estimula fortemente a produção de lacases, em um curto período de tempo, quando comparado à adição dos demais sais estudados.

A adição de níquel ao meio, promoveu uma secreção de lacases estatisticamente igual ao controle em 7 dias de desenvolvimento, no entanto as adições de todos os metais agregados nos ensaios ‘Td1’ e ‘Td2’, mostrou-se inibitória para a secreção de lacases, considerados os 7 dias de cultivo.

b

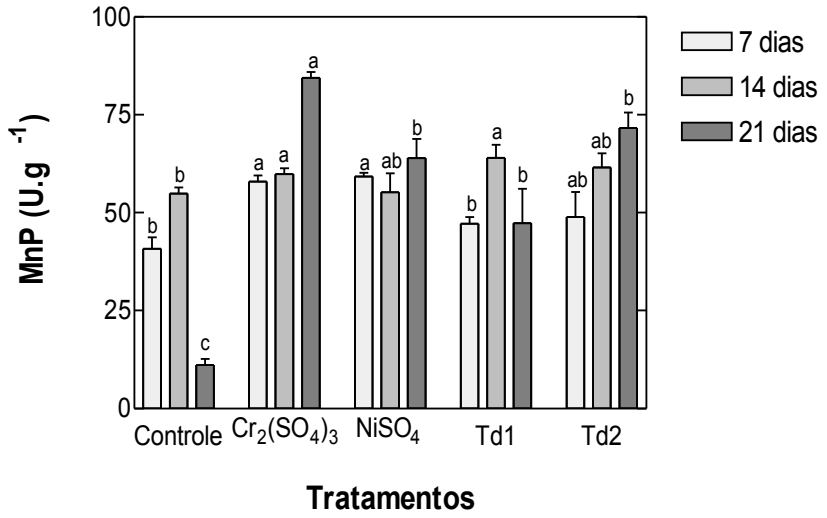


Figura 28. Atividade de manganês peroxidases em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo.

Os extratos enzimáticos dos tratamentos foram obtidos de 25g de massa úmida em 50mL de água destilada submetidos a 30 minutos em agitação.

A atividade de MnP em meios contendo sulfato de cromo III, sulfato de níquel e todos os metais associados nos ensaios 'Td1' e 'Td2', está representada na Figura 24. Conforme os dados obtidos, a secreção de MnP nos meios nos quais cromo e níquel foram adicionados, em 7 dias de cultivo, foi melhorada quando comparada ao controle. Do mesmo modo que para a produção de lacases (Figura 27), a adição de cromo ao meio de cultivo promoveu estimulação na secreção de MnP que atingiu seu ápice em um período de tempo mais longo (21dias). No entanto, os dados obtidos indicam que para uma maior produtividade de MnP, os sais adicionados no início do estudo – sulfatos de cobre, ferro e alumínio são os mais indicados, porque associam vantagens de uma elevada secreção enzimática, em relação a um período curto de tempo, correspondente a 14 dias de desenvolvimento (Figura 26).

Observa-se que em 14 dias de desenvolvimento (Figura 28), a produção de MnP foi semelhante em todos os meios aos quais foram adicionados sais, produzindo tanto quanto o controle. Este dado indica que mesmo em altas concentrações, metais normalmente tóxicos a microrganismos, não apresentaram efeito letal ao fungo *P. sajor-caju*, que, nas condições de estudo, continuou ao longo do tempo de cultivo, secretando MnP.

Para as Figuras 27 e 28 foi constituída a Tabela 17, que representa os dados dos controles, comparados com os tratamentos realizados, nas diferentes etapas de cultivo, tamto para a atividade de lacases como para manganês peroxidases. Os dados apresentados indicam quais tratamentos que apresentaram ou não apresentaram diferença significativa para $p<0,05$.

Tabela 17. Análise estatística dos dados que constituíram a Figura 27 e Figura 28.

Lacases (Figura 27)				Manganês Peroxidases (Figura 28)			
Dias de Cultivo	Tratamentos		Significância (r)	Dias de Cultivo	Tratamentos		Significância (r)
7	Controle	$Cr_2(SO_4)_3$	0,707	7	Controle	$Cr_2(SO_4)_3$	0,841
	Controle	$NiSO_4$	0,102*		Controle	$NiSO_4$	0,904
	Controle	Td1	0,785		Controle	Td1	0,510*
	Controle	Td2	0,939		Controle	Td2	0,855
14	Controle	$Cr_2(SO_4)_3$	0,944	14	Controle	$Cr_2(SO_4)_3$	0,381*
	Controle	$NiSO_4$	0,817		Controle	$NiSO_4$	0,0001*
	Controle	Td1	0,735		Controle	Td1	0,577
	Controle	Td2	0,268*		Controle	Td2	0,290*
21	Controle	$Cr_2(SO_4)_3$	0,070*	21	Controle	$Cr_2(SO_4)_3$	0,992
	Controle	$NiSO_4$	0,110*		Controle	$NiSO_4$	0,959
	Controle	Td1	0,540*		Controle	Td1	0,847
	Controle	Td2	0,433*		Controle	Td2	0,978

*Tratamentos que não apresentaram diferença significativa para p<0,05.
Demais tratamentos apresentam diferença significativa.

De acordo com Baldrian (2003) a interação de metais pesados com as enzimas lignolíticas extracelulares como lacases e manganês-peroxidases é importante para o entendimento da regulação dos processos biotecnológicos de degradação fúngica de xenobióticos.

Os dados de produção enzimática indicam que a adição dos metais selecionados aos meios de cultivo sólido, geraram maior produção de todas as enzimas, podendo tais dados, servirem de informação para outros estudos que envolvam os mecanismos de biosorção fúngica e a secreção enzimática.

6. CONCLUSÕES

Após a realização dos ensaios propostos com *Pleurotus sajor-caju*, e com a análise dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Adições de soluções dos sais sulfato de cobre II, sulfato de alumínio, sulfato de ferro II, sulfato de zinco, sulfato de cromo III e sulfato de níquel, ao meio de cultivo líquido de *P. sajur-caju*, na concentração final de 30mg.100mL^{-1}, não são letais ao fungo e nem inibitórias ao seu crescimento. Em algumas das condições, as adições inclusive promoveram desenvolvimento fúngico superior ao do controle, no qual não estiveram presentes as soluções de metais;

- Adições de todos os sais mesclados, em concentrações de 30mg.100mL^{-1} e de 60mg.100mL^{-1}, também não foram letais ao fungo crescido em meio líquido;

- O micélio de *P. sajor caju*, crescido em cultivo líquido, apresentou capacidade de biosorver os metais estudados, nas distintas concentrações empregadas, em todos os

testes realizados. Constatou-se em ensaios com sulfato de zinco e sulfato de cobre II, valores de biosorção, respectivamente, de 650 e 875 vezes superiores ao encontrado no controle;

- Para cada adição realizada no cultivo líquido, a biosorção máxima alcançada pelo fungo, ocorreu em períodos diferentes de tempo de cultivos, característico para cada sal de metal adicionado. Assim, sugere-se que distintas estratégias sejam adotadas, no caso de tratamentos de biorremediação que envolvam a presença de tais íons metálicos como contaminantes;

- A adição de soluções dos sais sulfato de cobre II, sulfato de alumínio, sulfato de ferro II, sulfato de zinco, sulfato de cromo III e sulfato de níquel, ao meio de cultivo sólido de *P. sajur-caju*, na concentração final de 30mg.100g^{-1}, não foram letais ao fungo, na medida em que se obteveram os corpos de frutificação nos quais foram realizados os testes de biosorção destes metais;

- Adições de todos os sais mesclados, na concentração final de 30mg.100g^{-1} e de 60mg.100g^{-1}, também não foram letais ao fungo crescido em meio sólido;

- Os corpos de frutificação, obtidos do cultivo sólido de *P. sajur-caju,* apresentaram biosorção de cobre, zinco, cromo e níquel, superior ao controle, no entanto, não apresentaram biosorção superior ao controle, para os meios nos quais foram adicionados sulfato de alumínio e sulfato de ferro II;

- A adição das soluções dos metais, sulfato de zinco, sulfato de alumínio e sulfato de ferro II, quando realizadas 7 dias após a inoculação do fungo no meio de cultivo líquido, resultou em uma maior biosorção dos metais, indicando melhor efetividade da

biosorção quando corre um desenvolvimento prévio do inóculo, antes dos metais serem agregados ao meio de cultivo líquido.

- A variação do pH nos meios de cultivo líquido indicou que a maior biosorção fúngica geralmente coincidiu com os menores valores de pH no meio líquido.

- A secreção das enzimas lacases e manganês peroxidases, não foi inibida pela adição dos sais, em nenhuma das condições estudadas, e ao contrário, algumas delas promoveram uma acentuada atividade enzimática;

- O fungo *P. sajor-caju*, mostrou-se eficiente na biosorção de alguns íons metálicos presentes no meio de cultivo sólido, como cobre, zinco, cromo e níquel;

- O fungo *P. sajor-caju*, mostrou-se eficiente na remoção de íons metálicos presentes em meio líquido, indicada pela capacidade de biosorção dos metais estudados, sendo indicado como alternativa em problemas que envolvam a contaminação de efluentes, na medida que não são necessários de meios de cultivo caros; e a biosorção ocorre em um prazo de tempo relativamente curto.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas desta tese, sugere-se o desenvolvimento de:

- Processos de cultivo sólido utilizando condições otimizadas para a produção e purificação das enzimas lacases e manganês peroxidases, visando o tratamento de efluentes e biorremediação;

- Estudos de escalonamento para tratamento de efluentes líquidos, utilizando a biomassa fúngica de *P. sajor-caju*;

- Estudos de cultivo sólido com a utilização de condições otimizadas, associadas ao consumo de oxigênio, para determinação dos parâmetros cinéticos do cultivo de *P. sajor-caju*;

- Análise do potencial antioxidante de *P. sajor-caju*, crescido em meios aos quais foram adicionados metais;

- Estudos da capacidade de biosorção de metais pela biomassa de *P. sajor-caju*, imobilizada, viva e/ou inativada para comparação dos resultados obtidos nas diferentes condições de cultivo, com relação a biosorção de metais;

- Aplicação do fungo em estudos envolvendo outros tipos de agentes contaminantes freqüentemente presentes no meio ambiente, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas e outros;

- Adaptação do fungo a quantidades crescentes das concentrações de metais associados;

- Estudos envolvendo capacidade de biosorção do fungo crescido em meio líquido e sólido, perante a adição isolada ou simultânea de outros metais como chumbo, mercúrio, cromo, níquel e cádmio e a presença um inóculo com prévio desenvolvimento fúngico;

- Utilização de metodologias e análises complementares, como estudo de genes envolvidos nos processos de biosorção de metais por *Pleurotus sajor-caju*;

- Realização de ensaios em microcosmos para estudos de processos de biorremediação de solos contaminados por diferentes tipos de metais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson, R. E. ; Henrysson, T. (1996). Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46: 647- 652.

Bakkaloglu, I.; Butter, T. J.; Evison, L.M.; Holland, F. S.; Hancock, I. C. (1998).Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. **Water Sci. Technol.** 38: 269-277.

Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 78-91.

Baldrian, P.; Valaskova,V.; MerhautovaV.; Gabriel J.(**2005).** Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Res. Microbiol. 156: 670-676.**

Bano, Z.; Rajarathnam, S. (1988). *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition,

nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 27: 87-158.

Barr, D. P. ; Aust, S. D. (1994). Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. **Environ. Sci. Technol.** 67: 78-87.

Bayramolu, G.; Bekta, S.; Arica, M.Y. (2003). Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. **J. Haz. Materials.** 101: 285-300.

Bellion, M.; Courbot, M.; Jacob, C.; Blaudez, D. Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters.** 254: 173-181.

Bolan, N. S.; Adriano, D.C.; Natesan, R.; Koo, B.J. (2003). Effects of organic amendments on the reduction and phytoavailability of chromate in mineral soil. **J.Environ. Qual.** 32: 120-128.

Bononi, V. L; Capelari, M.; Maziero, R.; Trufem, S. F. B. (1999). **Cultivo de Cogumelos Comestíveis.** Ed. Ícone. 2ª Edição. São Paulo.

Bogan, B.W; Schoenike, B., Lamar, R.T.; Cullen, D.(1996) Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contamined soil with *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ.Microbiol.** 55: 154 -158.

Brocchi, E. A. ; Jena, P. K. (2002). Metals recovery from metallurgical residues. In: XIX Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa.Recife.2:256-262.

Burgos, W. D.; Novak, J. T. ; Berry, D. F. (1996). Reversible sorption and irreversible binding of naphtalene and alfa-naphthol to soil: elucidation of process. **Environ. Sci. Technol.** 30: 1205-1211.

Castilhos, D. D.; Costa, C. N.; Passianoto, C. C.; Lima, A. C. R.; Lima, C. R.; Muller, V.

(2001).Hexavalent chromium effects on soybeans growth, nitrogen fixation and nutrient absorption. **Cienc. Rural.** 31: 6.

Celaya, R. J.; Noriega, J. A.; Yeomans, J. H.; Ortega, L. J.; Ruiz-Manriquez, A. (2000). Biosorption of Zn (II) by *Thibacillus ferrooxidans*. **Biop. Engin.** 32: 539-542.

Chagas, E. P. ; Durrant, L. R. (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Enzyme Microb. Technol.** 29:473-477.

Chen, G. Q.; Zeng, G. M.; Tu, X.; Niu, C.G.; Huang, G. H.; Jiang, W. (2006). Application 116 of a by-product of *Lentinus edodes* to the bioremediation of chromate contaminated water. **J. Hazard Mater.** 135: 249-255.

Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2001). Biotechnological applications and potencial of wood- dregading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 582-594.

Colao, M. Ch.; Garzillo, A. M.; Buonocore, V.; Schiesser, A.; Ruzzi, M. (2003). Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 63:153-158.

Collins, P. J.; M. J. J. Kotterman, J. A.; Field, J.A.; Dobson, A. D.W. (1996). Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. **Appl.Environ. Microb.** 62: 4563-4567.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Proposta de resolução em 04 de Abril de 2006.

Couto, S. R.; Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnol. Adv.** 24:500-513.

Cripps, C.; Bumpus, J. A.; Aust, S. D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium.* **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 1114-1118.

Curkova, E.; Vavruková, L.; Suchánek, M.; Baldrian, P.; Gabriel, J. (2004). ICP-MS determination of heavy metals in submerged cultures of wood-rotting fungi. **Talanta** 62: 483-487.

Deng, S.; Ting, Y.P. (2005a). Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu (II), Pb (II) and Ni (II). **Water Res.** 39: 2167-2177.

Deng, S.; Ting, Y.P. (2005b). Polyethylenimine-modified fungal biomass as a high-capacity biosorbent for Cr(VI) anions: sorption capacity and uptake mechanisms. **Environ. Sci. Technol**. 39: 8490-8496.

Dias, M. A.; Lacerda, I. C. A.; Pimentel, P. F.; de Castro, H. F.; Rosa, C. A. (2002). Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. **Let. Appl. Microbiol.** 34: 46-50.

Dilek, F. B.; Erbay, A.; Yetis, U. (2002). Ni(II) biosorption by *Polyporous versicolor*. **Process Biochem.** 37: 723-726.

Dombrovs'ka, O.M.; Kostyshyn, S. S. (1999). Effect of aromatic compounds and Mn^{2+} on the ligninolytic enzyme complex from the fungus *Pleurotus floridae* (FRIES) Kummer-a white-rot wood fungus.**Ukr. Biokhim. Zh.** 71: 45-49.

Eldhuset, T. D.; Lange, H.; de Wit, H. A. (2006). Fine root biomass, necromass and chemistry during seven years of elevated aluminium concentrations in the soil solution of a middle-aged *Picea abies* stand. **Sci. Total Environ.** 24: 115-123.

Fomina M.; Ritz K.; Gadd G. M. (2003). Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. **Mycol Res.** 107: 861-871.

Gabriel, J.; Baldrian, P.; Hladíková, K.; Háková, M. (2001). Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes. **Let. Appl. Microbiol.** 32 : 194-198.

Galhaup, C.; Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 225-232

Garg, V. K.; Gupta, R.; Kumar, R.; Gupta, R. K. (2004). Adsorption of chromium from aqueous solution on treated sawdust. **Biores. Technol.** 92: 79-81.

Haas, H.(2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. **Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 316-330.**

Hatvani, N.; Mécs, I. (2003). Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes.* **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 55: 199-203.

Hefnawy, M. A.; Razak, A. A. (1998). Alteration of cell-wall composition of *Fusarium oxysporum* by copper stress. **Folia Microbiol.** 43:453-458.

Holcombe, J. A.; Mahan, C. A.; Majidi, V. (1999). Uptake of heavy metals by algae. **Anal. Chem**. 61: 624-666.

Jain, S. K.; Gujral, G. S.; Vasudevan, P.; Jha, N. K. (1989). Uptake of heavy metals by *Azolla pinnata* and their translocation into the fruit bodies of *Pleurotus sajor-caju.* **J. Ferm. Bioeng.** 68: 64-67

Jolivalt, C.; Raynal, A.; Caminade, E.; Kokel, B.; Le Goffic, F.; Mougin, C. (1999). Transformation of N', N'- dimethyl-N- (hydroxyphenil) ureas by laccase from white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 51: 676-681.

Kaszycki, P.; Fedorovych, D.; Ksheminska, H.; Babyak, L.; Wojcik, D.; Koloczek, H. (2004). Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. **Microbiol. Res.** 159: 11–17.

Kapoor, A.; Viraraghavan, T.; Cullimore, D. R. (1999). Removal of heavy metals using

the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technol.** 70: 95–104.

Kosman, D.J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. **Mol. Microbiol.** 47: 1185-1197.

Kreiton, K. L. (1993). Fungal Treatment Bulletin. **Envir. Protec. A.** 93: 514

Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H_2O_2- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium.* **FEBS Lett.** 169: 247-250.

Lestan, D. Lamar, R.T. (1996). Development of fungal inocula for bioaugmentation of contamined soils. **Appl. Environm. Microbiol.** 62:2045-2052.

Lopez-Errasquín, E.; Vázquez, C. (2003). Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosp.** 50: 137-143

Luna, A. S.; Henriques, C. A.; da Costa, A. C. A.; Herbst, M. H.(2005). Investigação do Mecanismo da Biosorção de Cu(II) por *Sargassum* sp. por Ressonância Paramagnética Eletrônica. In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica – 1º Congresso Ibero Americano de Química Analítica. Niterói. **Livro de Resumos.** 36-36.

Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. **Enz. Microb. Tech.** 22: 332-335.

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. **Environ. Internat.** 30: 261-278.

Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 268-278.

Mansur, M.; Suarez, T.; Fernandez-Larrea, J. B.; Brizuela, M. A.; Gonzalez, A. E. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT

20197. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:2637-2646.

McFarland, M. J.; Qiu, X. J. (1995). Removal of benzo[a]pyrene in soil composting systems amended with the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Haz. Material.** 42: 61-70.

Min, K. L.; Kim, Y. H.; Kim, Y. W.; Jung, H. S.; Ha, Y. C. (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Arch. Biochem. Biophys.** 392: 279-286.

Mohapatra, H.; Gupta, R. (2005). Concurrent sorption of Zn(II), Cu(II) and Co(II) by *Oscillatoria angustissima* as a function of pH in binary and ternary metal solutions. **Bioresour. Technol.** 96:1387-1398.

Mougin, C.; Boyer F-D.; Caminade E.; Rama, R. (2000). Cleavage of the diketonitrile of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases. **J. Agric. Food. Chem.** 48: 4529-4534.

Mougin, C.; Kollmann, A.; Jolivalt, C. (2002). Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by addition of xenobiotics. **Biotechnol. Lett.** 24: 139-142.

Ogel, Z.B.; Yuzugullu, Y.; Mete, S.; Bakir, U.; Kaptan, Y.; Sutay, D.; Demir, A. S. (2006). Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 3:1-10.

Paszczynski, A.; Pasti-Grigsby,M.B.; Goszczynski, S.; Crawford, D.(1992). Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomices chromofuscus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 3598-3604.

Pennella, M. A. ; Giedroc, D. P. (2005). Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-respponsive transcriptional regulators. **Biometals.** 18 : 413-428.

Purkayastha, R. P.; Mitra, A. K.; Bhattacharyya, B. **(1994).** Uptake and toxicological effects of some heavy metals on *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 27: 7-13.

Pyszel, A.; Wrobel, T.; Szuba, A.; Andrzejak, R**.** (2005). Effect of metals, benzene, pesticides and ethylene oxide on the haematopoietic system. **Med. Pr.** 56: 249-255.

Putzke, J.; Putzke, M.T.L. (2002). **Os Reinos dos Fungos.** EDUNISC. Vol. 2

Rama, R.; Mougin, C.; Boyer F-D.; Kollmann, A.; Malosse, C.; Sigoillot, J. C. (1998). Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pychoporus cinnabarinus*. **Biotechnol. Lett.** 20: 1101-1104.

Rama, R.; Sigoillot, J. C.; Chanplain, V.; Asther, M.; Jolivalt, C.; Mougin, C. (2001). Inoculation of filamentous fungi manufactured gas plant site soils and PAH transformation. **Polyc. Arom. Comp.** 18: 397- 414.

Ramana, V. V.; Sastry, K. S. (1994). Chromium toxicity in *Neurospora crassa*. **J. Inorg. Biochem.** 56: 87-95.

Rogalski, J.; Szczodrak, J.; Janusz, G. (2006). Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. **Bioresour. Technol.** 97: 469-476.

Rüttiman-Johnson, C.; Lamar, R. T. (1996). Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignindegrading enzymes.**Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3890-3893.

Santhiya, D.; Ting, Y. P. (2006). Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. **J. Biotechnol.** 121: 62-74.

Sarkar, J. M.; Malcolm, R. L.; Bollag, J. M. (1998). Enzymatic coupling of 2,4-dichlorophenol to stream fulvic acid in the presence of oxidoreductases. **Soil Sc. Soc.**

Am. J. 52: 688-694.

Sasaki, T.; Kajino, T.; Li, B.; Sugiyama, H.; Takahashi, H. (2001). New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. **App. Environ. Microbiol.** 67: 2208-2212.

Scheel, T.; Hofer, M.; Ludwig, S.; Holker, U.(2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54: 686-691.

122

Sheng, P. X.; Ting, Y. P.; Chen, J. P.; Hong, L. (2004). Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **J. Col. Interf. Sci.** 275: 131-141.

Silva, S. M. (2004). Produção do fungo *Pleurotus sajor-caju* em meio de serragem de *Pinus* spp. Tese de Mestrado. UCS.

Silva, S.M.G.; Prado-Filho, L.G.(1998). Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisae* fermentando mosto de caldo de cana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 18: 4-6.

Steffen, K. T.; Hatakka, A.; Hofrichter, M. (2002) Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila.* **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 3442-3448.

Sundaramoorthy, M.; Kishi, K.; Gold, M. H.; Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. **J. Biol. Chem.** 269: 759-767.

Tan, Y. H.; Wahab, M. N. (1997). Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 613-617.

Thurston, C.F.(1994).The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.** 140: 19-26.

Toler, H. D.; Morton, J. B.; Cumming, J. R. (2005). Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. **Water, Air Soil Pollut.** 164: 155-172.

Tsekova, K.; Galabova, D. (2003). Phosphatase production and activity in copper (II) accumulating *Rhizopus delemar*. **Enzyme Microb.Technol.** 33: 926-931.

Tuszynska, S. (2006). Ni^{2+} induces changes in the morphology of vacuoles, mitochondria and microtubules in *Paxillus involutus* cells. **New Phytol.** 169: 819-828.

123

Tuszynska, S.; Davies, D.; Turnau, K.; Ashford, A. E. (2006). Changes in vacuolar and mitochondrial motility and tubularity in response to zinc in a *Paxillus involutus* isolate from a zinc-rich soil. **Fungal Genet. Biol.** 43: 155-163.

Veit, M. T.; Tavares, C. R. G.; Gomes-da-Costa, S. M.; Guedes, T. A. (2005). Adsorption isotherms of copper(II) for two species of dead fungi biomasses. **Proc. Biochem.** 40: 3303-3308.

Volesky, B.; Holan, Z. R. (1995). Biosorption of heavy metals. **Biotechnol. Prog.** 11: 235 -250.

Wolfenden, R.S.; Wilson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reaction: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** 02: 805-812.

Wolter, M.; Zadrazil, F.; Martens, R.; Bahadir, M. (1997). Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. **Appl**. **Microbiol. Biotechnol.** 48: 398-404.

Yan, G.; Viraraghavan, T. (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*.**Water Res.** 37: 4486-4496.

Yoneama, M. L.; Dias, J. F. (2004). Espectroscopia por emissão de raios-X induzida por partículas (PIXE). **Estudos ambientais em Candiota - carvão e seus impactos.** Ed.

FEPAM. 4: 209-215.

Zadrazil, F.; Puniya, A. K. (1995). Studies on effect of particle size on solid state fermentation of sugar cane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresour. Technol.** 54: 85-87.

Zafar, S. ; Aqil, F.; Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresour. Technol.** Article in Press

Zetic, V.G.; Stehlik-Tomas, V.; Grba, S.; Lutilsky, L.; Kozlek, D.(2001).Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. **J. Biosci.** 26: 217-223.

Ziegenhagen, D.; Hofrichter, M. (2000). A simple and rapid method to gain high amounts of manganese peroxidase with immobilized mycelium of the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii.* **Appl. Microbiol Biotechnol.** 53:553-557.