

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
***Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 E *Cunninghamella elegans* UCP 596**
NA REMOÇÃO DE COBRE E ZINCO

MARCOS ANTÔNIO DE MORAES FILHO

RECIFE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
***Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 E *Cunninghamella elegans* UCP 596**
NA REMOÇÃO DE COBRE E ZINCO

MARCOS ANTÔNIO DE MORAES FILHO

RECIFE

2005

MARCOS ANTÔNIO DE MORAES FILHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Phanerochaete chrysosporium UCP 963 E *Cunninghamella elegans* UCP 596
NA REMOÇÃO DE COBRE E ZINCO**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA
AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA DE FUNGOS DO
CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM BIOLOGIA DE
FUNGOS.**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Kaoru Okada

RECIFE

2005

Moraes Filho, Marcos Antônio de
Avaliação do potencial biotecnológico de
Phanerochaete chrysosporium UCP 963 e
Cunninghamella elegans UCP 596 na remoção de
cobre e zinco / Marcos Antônio de Moraes Filho. –
Recife : O Autor, 2005.
72 folhas : il, fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Biologia – Micologia. 2. Poluição – Meio
ambiente – Metais pesados – Cobre e zinco. 3.
Fungos filamentosos – Zygomycetes e
Basidiomycetes (*Phanerochaete* e *Cunninghamella
elegans*) - Bioissorção. 4. Proteínas, carboidratos,
polissacarídeos e polifosfato – Bioquímica celular. I.
Título.

582.28
579.5

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-169

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Phanerochaete chrysosporium UCP 963 E *Cunninghamella elegans* UCP 596
NA REMOÇÃO DE COBRE E ZINCO

MARCOS ANTÔNIO DE MORAES FILHO

ORIENTADORA:

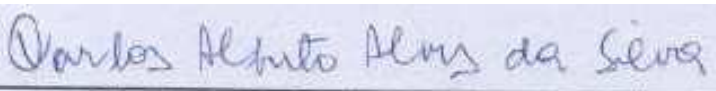


Profª. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Departamento de Química (UNICAP), Recife - PE

EXAMINADORES:



Profª. Dra. Maria Aparecida Resende
Departamento de Microbiologia (UFMG), Belo Horizonte - MG



Profª. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Departamento de Química (UNICAP), Recife - PE

DEDICO

Aos Meus Pais, Marcos Antônio de Moraes e Lícia Maria Araújo de Moraes, a minha irmã Deborah Regina Araújo de Moraes, a meu irmão Pedro Henrique Araújo de Moraes (em memória) e a minha namorada Geórgia Barboza Crescêncio, pelo apoio, Educação, Incentivo, Companheirismo e Amizade.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação, atenção e pelo apoio no decorrer de todo o trabalho;

À Prof^ª. Dr^ª. Kaoru Okada, pela aprendizagem, amizade, atenção e incentivo durante todos esses anos de convívio;

À Prof^ª. Dr^ª. Arminda Sacconi Messias pela atenção e contribuição para a realização deste trabalho;

Aos professores do Mestrado em Micologia pela amizade e conhecimentos transmitidos durante o curso, em especial a coordenadora do curso Prof^ª. Dr^ª. Neiva Tinti pelo apoio durante este trabalho;

Aos meus irmãos Alisson Noya e João Elizeu Junior pela amizade, companheirismo e presença em todos os momentos da minha vida;

A todos os meus amigos e colegas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais;

Aos funcionários do NPCIAMB, Severino Humberto da Silva, Salatiel e Sônia Maria de Souza pela atenção e apoio durante o decorrer do trabalho;

A toda minha turma de mestrado, companheiros e amigos;

À toda minha família, que me deram suporte financeiro e emocional para superar todos os obstáculos durante esses anos;

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Pe. Theodoro Paulo Severino Peters, pelo acesso aos laboratórios de NPCIAMB para realização deste trabalho;

À CAPES pela bolsa concedida para realização desta pesquisa;

Ao CNPq e a FINEP , pelo apoio financeiro;

Finalmente, à todas as pessoas que de algum modo contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELA.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Considerações Gerais:.....	17
2.2 Zinco e Cobre: Características Gerais.....	18
2.3 Bioabsorção de Metais Pesados	21
2.4 Zygomycetes	28
2.5 Basidiomycetes	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Gerais	33
3.2 Específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. MATERIAIS	34
4.1.1 Microrganismos	34
4.1.2 Meios de Cultura.....	34
4.1.2.1 Meio de Manutenção.....	34
4.1.2.2 Meio de Esporulação.....	34

4.1.2.3 Meios de Cultivo para Produção de Biomassa	35
4.1.3 Metais Pesados.....	35
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Métodos Microbiológicos	35
4.2.1.1 Pré-Inóculo.....	35
4.2.1.2 Curva de Crescimento.....	36
4.2.2 Métodos Bioquímicos	36
4.2.2.1 Determinação das Proteínas Totais.....	36
4.2.2.2 Determinação dos Carboidratos Totais	37
4.2.2.2.1 Determinação dos Carboidratos não Aminados.....	37
4.2.2.2.1 Determinação dos Carboidratos Aminados (quitina e quitosana).	37
4.2.2.3 Extração e Fracionamento de Polifosfato	38
4.2.3 Inativação da Biomassa.....	39
4.2.4 Experimentos de Sorção dos Metais pesados	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Perfil de Crescimento.....	43
5.2 Composição Bioquímica da Parede Celular	46
5.2.1 Carboidratos Totais.....	46
5.2.1.1 Carboidratos Totais Aminados (quitina e quitosana).....	46
5.2.1.1 Carboidratos Totais não Aminados	48
5.2.2 Polifosfato e Proteínas Totais	48

5.3 Sorção de Metais.....	51
5.3.1 Biossorção de Cobre por <i>P. chrysosporium</i> e <i>C. elegans</i>	51
5.3.2 Biossorção de Zinco por <i>P. chrysosporium</i> e <i>C. elegans</i>	54
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da extração de quitina e quitosana segundo o método descrito por Synowieck & Al-Khaateeb 1997	41
Figura 2. Esquema da extração seqüencial de polifosfato descrito por Dietrich, 1976 e Smirnov <i>et al.</i> , 2002, modificado por Lima <i>et al.</i> , 2003	42
Figura 3. Crescimento de <i>P. chrysosporium</i> UCP 963 e medida do pH no meio ágar batata dextrose, 150 rpm, durante 168 horas à temperatura de 28 °C	44
Figura 4. Crescimento de <i>C. elegans</i> UCP 596 e a medida do pH no meio extrato de malte 3%, 150 rpm, durante 144 horas à temperatura de 28 °C	44
Figura 5. Rendimento de quitina e quitosana extraída de <i>P. chrysosporium</i> UCP 963 e <i>C. elegans</i> UCP 596 em relação à biomassa total durante 144 e 168 horas de cultivo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Determinação parcial da composição bioquímica intracelular de <i>C. elegans</i> e <i>P. chrysosporium</i> em 144 horas de cultivo	50
Tabela 2 – Capacidade de bioissorção de cobre pela biomassa viva e inativada de <i>C. elegans</i> UCP 596, nas concentrações de 4 e 6 mM.....	53
Tabela 3 – Capacidade de bioissorção de cobre pela biomassa viva e inativada de <i>P. chrysosporium</i> UCP 963, nas concentrações de 4 e 6 mM.....	53
Tabela 4 – Capacidade de bioissorção de zinco pela biomassa viva e inativada de <i>C. elegans</i> UCP 596, nas concentrações de 4 e 6 mM.....	56
Tabela 5 – Capacidade de bioissorção de zinco pela biomassa viva e inativada de <i>P. chrysosporium</i> UCP 963, nas concentrações de 4 e 6 mM.....	56

RESUMO

Investigações foram realizadas comparativamente sobre a habilidade de bioissorção de cobre e zinco pela biomassa de *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 e *Cunninghamella elegans* UCP 596. A remoção dos metais pesados foi avaliada utilizando-se diferentes quantidades de biomassa (120 mg e 240 mg), viva e inativada, adicionadas a solução de cobre e de zinco (4 e 6 mM), pH 5.0 sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 28 °C, por 480 minutos. A amostra de *C. elegans* demonstrou habilidade de remoção dos metais pesados na concentração de 4 mM com rendimentos de 104 mg.g⁻¹ (55% de remoção) para o cobre, 94,44 mg.g⁻¹ (51% de remoção) de zinco, e na concentração de 6 mM zinco removeu 129,71 mg.g⁻¹ (53%) e cobre 171 mg.g⁻¹ (57%), todos os tratamentos foi utilizado 120 mg da biomassa. A biomassa inativada de *P. chrysosporium* foi mais eficiente na remoção de cobre na concentração de 6 mM com resultados de 134,18 mg.g⁻¹ (45% de remoção) e em ambas concentrações de zinco (4 e 6 mM) apresentando uma sorção de 73-101 mg.g⁻¹ (59-63 %), respectivamente, durante 480 minutos. Os resultados demonstram que tanto a utilização da biomassa inativada e/ou viva de *P. chrysosporium* e *C. elegans* apresentam habilidade no processo de remoção de cobre e zinco, possibilitando uma futura aplicação na sorção de metais pesados em ambientes contaminados.

Palavras-chave: Bioissorção; Cobre e Zinco; *Phanerochaete chrysosporium*; *Cunninghamella elegans*.

ABSTRACT

Inquiries comparatively was carried out on the ability of biosorption of copper and zinc for the biomass of *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 and *Cunninghamella elegans* UCP 596. The removal of heavy metals was evaluated using different amounts of biomass (120 mg and 240 mg), live and inactivated, added of zinc and copper solution (4 and 6 mM), pH 5,0 under agitation of 150 rpm to the temperature of 28 °C, for 480 minutes. The sample of *C. elegans* showed ability to removal of heavy metals in the concentration of 4 mM with incomes of 104 mg.g⁻¹ (55% of removal) of copper, and 94,44 mg.g⁻¹ (51% of removal) of zinc, and in the concentration of 6 mM zinc was removed 129,71 mg.g⁻¹ (53%) and copper 171 mg.g⁻¹ (57%), all the treatment using 120 mg of the biomass. The inactivated biomass of *P. chrysosporium* was more efficient in the copper removal in the concentration of 6 mM with results of 134,18 mg.g⁻¹ (45% of removal) and in both zinc concentrations (4 and 6 mM) it presented a sorption of 73-101 mg.g⁻¹ (59-63 %), respectively, during 480 minutes. The results demonstrate that as much the use of the biomass inactivated and/or live of *P. chrysosporium* and *C. elegans* presents ability in the process of removal of copper and zinc, possibility to be one future application in the sorption of heavy metals in contaminated environments.

Key Words: Biosorption; Copper and Zinc; *Phanerochaete chrysosporium*; *Cunninghamella elegans*.

1. INTRODUÇÃO

O aumento na densidade da população mundial, associado ao desenvolvimento industrial, tem resultado em uma descarga cada vez maior de resíduos poluentes no meio ambiente, os quais podem permanecer na natureza por grandes períodos de tempo. A água é um dos recursos naturais mais afetados pelo aumento da poluição, comumente recebendo resíduos contaminados com altas concentrações de poluentes como metais pesados, compostos fenólicos, compostos orgânicos e várias outras substâncias (GOMES *et al.*, 1998).

A poluição por metais pesados representa um problema ambiental importante devido aos elevados efeitos de toxicidade provocados pelos metais, onde a sua acumulação através da cadeia alimentar, tem levado a sérios problemas ecológicos e à saúde. A remediação de metais por técnicas físico-químicas comuns são onerosas e inadequadas especificamente de efluentes volumosos contendo matéria orgânica complexa e contaminação por metal (MALIK, 2004).

Fungos e leveduras têm crescimento rápido, produzem grandes quantidades de biomassa e ao mesmo tempo podem ser manipulados geneticamente e morfológicamente. Os fungos são amplamente utilizados em uma grande variedade de processos fermentativos em escala industrial. A biomassa resultante desses processos pode ser utilizada em quantidade

substancial, nos processos de bioissorção de metais pesados (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995).

A possibilidade de recuperar metais através da biomassa fúngica viva ou inativada tem sido sugerida por numerosos estudos. A remoção de íons de metais usando células inativadas tem recebido crescente atenção, quando comparada às células vivas. O uso de células inativadas oferece as seguintes vantagens: (a) sistema de remoção não está sujeito à toxicidade dos metais; (b) não requer meios e nutrientes para crescer; (c) íons e metais adsorvidos podem ser facilmente desorvidos e a biomassa pode ser reutilizada; e (d) a biomassa inativada empregada em sistemas tradicionais de adsorção está sujeita à teorias convencionais e modelos matemáticos (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1998).

Dentre os biorremediadores de ambientes poluídos, destacam-se os fungos da Ordem Mucorales (Zygomycetes), microrganismos sapróbios, caracterizados por um rápido crescimento em condições de cultivo, considerados patógenos oportunistas para o homem e animais. (CERVANTES & GUTIERREZ-CORANA, 1994; ALEXOPOULOS & MIMS, 1996).

Phanerochaete chrysosporium é um fungo da classe dos Basidiomycetes, destacado pela literatura como forte decompositor de vários compostos xenobióticos, podendo ser usado na remoção de metais pesados (SAGLAM *et al.*, 1999; SAY *et al.*, 2001).

Entretanto, escassos são os relatos na literatura que indicam a utilização do Zygomycete, *Cunninghamella elegans* na remoção de metais pesados comparativamente ao uso do Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* na adsorção (SAY *et al.*, 2001). Assim, investigações foram realizadas sobre a habilidade de *C. elegans* e *P. chrysosporium* em adsorver diferentes concentrações dos metais pesados, cobre e zinco, visando o desenvolvimento de novas tecnologias e preservação ambiental.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações Gerais

Em um período de 300 anos a população mundial aumentou de 500 milhões para mais de 5,5 bilhões. Esse evento foi seguido de uma elevação nos níveis de poluição e subsequente destruição de muitos ecossistemas. Dos quais destacam-se os recursos hídricos, como uma das fontes naturais mais atingidas pela poluição ambiental. Os rios e mares comumente recebem altas descargas de efluentes contendo elevadas concentrações de metais pesados, pesticidas e outras substâncias como nitrogênio, fósforo, compostos inorgânicos e orgânicos. Dentre estes, os metais pesados em particular são os poluentes que mais ameaçam o ambiente. Para reduzir diversos problemas causados pela presença de níveis elevados de metais no suprimento de água, esforços têm sido feitos para estabelecer constantemente a diminuição da concentração desses elementos nos efluentes industriais (CONAMA, 1986).

Com o desenvolvimento dos processos industriais, surgiram novos compostos químicos sintéticos, que estão sendo despejados no meio ambiente sem discriminação. Muitos desses compostos, chamados xenobióticos, ocorrem na natureza ou são similares a estes, sujeitos ao metabolismo microbiano. Estes compostos que resistem à biodegradação ou não são metabolizados completamente, se acumulam no meio ambiente, podendo ser considerados recalcitrantes. Sendo assim, esses poluentes contaminam o meio

ambiente podendo interferir no bom funcionamento dos ecossistemas (CERNIGLIA & GUBSON, 1977; PARALES *et al.*, 2002).

Em geral, o tratamento de efluentes contaminados com metais envolve diretamente os processos físico-químicos de floculação e/ou precipitação, eletrólise, cristalização e adsorção. Contudo, esses processos possuem elevado valor econômico ou podem levar a produção de novos contaminantes. Deste modo, a necessidade de tecnologias práticas e econômicas para a remoção de metais de efluentes, tem resultado na busca por novos métodos que possam ser usados em benefício da redução de níveis de metais ou na recuperação desses (GOMES *et al.*, 1998).

2.2 Zinco e Cobre: Características Gerais

Os metais pesados ocorrem naturalmente no ambiente e estão presentes em rochas, solos, plantas e animais. Os metais ocorrem em diferentes formas: como íons dissolvidos em água, vapor, ou sais minerais em rochas, areia e solo. Eles podem também estar ligados a moléculas orgânicas e inorgânicas ou atrelados por partículas no ar. Ambos processos naturais e antropogênicos emitem metais para o ar e água (DEMIRBAS, 2001).

O zinco é um metal de cor branco-azulada, forma cristalina hexagonal compacta, número atômico: 30, peso atômico: 65,38, densidade (a 25°C): 7,14, dureza: 2,5 (escala de Mohs), ponto de fusão: 419°C (à pressão de

760mm de Hg) e ponto de ebulição: 920°C. O zinco é encontrado em todo o meio ambiente (ar, água e solo). No corpo humano, que contém de 2 a 3 gramas de zinco, ele é essencial para o bom funcionamento dos sistemas imunológico, digestivo e nervoso, pelo crescimento, no controle do diabetes e os sentidos do paladar e do olfato. Mais de 300 enzimas no corpo humano necessitam do zinco para o seu correto funcionamento no metabolismo. Sendo encontrado na natureza principalmente sob a forma de sulfetos, associado ao chumbo, cobre, prata e ferro (galena, calcopirita, argentita e pirita, etc). O minério sulfetado de zinco está sujeito a grandes transformações, através de reações de oxidação formando óxidos, carbonatos e silicatos (DNPM, 2001).

Zinco é um dos mais importantes metais, muitas vezes encontrado em efluentes despejados pelas indústrias, principalmente nos processos que envolvem galvanização e fabricação de ligas metálicas (AHUJA *et al.*, 1999).

O elemento químico cobre é um metal de cor avermelhada, calcófilo, de número atômico 29, peso atômico 63,54, dureza 2,5 a 3,0, ponto de fusão 1.023°C, brilho metálico, ótimo condutor de calor e eletricidade, dúctil e maleável. Apresenta elevada resistência à tensão física e à corrosão. Possui propriedade não magnética, sendo de fácil formação, e utilizado como ligante com outros metais (DNPM, 2001).

A questão ambiental é um ponto preocupante no setor dos metais pesados. A poluição da indústria de metais pode ser registrada nos diversos ramos da cadeia estrutural produtiva, especialmente nas áreas de concentração,

fundição e refino. Na mineração, ocorrem modificações topográficas, provocando o aparecimento de processos erosivos e do assoreamento de recursos hídricos, da devastação vegetal e de emissões de partículas sólidas no ar. Durante os processos de concentração e lixiviação, os danos ambientais são causados pelos produtos químicos utilizados nos processos que são expelidos como rejeitos. Os setores de fundição e refino são os que mais têm afetado negativamente o meio ambiente, com liberação de uma grande quantidade de compostos sulfurosos e elementos traços lançados na atmosfera, hidrosfera e na litosfera. Dentre esses destacam-se: gases de dióxido de enxofre, dióxido de telúrio e arsênio (DNPM, 2001).

Os metais pesados em elevadas concentrações são considerados tóxicos ao homem, pois podem afetar drasticamente o sistema nervoso, o fígado, os ossos e podem bloquear os diversos grupos funcionais de enzimas vitais. Dentre os biosorbentes mais comuns se encontram as algas marinhas, bactérias, leveduras, fungos filamentosos (BAIK *et al.*, 2002).

Diversos estudos realizados descrevem a influência do cobre sobre o crescimento de microrganismos, bem como seu papel como elemento traço em inúmeras reações bioquímicas. A função mais evidenciada do cobre, está no seu efeito sobre o citocromo (c) oxidase e enzimas relacionadas, essenciais ao processo respiratório. Entretanto, as altas concentrações de íons de metais pesados podem formar complexos inespecíficos nas células, que são

considerados como extremamente tóxicos (CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994; NIES, 1999).

2.3 Bioissorção de Metais Pesados

Bioissorção é um termo freqüentemente utilizado para descrever as interações físico-químicas indiretas existentes entre algumas espécies de metais e biomassa, particularmente em um contexto biotecnológico. O uso de microrganismos para o tratamento de efluentes que contém metais pesados é uma oportunidade bem reconhecida devido a sua habilidade de acumular metais em seu ambiente externo. Células vivas ou inativadas são capazes de adsorver metais, contudo existe uma grande diferença em seus mecanismos. O uso de células inativadas tem apresentado mais vantagens, devido a não estar sujeito à toxicidade do metal ou condições de operações adversas e podem ser facilmente imobilizados em uma matriz inerte, diferente do uso de células vivas. A possibilidade de recuperar metais de biomassa tem sido averiguada por vários estudos (GALLI *et al.*, 2003).

Microrganismos comumente isolados de soluções de processos industriais e ambientes poluídos com altas concentrações de metais exibem consideráveis tolerâncias para esses metais. Essa tolerância pode ser devida a fatores abióticos como pH, temperatura e nutrientes no ambiente, ou no meio de crescimento, ou por adaptações fisiológicas e genéticas. A resistência dos

microrganismos aos metais é diretamente proporcional a habilidade de acumular metais (GOMES *et al.*, 1998).

A diversidade genética e metabólica dos fungos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos como antibióticos, alimentos, processantes de alimento, bebidas alcoólicas, ácidos orgânicos, álcoois, fermentados, agentes de tratamento e/ou remediação de resíduos, agricultura, fertilização de solos e controle biológico de pragas e doenças (VILLEN, 2003).

Os fungos filamentosos são conhecidos por possuir um potencial de acumulação, ou seja, uma gama de cátions de metal em soluções aquosas como, cobre, níquel, cobalto e urânio. Células microbianas vivas geralmente exibem duas fases distintas de acumulação de metal. A primeira envolve adsorção do metal em volta da célula e é geralmente um considerado metabolismo independente. A segunda é exclusivamente dependente do metabolismo celular e envolve a translocação de metais por microrganismos dentro da célula. A troca de cátions tem sido apontada como o maior mecanismo de adsorção de metais sob os biosorbentes produzidos por biomassa (GOMES *et al.*, 1998; SING & YU, 1998).

No metabolismo independente – em geral microrganismos acumulam sob a parede celular e no espaço periplasmático. A parede celular protege os microrganismos contra estresses, controla o fluxo de substâncias entre o citoplasma e o ambiente externo, e substâncias solúveis em meio líquido são

comumente adsorvidas por essa estrutura. O fenômeno de bioadsorção pela superfície da célula é relatado em vários grupos, gêneros e espécies de microrganismos. A predominância de grupamentos livres apresentando cargas negativas em diversos biopolímeros de parede celular, confere um caráter aniônico à superfície da parede, resultando assim na atração passiva de vários cátions de metais. Deste modo, a cadeia de íons de metais da superfície da célula é assumida, devido a interações eletrostáticas, em alguns casos, as formações complexas entre cátions de metais e diferentes cadeias de grupos funcionais (OH^- , HPO_4^{2-} , R-COO^- , =C=O , R-S^- , $-\text{SH}^-$, NH_2^-) que se encontram em carboidratos, lipídios, proteínas, e outros biopolímeros de células microbianas (GOMES *et al.*, 1998).

Os fungos têm sido usados para o tratamento de efluentes industriais de polpa, fábricas de papel e casa de coloração têxtil. Enzimas extracelulares incluindo lignina peroxidase e lacase excretadas de células fúngicas em uma fase secundária ou lignolítica demonstrando possuir o maior papel na degradação de vários compostos xenobióticos. Em adição a degradação enzimática, o micélio dos fungos também contribui especialmente para a remoção de metais pesados por adsorção da molécula do metal (GOMES *et al.*, 1998).

Biomassa inativada de *Rhizopus arrhizus* mostrou-se efetiva na remoção de metais pesados, especialmente para os elementos radioativos urânio e tório. A parede celular dos fungos é constituída por polissacarídeos

aminados ou não-aminados, demonstrando assim a capacidade de reter metais pesados, dependendo da porcentagem desses polímeros. Em *Saccharomyces cerevisiae* a camada externa da parede celular é constituída por proteína, cuja carga aumenta pela dissociação dos grupos ionizáveis dos aminoácidos constituintes, aumentando a habilidade em remover metais pesados (ÖZER *et al.*, 1999).

A presença dos polissacarídeos quitina e quitosana nas paredes dos fungos, ou de outros componentes como melanina, são responsáveis pelo aumento do potencial de bioabsorção. Também dependem das propriedades específicas da superfície de parede celular alguns parâmetros fisiológicos da solução como sais, temperatura, pH, concentração inicial dos íons de metal e da biomassa. A combinação do metal, nível da concentração do metal, tempo de permanência e parâmetros do teste (número de células, crescimento celular, volume celular, oxigênio dissolvido, metal assimilado) são também aspectos que devem ser levados em consideração no processo. O mecanismo de assimilação de íons de metal por microrganismos é considerado complexo, observando que são necessários efeitos interativos de diferentes espécies e potenciais de interações com a superfície celular. Competição entre os diferentes tipos de íons metálicos pelos sítios de ligação da superfície celular certamente ocorrerá dependendo de algumas características iônicas (GALLI *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004).

Quitina como componente de parede celular dos fungos é responsável pela sorção de metais. A quitina (poli-N-acetil-D-glicosamina) tem sido encontrada como maior constituinte das microfibrilas dos fungos. Quitosana (dicetil poli-N-D-glicosamina) apresentam uma remoção superior de metais pesados do que a quitina, quando em soluções aquosas, devido ao sítio do nitrogênio do grupo amina da quitosana, sendo considerado o maior responsável pelo processo de bio sorção (BAIK *et al.*, 2002).

Estudos relataram que quando utilizados fungos da ordem Mucorales na remoção de metais pesados, os biopolímeros constituintes de parede celular responsáveis por esta ligação eram quitina e quitosana (GOMES *et al.*, 1998).

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre sob a forma de polissacarídeos e são polímeros de alto peso molecular. A quitina é um homopolissacarídeo que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica e com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído, servindo como elemento estrutural, sendo encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos (KENT, 1964; KAFETZOPOULOS *et al.*, 1993; LEHNIGER *et al.*, 1995).

Microrganismos que possuem a capacidade de acumular polifosfato podem ser utilizados na biorremediação de efluentes contaminados com metais pesados, pois muitos estudos demonstraram a associação de partículas de polifosfato com cátions de metais pesados. Aparentemente essa relação entre polifosfato e o aumento da resistência ou tolerância de alguns

microrganismos e metais pesados ratifica o seu potencial biotecnológico na remoção desses poluentes (VAN-LOOSDRECHT *et al.*, 1997; MINO *et al.*, 1998; TORRES *et al.*, 1998; KEASLING *et al.*, 1999; KULAEV, 2000).

Ambos os pré-tratamentos químicos como, contato celular com compostos ácidos, álcalis e orgânicos, e pré-tratamentos físicos, como calor seco e úmido e liofilização mostraram aumento da bio sorção de metais por microrganismos (LIU *et al.*, 2004).

A capacidade de recuperação de metais pesados pela biomassa fúngica tem sido realizada por numerosos estudos, destacando-se a produção de biomassa de *Aspergillus niger* utilizada para remover chumbo(II) em solução aquosa, como também *Phanerochaete chrysosporium* no processo de bio sorção de mercúrio inorgânico (HgCl_2), mercúrio metil (CH_3HgCl) e etilato de mercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$). Outros fungos de gêneros diversos como, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Neurospora crassa*, *Cladosporium* e *Aureobasidium*, têm também demonstrado habilidade na remoção de metais pesados (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1998; GALLI *et al.*, 2003).

Pesquisadores estudaram a sorção de cádmio e cobre utilizando a biomassa de *Microcystis aeruginosa*, observando valores de remoção entre 22 e 61%, demonstrando também capacidade de remoção de chumbo por células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa* com resultados entre

3 e 50% de remoção, respectivamente (GALUM, *et al.*, 1987; STRANDBERG, *et al.*, 1981; PARKER, *et al.*, 1998).

Micélio de espécies de *Absidia* e *Rhizopus* são considerados efetivos biosorbentes de chumbo, cádmio, cobre, zinco e outros metais. Biomassa de *Aspergillus niger* após 15 minutos de aquecimento em 0,1N de NaCl por 15 minutos, foi capaz de ligar 7,24 mg de chumbo por grama de biomassa. Diferentes capacidades de ligação do micélio podem ser explicadas pela presença dos grupos funcionais (BAIK *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, a utilização de células biosorbentes tem sido uma excelente alternativa ou uma tecnologia adicional para a remoção e a recuperação de metais provenientes de efluentes industriais e laboratoriais, representando um método tanto econômico quanto eficiente. A identificação de técnicas eficazes para a remoção de metais pesados presentes em resíduos industriais é caracterizada como uma importante tarefa para o desenvolvimento, proteção ambiental e também crescimento econômico na atualidade, envolvendo processos ecologicamente corretos tem se tornado um diferencial competitivo entre as empresas (GOMES *et al.*, 1998; HERNANDEZ *et al.*, 1998).

2.4 Zygomycetes

O Filo Zygomycota é constituído por duas classes, Zygomycetes e Trichomycetes. A classe dos Zygomycetes é constituída por espécies saprofíticas, simbiontes, parasitas facultativos de animais, vegetais e de outros Zygomycetes. Os Trichomycetes são parasitas obrigatórios de insetos e outros artrópodes (ALEXOPOULOS & MIMS, 1996).

Os representantes dessa classe são organismos com grande potencial econômico-industrial e na medicina. Além disso, sua habilidade de adaptação à diferentes condições ambientais, resultam em variações nas suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representando um elemento fundamental na compreensão de seu comportamento celular (ZHANG *et al.*, 1986; LAMACKA & SAJBIDOR, 1998; POTHULURI *et al.*, 1998a, 1998b).

Fungos dessa classe são capazes de se desenvolver nas mais diversas condições de aeração; na presença ou não de oxigênio, em condições microaerofílicas e em atmosfera de dióxido de carbono, apresentando o gênero *Mucor* crescimento leveduriforme em atmosfera de 100 % de dióxido de carbono (LEHRER *et al.*, 1980).

Dentro da ordem Mucorales o gênero *Cunninghamella* é o mais comum. As espécies são comumente encontradas no solo e em outros substratos orgânicos, como esterco. Os representantes exibem colônias com crescimento rápido, coloração variando de branco a cinza, algumas espécies

causam infecção sistêmica em humanos (BAIJAL & MEHROTRA, 1980; DOMSCH *et al.*, 1980; ALEXOPOULOS & MIMIS, 1996).

Devido a sua participação nos processos de biodeterioração, através do ataque em materiais de diversas origens como couro, plásticos, madeira e alimento, podem ser úteis, principalmente, na reciclagem de lixo, formação de adubo, produção de enzimas, ácidos graxos, antibióticos, conservantes e ácidos lácticos (DUBE, 1978; TOMBS & BLAKE, 1982; ENDO *et al.*, 1985; OSMANI & SCRUTTON, 1985; TRUDEL & ASSDELIN, 1990; BROWN *et al.*, 1993; CERTIK *et al.*, 1997).

Estudos demonstraram que o fungo *Cunninghamella blakesleeana* quando cultivado na presença de altas concentrações de cobre exibia alterações em sua parede celular com um significativo aumento na proporção de quitosana, sugerindo que este fato seria responsável pelo incremento na habilidade de remoção de metais pesados (CERVANTES & GUTIERREZ-CORANA, 1994; ALEXOPOULOS & MIMS, 1996).

Alguns estudos realizados relatam a capacidade de várias espécies de *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, atuarem na remoção de cobre, cádmio, zinco, tanto com o micélio vivo como inativado, utilizando a biomassa como biosorbente. A utilização do micélio como filtro pode ser, restaurada, removendo-se, com compostos químicos, o metal retido (LINCH, 1986).

2.5 Basidiomycetes

Os Basidiomycetes são um grupo importante de fungos, incluindo espécies que são ou não patogênicas. Os Basidiomycetes que decompõem madeira são os principais agentes na decomposição de celulose e lignina e são componentes essenciais para o desenvolvimento do ecossistema. Alguns desses fungos são usados biologicamente como clareadores na indústria de papel e no processo de remoção de substâncias tóxicas do ambiente (ALEXOPOULOS & MIMS, 1996).

Phanerochaete chrysosporium é um decompositor secundário de madeira, podendo ser encontrado em florestas de toda América do Norte, Europa e Irã. Essa espécie é o representante mais estudado dos fungos causadores da “podridão branca” os quais são conhecidos por sua habilidade de degradar lignina de madeira, e descolorir a pigmentação marrom associada com esse biopolímero. Essa habilidade tem gerado muito interesse para indústria de polpa e papel como um começo ambientalmente alternativo para o clareamento químico de polpa. Devido a falta de especificidade do substrato do sistema lignolítico, o fungo *P. chrysosporium* pode ser explorado na biorremediação de numerosos bioprodutos orgânicos recalcitrantes (BURDSALL, 1985; PASZCZYNSKI & CRAWFORD, 1995; BRODA *et al.*, 1996; SIGOILLOT *et al.*, 2001).

Uma chave avançada envolve um grupo ecologicamente distinto dos organismos conhecidos como os fungos da podridão branca. A nível de dados, a maioria das pesquisas a respeito da biorremediação com estes fungos centrou-se em uma única espécie, o *P. chrysosporium*, que é conhecido por metabolizar uma grande quantidade de compostos xenobióticos. Recentemente, outras espécies de *Phanerochaete*, tão como membros de outros gêneros, começaram a ser avaliadas por suas habilidades na degradação de diversos poluentes. Há diferenças notáveis entre fungos no que diz respeito à extensão da mineralização do poluente e da habilidade da transformação, assim como a natureza dos metabólitos derivados do poluente. A habilidade dos fungos da “podridão branca” de transformar poluentes similares é completamente variável (BOGAN & LAMAR, 1996).

Fungos da podridão branca são caracterizados por sua habilidade de degradar lignina. Em adição a degradação de lignina, esses fungos também são capazes de degradar uma grande variedade de compostos xenobióticos e orgânicos. Vários aspectos da fisiologia, ecologia, e utilização biotecnológica desses fungos têm sido estudados. Contudo, até o momento, pouco se sabe a respeito dos efeitos fisiológicos dos metais sob os fungos da podridão branca (KAÇAR *et al.*, 2002; BALDRIAN, 2003). Possuindo contato indireto com o solo, eles retiram o metal pesado, principalmente de deposição seca ou molhada. Devida a sua habilidade de crescer e repetidamente frutificar em áreas industriais com altas concentrações de enxofre e óxidos de nitrogênio,

eles podem ser também usados como uma ferramenta capaz de monitorar a poluição por metais pesados (CURDOVÁ, *et al.*, 2004).

Fungos da podridão branca como *Phanerochaete chrysosporium*, têm sido extensivamente estudados como agentes na degradação de vários poluentes recalcitrantes como benzo-pireno, pentaclorofenol, triclorotileno e corantes sintéticos (SING & YU, 1998).

Entretanto, escassos são os relatos na literatura que indicam a utilização do Zygomycete, *Cunninghamella elegans* na remoção de metais pesados; e poucos são os trabalhos relacionados com o uso do Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* na adsorção (SAY *et al.*, 2001). Considerando a capacidade destas espécies em adsorver diferentes concentrações de metais pesados, como também a recuperação da biomassa e desses elementos, para o desenvolvimento econômico e preservação ambiental, novos estudos que busquem tecnologias alternativas mais eficientes são de grande importância.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar a habilidade e eficiência da biomassa de *Phanerochaete chrysosporium* e de *Cunninghamella elegans* no processo de remoção de metais pesados.

3.2 Específicos

- Determinar as curvas de crescimento de *P. chrysosporium* e *C. elegans*;
- Estabelecer a composição bioquímica da parede celular de *P. chrysosporium* e de *C. elegans*, relacionando com o processo de adsorção;
- Quantificar os metais pesados removidos pela biomassa de *P. chrysosporium* e *C. elegans*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1 Microrganismos - Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas duas amostras, *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 e *Cunninghamella elegans* UCP 596, as quais estão depositadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco, mantidas no meio batata dextrose ágar, à temperatura de 4°C.

4.1.2 Meios de Cultura

4.1.2.1 Meio de Manutenção - Para a manutenção da amostra de *C. elegans* e de *P. chrysosporium* foi utilizado o meio ágar batata dextrose (VETEC), e as culturas repicadas a cada três meses e mantidas a 4 °C.

4.1.2.2 Meio de Esporulação - Para a esporulação da amostra de *C. elegans* foi utilizado o meio yeast malt agar (YMA), com a seguinte composição em g.L⁻¹ de água destilada: extrato de levedura, 3,0; peptona, 5,0; extrato de malte, 3,0; glicose, 10,0; ágar 15,0; pH 5.0. O meio batata dextrose ágar foi utilizado para a produção de esporos de *P. chrysosporium*, que

apresenta a seguinte composição em g.L⁻¹ de água destilada: infusão de batata, 200,0 ; glicose, 20,0; pH, 5.0.

4.1.2.3 Meios de Cultivo para Produção de Biomassa - Foram utilizados para produção de biomassa o meio descrito por Galli *et al.*, 2003, constituído por 3 % de extrato de malte, para a amostra de *C. elegans* e batata dextrose ágar para *P. chrysosporium*.

4.1.3 Metais Pesados - Para os testes de remoção foram utilizadas soluções de sulfato de cobre penta hidratado (CuSO₄.5H₂O) e sulfato de zinco hepta hidratado (ZnSO₄.7H₂O) (MERCK) nas concentrações de 4mM e 6 mM.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Métodos Microbiológicos

4.2.1.1 Pré-Inóculo – As amostras de *P. chrysosporium* e *C. elegans* foram inoculadas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo meio específico para esporulação e incubadas durante 6 dias à 28°C. Após esse período, os esporos foram coletados, com uso de cotonetes estéreis e umedecidos em água destilada, sendo determinada a concentração de esporos

em câmara de Neubauer. Aliquotas de 1 mL da suspensão de esporos contendo 10^7 esporos/mL foram utilizadas como pré-inóculo.

4.2.1.2 Curva de Crescimento – Aliquotas de 1 mL da suspensão de esporos foram inoculadas em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio batata dextrose ágar, para a amostra de *P. chrysosporium*, e extrato de malte 3%, para a amostra de *C. elegans*. Os frascos foram incubados a 28°C durante 144-168 horas, sob agitação orbital de 150 rpm. Frascos foram retiradas a cada 12 horas nas primeiras 36 horas e com intervalos de 24 horas nos horários subseqüentes até se completar 96 horas. A biomassa foi obtida por filtração, lavada três vezes com água deionizada gelada, posteriormente transferida para frascos de penicilina previamente tarados, submetido a processo de liofilização e mantidos no dessecador à vácuo. A média do peso seco, em triplicata, foi utilizada para estabelecer o gráfico correspondente à curva de crescimento. A partir do melhor tempo de crescimento indicado pela curva, foi realizada a produção de biomassa para posterior utilização na remoção dos metais pesados (ANDRADE *et al.*, 2000).

4.2.2 Métodos Bioquímicos

4.2.2.1 Determinação das Proteínas Totais - A determinação das proteínas foi realizada utilizando: 50 mg da biomassa liofilizada, macerada e

sonicada por 15 minutos e 5 minutos, respectivamente, em banho de gelo. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 20 minutos, o sobrenadante foi retirado e utilizando, para determinação das proteínas totais pelo kit LABTEST, tendo como padrão albumina de soro bovino (5 mg/mL), em espectrofotômetro a 545nm.

4.2.2.2 Determinação dos Carboidratos Totais

4.2.2.2.1 Determinação dos Carboidratos não Aminados - O método utilizado para a determinação de carboidratos foi o do fenol e ácido sulfúrico, baseado na metodologia descrita por Dubois *et al.*, 1956, onde 50 mg da biomassa liofilizada foi macerada por 15 minutos e sonicada por 5 minutos, em banho de gelo, respectivamente. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 20 minutos, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se fenol e ácido sulfúrico concentrado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando como padrão uma solução de glicose a 490 nm.

4.2.2.2.2 Determinação dos Carboidratos Aminados (quitina e quitosana) – Cerca de 5g de biomassa de *P. chrysosporium* e *C. elegans* liofilizado foram utilizadas de acordo com Synowiecky & Al-Khateeb, 1997 (Figura 1). O processo de extração corresponde: desproteinização com uma solução 2 % w de hidróxido de sódio (30:1 v/w) à 90 °C, por 2 horas, separação da fração alcali-insolúvel (AIF) por centrifugação (4.000 g por 15 min), extração da quitosana por

refluxo AIF (10% v/v ácido acético, 40:1 v/w, 60 °C, 6 horas), separação da quitina bruta por centrifugação (4.000 g por 15 min) e precipitação da quitosana pelo extrato a pH 9.0, ajustado com solução 40 % de NaOH.

4.2.2.3 Extração e Fracionamento de Polifosfato – A extração do polifosfato a partir da biomassa de *P. chrysosporium* e *C. elegans* foi realizada pelos métodos descritos por Dietrich, 1976 e Smirnov *et al.*, 2002, modificado por Lima *et al.*, 2003 (figura 2).

Amostras de 100 mg de micélio liofilizado foram macerados em 5 mL de água deionizada a 0 °C por 10 minutos, em seguida sonicadas em banho de gelo, por 10 minutos, a 16 KHz e posteriormente centrifugadas a 12000 g, durante 5 minutos, para remoção dos fragmentos celulares. O sobrenadante obtido correspondeu a fração 1 do polifosfato. O precipitado foi submetido ao processo de extração com NaOH 0,05 N a 0 °C por 30 minutos e a fração 2 foi obtida por centrifugação. Em seguida, o precipitado obtido anteriormente, foi tratado com ácido perclórico (HClO₄ 0,5 N) a 90 °C por 30 minutos, sendo separado o sobrenadante, obtendo a fração 3.

O conteúdo do fósforo lábil e ortofosfato foram determinados nas três frações, pelo método colorimétrico que se baseia na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, que é quantificado espectrofotometricamente a 340 nm, utilizando uma solução de fósforo como padrão (5 mg/dL) (SMIRNOV *et al.*, 2002).

4.2.3 Inativação da Biomassa – Cerca de 5 g do micélio liofilizado de *P. chrysosporium* e de *C. elegans* foram imersos em 20 mL de água deionizada e inativados em autoclave por 15 minutos, a temperatura de 121°C.

4.2.4 Remoção e Determinação dos Metais pesados - A remoção dos metais pesados foi realizada utilizando diferentes quantidades de biomassa (120 mg e 240 mg), viva e inativada, adicionadas de 65 mL da solução de cobre e de zinco (4 e 6 mM), pH 5,0 em frascos de Erlenmeyer, de 250 mL de capacidade, sob agitação de 150 rpm à temperatura de 28 °C, por 480 minutos. Aliquotas foram retiradas nos intervalos de 30, 120 e 480 minutos, perfazendo um total de 8 ensaios experimentais. A concentração dos metais foi analisada utilizando kit CHEMetrics Vacu-vials® para Cobre e Zinco e por Espectrofotometria de Absorção Atômica.

Para o teste de cobre o kit utilizou o reagente batocuproina, onde, em solução, os íons de cobre reagem formando um composto quelado de cor laranja. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 485 nm.

A determinação de zinco foi realizada pela reação do metal solúvel com o “zicon”, formando um complexo de cor azulada e tendo a leitura da transmitância em espectrofotômetro a 620 nm.

A habilidade de bioabsorção dos metais pesados pela biomassa, inativada e viva, de *P. chrysosporium* e *C. elegans*, foi determinada pela quantidade de metal pesado em solução aquosa, antes e após o contato com o biosorbente e

foi expressa de acordo com a seguinte expressão matemática descrita por Jeon *et al.*, 2002:

$$Q = C_i V_i - C_f V_f / m,$$

onde Q é a capacidade de sorção do metal pesado (mg g⁻¹ de biomassa), C_i é a concentração inicial do metal pesado (mg L⁻¹), C_f é a concentração final do metal (mg L⁻¹), V_f é o volume final (L⁻¹), V_i é o volume inicial (L⁻¹) e “m” é a biomassa inicial em (g).

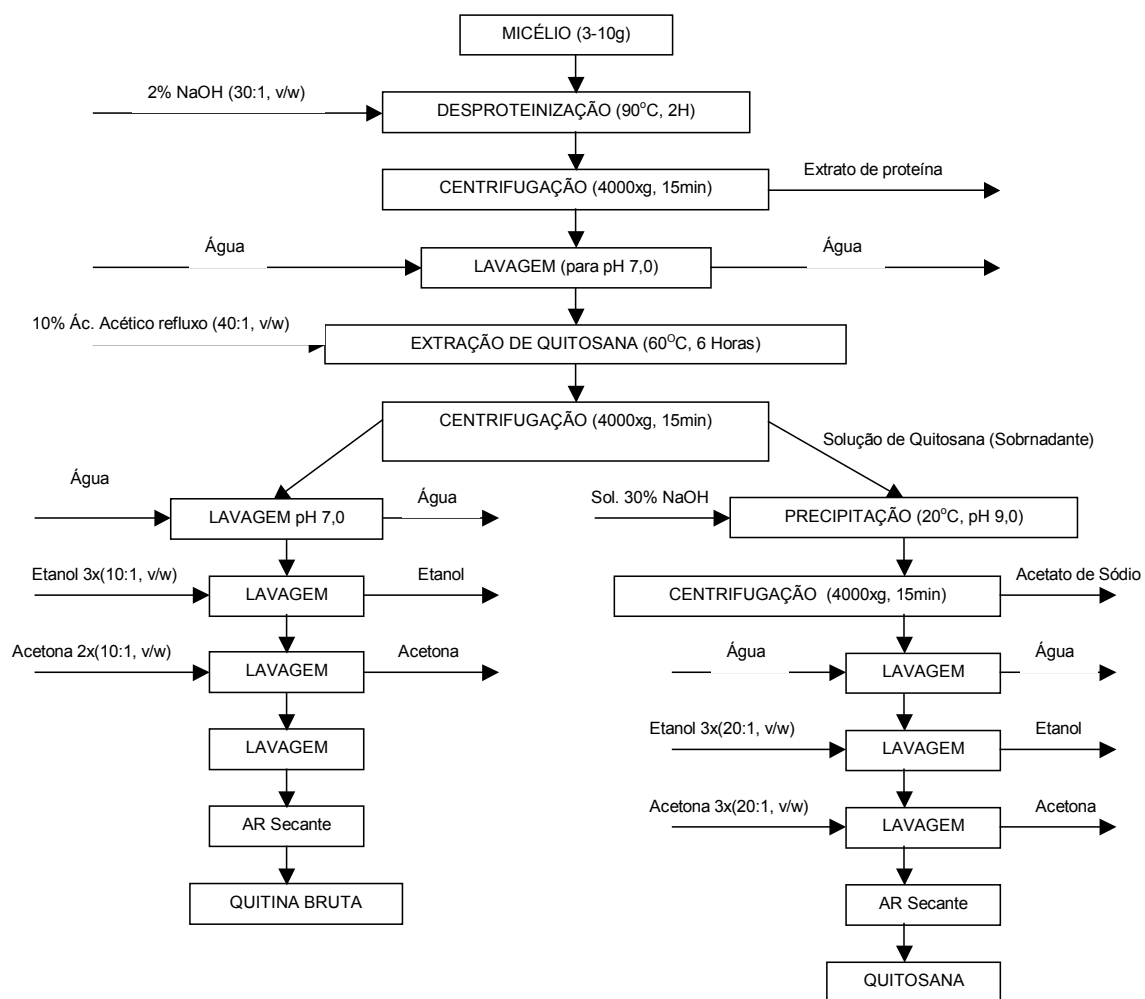


Figura 1 – Esquema da extração de quitina e quitosana segundo o método descrito por Synowieck & Al-Khateeb, 1997.

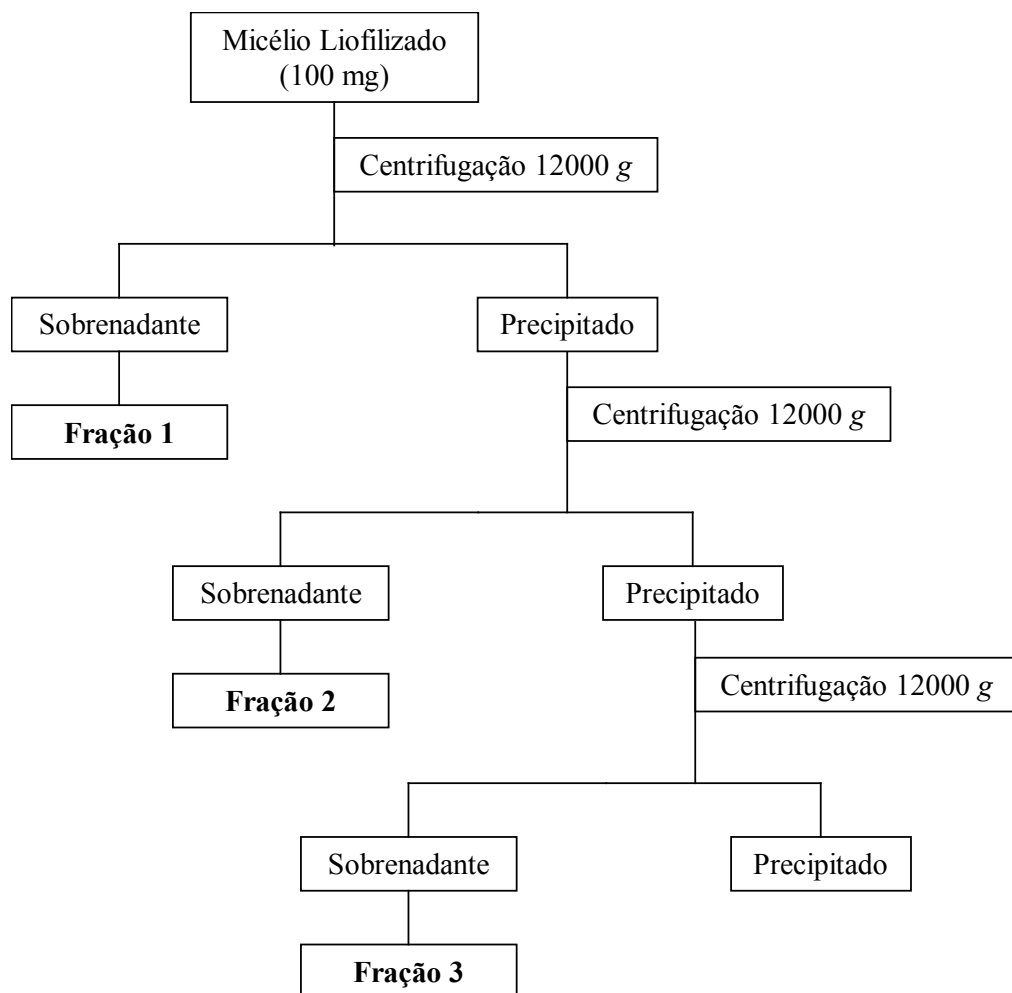


Figura 2 – Esquema da extração seqüencial de polifosfato descrito por Dietrich, 1976 e Smirnov *et al.*, 2002, modificados por Lima *et al.*, 2003.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil de Crescimento

As curvas de crescimento das amostras de *P. chrysosporium* e *C. elegans*, estão apresentados na Figura 3 e 4, respectivamente. Observa-se o perfil de crescimento para *P. chrysosporium* no meio ágar batata dextrose, onde ocorre uma “lag” fase nas primeiras 24 horas, seguido de exponencial até 96 horas de cultivo. Após 144 e 168 horas de cultivo, o rendimento micelial foi de 6,2 g/L, correspondendo a fase estacionária de crescimento. O comportamento do pH no decorrer do período de crescimento oscilou entre a faixa de 4,0 a 5,0.

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram o perfil de crescimento de *C. elegans*, no meio extrato de malte 3%, observando-se uma curta fase “lag”, e a partir de 24 horas inicia-se a fase exponencial, prolongando-se até 96 horas. Contudo, a maior produção de biomassa ocorreu com 144 horas de crescimento, correspondendo a 6,8 g/L. Esses dados estão de acordo com estudos realizados por Rast *et al.*, 1991, onde utilizando uma amostra de *Mucor rouxii* obtiveram rendimento micelial de 7,0 g/L. Resultados inferiores foram demonstrados por Yan & Viraraghavan 2003, utilizando microrganismo semelhante e mesmo meio de crescimento obtendo rendimento micelial de 4,27 g/L. O comportamento do pH no decorrer do período oscilou entre a faixa de 4,0 a 5,0, concordando com os resultados obtidos por White *et al.*, 1979, utilizando *Mucor rouxii*.

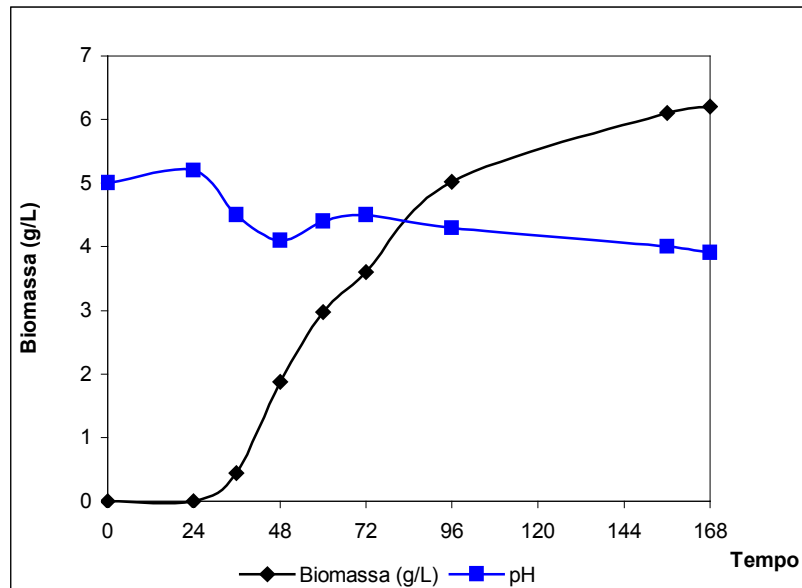


Figura 3. Crescimento de *P. chrysosporium* UCP 963 e medida do pH no meio ágar batata dextrose, 150 rpm, durante 168 horas à temperatura de 28 °C.

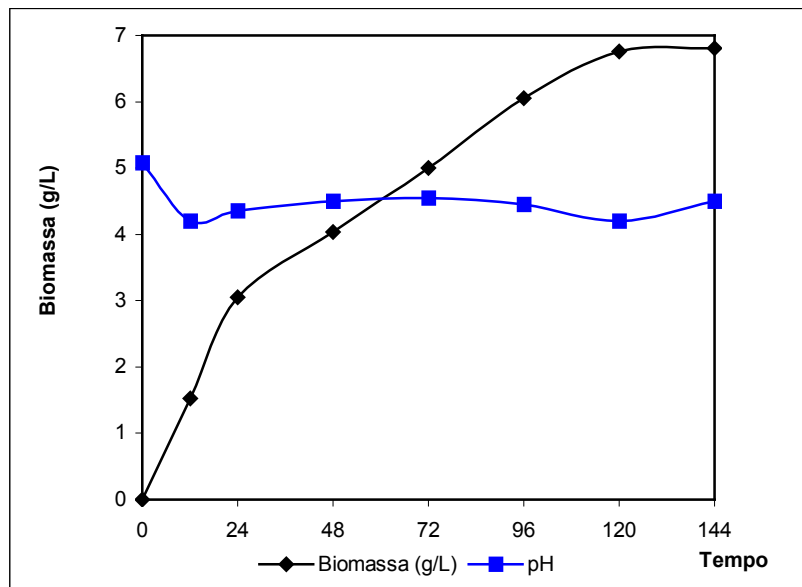


Figura 4. Crescimento de *C. elegans* UCP 596 e a medida do pH no meio extrato de malte 3%, 150 rpm, durante 144 horas à temperatura de 28 °C.

5.2 Composição Bioquímica da Parede Celular

5.2.1 Carboidratos

5.2.1.1 Carboidratos Totais Aminados (quitina e quitosana)

Os polissacarídeos representam geralmente cerca de 80 – 90% da parede celular dos fungos, sendo os dois componentes mais importantes a quitina e celulose. O elemento mais representativo da parede celular dos fungos são unidades de quitina, que são polímeros de cadeia longa *N*-acetil-D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas 1-4 (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003).

Quitina e quitosana têm sido relatadas na remoção de um grande número de íons de metal de soluções como titânio, zircônio, mercúrio, cobre e urânio, sendo um dos compostos mais significativo no que diz respeito à ligação de metais durante a bioabsorção (VOLESKY, 1994).

Os dados da Figura 5 mostram o rendimento de quitina por *P. chrysosporium*, crescido em meio batata dextrose ágar, possuindo 16% do total micelial está representado por quitina. Observa-se também a ausência de quitosana, fato que é característico dos fungos pertencentes à classe dos Basidiomycetes.

A Figura 5 apresenta os rendimentos de quitina e quitosana extraídas da biomassa de *C. elegans* UCP 596, crescida em extrato de malte 3%, onde

observa 39,3% e 2,4% da biomassa total é constituída respectivamente por quitina e quitosana. Estudos relacionados com o conteúdo de quitina e quitosana em espécies de *Mucor* e *Cunninghamella* demonstram rendimentos inferiores ao o obtido, pois Synowieck & Al-Khateeb, 1997; Knnor, 1991; Andrade *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2004, apresentaram extração em torno de 9-23% de quitina. Contudo, demonstraram resultados superiores em relação à extração de quitosana, com rendimentos em torno de 7,3-28,8%, quando comparado aos resultados aqui descritos para *P. chrysosporium* e *C. elegans*.

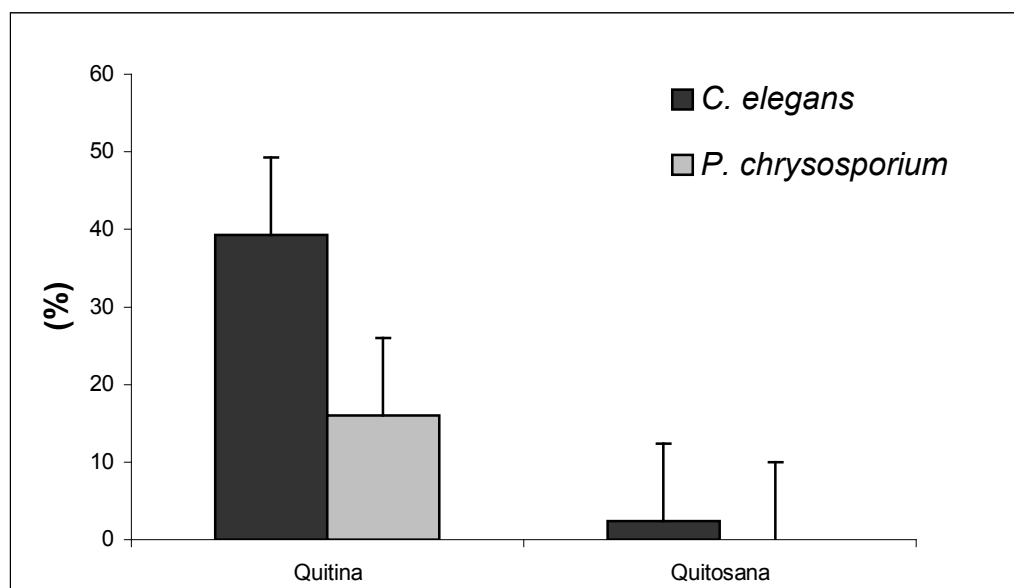


Figura 5. Rendimento de quitina e quitosana extraída de *C. elegans* UCP 596 e *P. chrysosporium* UCP 963 em relação à biomassa total durante 144 horas de cultivo.

5.2.1.2 Carboidratos Totais não Aminados

Diversos parâmetros determinam a bio sorção, como as propriedades estruturais e o biosorbente (proteínas, carboidratos, densidade da carga da superfície). Na tabela 1 pode-se observar que *P. chrysosporium* e *C. elegans* é constituído por 53,11 % e 14,90 %, respectivamente, por carboidratos não aminados

5.2.2 Polifosfato e Proteínas Totais

A parede celular de muitos microrganismos é constituída de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que são grupos funcionais capazes de se ligar aos metais pesados (SAGLAM *et al.*, 2002). Outros maiores componentes da parede celular incluem ácido poliurônico e polifosfatos. Os grupos funcionais da parede celular como grupos aminas, ácidos carboxílicos, sulfidrilícos, fosfatos e tióis, diferem em sua afinidade para a ligação do metal. A quantidade limite da superfície é determinada pelas afinidades dos sítios para com os íons de metais e outros cátions presentes (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram o aumento na bio sorção de chumbo após o tratamento com NaOH para o acréscimo de grupos funcionais, principalmente carregado negativamente (grupos fosfato, os grupos carboxila e nitrogênio nas

proteínas) sob a parede celular de *Phanerochaete chrysosporium* (YETIS *et al.*, 2000).

Numerosas funções biológicas são realizadas pelo polifosfato, dependendo da necessidade da célula ou dos compartimentos celulares. Como esperado de um fosfato poliânion, o polifosfato é um forte quelante de íons de metais (Zn, Fe, Cu e Cd), reduzindo sua toxicidade ou afetando as suas funções (KORNBERG, 1995).

Os resultados da Tabela 1 apresentam a quantidade de proteínas totais e polifosfatos, extraídos da biomassa das amostras de *P. chrysosporium* cultivado em meio batata dextrose ágar, e *C. elegans* em extrato de malte 3%, durante 144 horas de cultivo. Observa-se que a amostra de *C. elegans* é composta intracelularmente por 12,40 % de proteínas e 7,84 % de polifosfato. A amostra de *P. chrysosporium* na sua composição intracelular possui 7,20 %, e 10,68 % de proteínas e polifosfato, respectivamente.

Tabela 1- Determinação parcial da composição bioquímica intracelular de *C. elegans* e *P. chrysosporium* em 144 horas de cultivo.

	<i>C. elegans</i> UCP 596	<i>P. chrysosporium</i> UCP 963
Carboidratos Aminados	41,68 %	16,00 %
Carboidratos não Aminados	14,90 %	53,11 %
Proteínas Totais	12,40 %	7,20 %
Polifosfato	7,84 %	10,68 %
TOTAL	76,82 %	86,99 %

5.3 Sorção dos Metais Pesados

5.3.1 Bio sorção de cobre por *P. chrysosporium* e *C. elegans*

O mecanismo de sorção de metais pelos microrganismos até hoje não está completamente elucidado. A sorção por polissacarídeos, proteínas e outras moléculas que ocorrem na camada externa da parede celular provavelmente possuem o papel mais importante. Experimentos utilizando diversas modificações químicas da parede celular confirmam a presença de vários grupos funcionais ligados a cátions (BALDRIAN, 2003).

A habilidade de bio sorção dos metais pesados pela biomassa, inativada e viva, de *P. chrysosporium* e *C. elegans*, foi determinada pela quantidade de metal pesado em solução aquosa, antes e após o contato com o biosorbente durante o período de 480 minutos. A Tabela 2 mostra que a capacidade de bio sorção de cobre por *C. elegans* nas condições estabelecidas, os resultados indicam variação de 33-171 mg.g⁻¹ de biomassa. O melhor resultado foi demonstrado quando 120 mg de biosorbente vivo, entrou em contato com a solução de 4 mM de cobre, ocorrendo uma maior remoção nos primeiros 120 minutos, em torno de 104,96 mg.g⁻¹ de biomassa (55% de remoção). Na concentração de 6 mM de cobre foi observada a remoção de 171,60 mg.g⁻¹ (57% de remoção) do metal nas condições de 120 mg de biomassa viva, depois de 2 horas de agitação.

A Tabela 3 apresenta a ocorrência de uma variação na capacidade de bioissorção de cobre por *P. chrysosporium* em torno de 33-134 mg.g⁻¹ de biomassa. Na tabela observa-se que na concentração de 4 mM de cobre houve resultados próximos, tanto para 120 mg da biomassa viva como inativada, apresentando valores em torno de 65-75 mg.g⁻¹ (35-40% de remoção) nos 480 minutos de contato. Para a concentração de 6 mM desse mesmo metal não ocorreu diferença entre as condições do biosorbente, ambas apresentaram bioissorção em torno de 122-134 mg.g⁻¹ (41-45% de remoção), em 120 mg de biomassa, no tempo 480 minutos.

Esses resultados concordam com estudos realizados por Baik *et al.*, 2002, onde os autores demonstraram remoções de cobre equivalente a 50 e 110 mg.g⁻¹ por *Aspergillus niger* e *Mucor rouxii*, respectivamente. Siegel *et al.*, 1983, verificou uma capacidade de bioissorção de cobre de 80 mg.g⁻¹ de biomassa por *Penicillium notatum*, Volesk *et al.*, 1993, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* obteve um rendimento de 71 mg.g⁻¹ de bioissorção.

Tabela 2 – Capacidade de bioissorção de cobre pela biomassa viva e inativada de *C. elegans* UCP 596, nas concentrações de 4 e 6 mM.

CONCENTRAÇÃO DE COBRE				
Biomassa	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg g ⁻¹ de biomassa)		
		30 min	120 min	480 min
Viva (120 mg)	347,0	7,13	104,96	13,06
Viva (240 mg)		11,51	33,63	9,20
Inativada (120 mg)		34,85	78,75	35,41
Inativada (240 mg)		17,40	38,46	19,36
Viva (120 mg)	550,0	47,95	171,60	39,74
Viva (240 mg)		30,79	54,16	32,53
Inativada (120 mg)		74,45	139,86	88,89
Inativada (240 mg)		25,67	66,05	39,33

Tabela 3 – Capacidade de bioissorção de cobre pela biomassa viva e inativada de *P. chrysosporium* UCP 963, nas concentrações de 4 e 6 mM.

CONCENTRAÇÃO DE COBRE				
Biomassa	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg g ⁻¹ de biomassa)		
		30 min	120 min	480 min
Viva (120 mg)	347,0	4,91	39,15	65,25
Viva (240 mg)		6,87	23,27	33,90
Inativada (120 mg)		14,93	38,99	75,71
Inativada (240 mg)		17,09	4,14	54,24
Viva (120 mg)	550,0	12,89	77,19	122,78
Viva (240 mg)		13,90	49,46	61,84
Inativada (120 mg)		47,04	59,56	134,18
Inativada (240 mg)		35,27	39,15	88,54

5.3.2 Bioissorção de zinco por *P. chrysosporium* e *C. elegans*

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram uma variação na capacidade de bioissorção de zinco por *C. elegans* em torno de 42-129 mg.g⁻¹ de biomassa. Verifica-se que na concentração de 4 mM de zinco o rendimento da bioissorção, por 120 mg de biomassa viva e inativada, foi mais eficiente, com 94,44 mg.g⁻¹ e 90,47 mg.g⁻¹ (51 e 47% de remoção), respectivamente, em 480 minutos. Semelhante resultado pode ser observado na concentração de 6 mM do metal, que foi em torno de 129 mg.g⁻¹ (53% de remoção) para 120 mg de biomassa inativada, com 120 minutos.

O rendimento da bioissorção representado pela Tabela 5, demonstra que a capacidade de bioissorção de zinco por *P. chrysosporium* variou no mínimo de 51 mg.g⁻¹ ao máximo de 107 mg.g⁻¹, em 480 minutos de contato da solução de metal com o biosorbente. O maior rendimento do biosorbente foi observado na concentração de 6 mM do metal, utilizando 240 mg de biomassa inativada, que foi de 73,34 mg.g⁻¹ (63% de remoção). Semelhante capacidade foi observada na concentração de 4 mM, que foi de 101,72 mg.g⁻¹ de biomassa.

Resultados inferiores aos obtidos nesse estudo foram demonstrados por Arica *et al.*, 2003, que utilizaram a biomassa viva e inativada de *P. chrysosporium* obtendo rendimentos de 37 e 47 mg.g⁻¹, respectivamente. Ozer *et al.*, 1997, utilizando a biomassa de *Rhizopus arrhizus* obteve resultados menores aos apresentados aqui, com capacidade de remoção de 62 mg.g⁻¹. Yan

& Viraraghavan 2003, demonstraram que a capacidade de remoção pela biomassa de *Mucor rouxii* foi de 44.21 mg.g⁻¹. Fourest *et al.*, 1994, apresentou resultados obtidos por *R. arrhizus*, *Mucor miehei* e *Penicillium chrysogenum*, como rendimentos de 35, 32 e 22 mg.g⁻¹ de biomassa, respectivamente.

Tabela 4 – Capacidade de bioissorção de zinco pela biomassa viva e inativada de *C. elegans* UCP 596, nas concentrações de 4 e 6 mM.

CONCENTRAÇÃO DE ZINCO				
Biomassa	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg g ⁻¹ de biomassa)		
		30 min	120 min	480 min
Viva (120 mg)	261,6	45,73	69,39	94,44
Viva (240 mg)		28,12	40,76	51,19
Inativada (120 mg)		42,86	65,34	90,47
Inativada (240 mg)		22,39	11,02	42,26
Viva (120 mg)	392,4	0,16	98,97	97,10
Viva (240 mg)		37,73	63,23	68,41
Inativada (120 mg)		60,16	129,71	124,97
Inativada (240 mg)		36,77	53,53	65,76

Tabela 5 – Capacidade de bioissorção de zinco pela biomassa viva e inativada de *P. chrysosporium* UCP 963, nas concentrações de 4 e 6 mM.

CONCENTRAÇÃO DE ZINCO				
Biomassa	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg g ⁻¹ de biomassa)		
		30 min	120 min	480 min
Viva (120 mg)	261,6	18,01	66,15	58,04
Viva (240 mg)		0	34,69	33,65
Inativada (120 mg)		18,01	23,28	101,72
Inativada (240 mg)		19,04	27,41	27,36
Viva (120 mg)	392,4	2,80	90,88	107,69
Viva (240 mg)		0	18,34	51,86
Inativada (120 mg)		0	56,90	101,08
Inativada (240 mg)		0	73,34	53,18

6. CONCLUSÕES

- A amostra de *Cunninghamella elegans* UCP 596 apresenta bom desenvolvimento no meio contendo extrato de malte 3%;
- *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 não demonstrou crescimento em extrato de malte 3%, sendo cultivado no meio ágar batata dextrose;
- A amostra de *C. elegans* UCP 596 possui quantidade representativa de quitina e quitosana em seu micélio;
- O isolado *P. chrysosporium* UCP 963 tem pequena quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular;
- As amostras de *P. chrysosporium* UCP 963 e *C. elegans* UCP 596 possuem habilidade biosorptiva pelo micélio tanto vivo como inativado;
- A capacidade de remoção ocorre quando a concentração da biomassa é de 120 mg, sugerindo assim uma futura aplicação, dessas biomassas, na sorção de metais pesados em ambientes contaminados.

7. REFERÊNCIAS

AHUJA, P.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Zn^{2+} Biosorption by *Oscillatoria angustissima*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 77-85, 1999.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory Mycology**. Jonh Wiley & Sons, New York, p. 61-63, 1996.

ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Journal Canadian Microbiology**, v. 46, p. 1042-1045, 2000.

ARICA, M. Y.; ARPA, C.; ERGENE, A.; BAYRAMOGLU, G.; GENÇ, O. Ca-alginate as a support for Pb(II) and Zn(II) biosorption with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 167-174, 2003.

BAIJAL, U.; MEHROTRA, B. S. The genus *Cunninghamella* – a reassessment. **Sydowia**, v. 33, p. 1-13, 1980.

BAIK, W. Y.; BAE, J. H.; CHO, K. M.; HARTMEIER, W. Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 167-170, 2002.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 78-91, 2003.

BAYRAMOGLU, G.; BEKTAS, S.; ARICA, M. Y. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. B101, p. 285-300, 2003

BOGAN, B. W.; LAMAR, R. T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and Its Extracellular Ligninolytic Enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62 (5), p. 1597-1603, 1996.

BRODA, P.; BIRCH, P. R. J.; BROOKS, P. R.; SIMS, P. F. G. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. **Molecular Microbiology**, v. 19 (5), p. 923-932, 1996.

BROWN, E. D.; YADA, R. Y.; MARANGON, A. G. The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in aerosol – OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1161.p. 66-72, 1993.

BURDSALL, H. H. Jr. A contribution to the taxonomy of the genus *Phanerochaete* (Corticaceae, Aphyllophorales). **Mycologia Memoir**, v. 10, p. 1-65, 1985.

CERNIGLIA, C. E.; GUBSON, D. T. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34(4), p. 363-70, 1977.

CERTIK, M.; BALTESZOLA, L.; SAJBIROX, J. Lipid formation and γ -linolenic acid production by mucorales fungi grown on sunflower oil. **Letter in Applied Microbiology**, v. 25, p. 101-105, 1997.

CERVANTES, C.; GUTIERREZ-CORANA, F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbial Reviews**, v. 14, p. 121-138, 1994.

CONAMA, Conselho de Política Ambiental. Deliberação Normativa nº 20, **Diário Oficial da União**, p. 11356-11357, 30 de julho de 1986.

CURDOVÁ, E.; VAVRUSKOVÁ, L.; SUCHANEK, M.; VALDRÍAN, P.; GABRIEL, J. ICP-MS determination on heavy metals in submerged cultures of wood-rotting fungi. **Talanta**, v. 62, p. 483-487, 2004.

DEMIRBAS, A. Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. **Food Chemistry**, v. 75, p. 453-457, 2001.

DIETRICH, S. M. C. Presence of polyphosphate of low molecular weight in Zygomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 127, p. 1408-1413, 1976.

DNPM, **Departamento Nacional de Produção Mineral**, Balanço Mineral Brasileiro, 2001, on-line. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/portal/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=65>.
Último acesso em 27 de janeiro de 2005.

DOMSCH K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**, Academic Press, v. 1, p. 120, 1980.

DUBE, H. C. A textbook of Fungi, Bacteria and Viruses. **Vikas Publishing House Put Ltd.**, p. 239, 1978.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ENDO, A.; TAKESHIMA, H.; KUWABARA, K. Acetil CoA Carboxylase inhibitors from the Fungus *Gongronella butleri*. **The Journal of Antibiotics**, v. 38 (5), p. 599-604, 1985.

FOUREST, E.; CANAL, C.; ROUX, J. C.; Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomass (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. **FEMS Microbial Reviews**, v. 14, p. 325–32, 1994.

FRANCO, O. L.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; SACCONI, A. M.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Heavy Metal Biosorption by Chitin and Chitosan Isolated From *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 243-247, 2004.

GALLI, E.; DI MARIO, F.; RAPANÀ, P.; LORENZONI, P.; ANGELINI, R. Copper biosorption by *Auricularia polytricha*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 133-137, 2003.

GALUN, M.; GALUN, E.; SIEGEL, B. Z.; KELLER, P.; LEHR, H.; SIEGEL, S. M. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. **Air soil Polluents**, v. 33, p. 359-371, 1987.

GOMES, N. C. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SAVAIDIS, I. Metal biorremediation by Microorganisms. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 359-371, 1998.

HERNANDEZ, A.; MELLADO, R. P.; MARTINEZ, J. L. Metal accumulation and vanadium-induced multi drug resistance by Environmental isolates of *Echerichia coli* and *Enterobacter cloacae*. **Applied Environment Microbiology**, v. 64, no. 11, p. 4317-4320, 1998.

JEON, C.; PARK, J. Y.; YOO, Y. J. Novel immobilization of alginic acid for heavy metal removal. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 159-166, 2002.

JEON, C.; WOLFGANG, H. H. Application of the surface complexation model to heavy metal sorption equilibria onto aminated chitosan. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 421–428, 2004.

KAÇAR, Y.; ARPA, P; TAN, S.; DENIZLI, A. GENÇ, O.; ARICA, M. Y. Biosorption de Hg(II) e Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 601-610, 2002.

KAFETZOPOULOS, D., MARTINOU, A. AND BOURIOTIS V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p.2564-2568, 1993.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal Biosorption - an Alternative Treatment Option For Heavy Metal Bearing Wastewaters: A Review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.

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

KEASLING, L. D.; VAN DIEN, S. J.; TRELSTAD, P.; RENNINGER, N.; MCMAHOM, K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**, v. 65 (3), p. 324-331, 1999.

KENT, P. W. Chitin and Mucosubstances. In: FLORKIN, M.; MASSON, H. S. (eds.) Comparative Biochemistry. **Academic Press Inc.**, p. 101-118, 1964.

KNNOR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management, **Food Technology**, v. 45, p. 114-122, 1991.

KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 491-496, 1995.

KULAEV, I. S. Biochemistry and Biotechnology of Inorganic polyphosphates. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65 (3), p. 269-278, 2000.

LAMACKA, M.; SAJBIDOR, J. The content of prostaglandins and their precursors in *Mortierella* e *Cunninghamella* species. **Letters of Applied Microbiology**, v. 26, p. 224-226, 1998.

LEHNIGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 2^a ed, São Paulo, p, 229-233, 1995.

LEHRER, R. I.; HOWARD, D. H. SYPHER, P. S.; EDWARD, E. S. J. E.; SEGAL, G. P.; WINSTON, D. J. Mucomycosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 93, 1980.

LI, Q.; WU, S.; LIU, S.; LIAO, X.; DENG, X.; SUN, D.; HU, Y.; HUANG, Y. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Separation and Purification Technology**, v. 34, p. 135-142, 2004.

LIMA, M. A. B.; NASCIMENTO, A. E.; DE SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effects of Phosphorus on Polyphosphate Accumulation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 363-372, 2003.

LINCH, J. M. Biotecnologia do Solo. Fatores microbiológicos na produtividade agrícola. **Editora Manole Ltda**, São Paulo, p. 209, 1986 .

LIU, H. L.; CHEN, B. Y.; LAN, Y. W.; CHENG, Y, C. Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. **Chemical Engineering Journal**, v. 97, p, 195-201, 2004.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, p. 261-278, 2004.

MINO, T.; VANLOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Microbiology and Biochemistry of the enhanced Biological Phosphate Removal Process. **Water Research**, v. 32, p. 3193-3207, 1998.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 730-750, 1999.

OSMANI, A.; SCRUTTON, M. C. The sub-cellular localizations and regulatory properties of pyruvate carboxylases from *Rhizopus arrhizus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 147, p. 119-128, 1985

OZER, A.; EKIZ, H.I.; OZER, D.; KUTSAL, T.; ÇAGLAR, A. A staged purification process to remove heavy metal ions from wastewater using *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 319-326, 1997.

ÖZER, A.; OZER, D.; EKIZ, H. I. Application of Freundlich and Langmuir models to multistage purification process to remove heavy metal ions by using *Schizomeris leibleinii*, **Process Biochemistry**, v. 34, p. 919-927, 1999.

PARALES, R. E.; BRUCE, N. C.; SCHMID, A.; WACKETT, L. P. Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68 (10), p. 4699-4709, 2002

PARKER, D. L.; RAI, L. C.; MALLICK, N.; RAI, P. K.; KUMAR, H. D. Effects of cellular metabolism and viability on metal ion accumulation by cultured biomass from a bloom of the Cyanobacterium *Mycrocystis aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 64, p. 1545-1547, 1998.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R. Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Progress**. v. 11(4), p. 368-379, 1995.

POTHULURI, J. V.; DOERGE, D. R.; CHURCHWELL, M. I.; FU, P. P.; CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 53, p. 153-174, 1998a. 1998b

POTHULURI, J. V.; SUTHERLAND, J. B.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3106-3109, 1998b.

RAST, D. M.; HORSH, M.; FURTER, R.; GOODAY, G. W. A complex chitnolytic systems in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*. Properties and function. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2797-2810, 1991.

SAGLAM, A.; YALCINKAYA, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y.; GENC, O.; BEZTAS, S. Biosorption of mercury by carboxymethylcellulose and immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Microchemical Journal**, V. 71, P. 73-81, 2002.

SAGLAM, N.; SAY, R.; DENIZLI, A.; PATIR, S.; ARICA, Y. A. Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to *Phanerochaete chrysosporium* mycelium. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 725-730, 1999.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 67-70, 2001.

SIEGEL, S.; KELLER, P.; GALUN, M.; LEHR, H.; SIEGEL, B.; GALUN, E. Biocorrosion: solubilization and accumulation of metals by fungi. **Water, Air, Soil, & Pollution**, v. 19, p. 229-36, 1983.

SIGOILLOT, J. C.; PETIT-CONIL, M.; HERPOEL, I.; JOSELAU, J. P.; RUEL, K.; KUREK, B.; CHOUDENS, C.; ASTHER, M. Energy saving with fungal enzymatic treatment of industrial poplar alkaline peroxide pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29 (2-3), p. 160-165, 2001.

SING, C.; YU, J. Copper Adsorption and Removal from Water by Living Mycelium of White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 32 (9), p. 2746-2752, 1998.

SMIRNOV, A. V.; KULAKOVSKAYA, T. V.; KULAEV, I. S. Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 643-649, 2002.

STRANDBERG, G. W.; SHUMATE II, S. E.; PARROT JR, J. R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of Uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 41, p. 237-245, 1981.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATTEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 20, p. 605-610, 1997.

TOMBS, M. P.; BLAKE, G. G. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 700, p. 81-89, 1982.

TORRES, M.; GOLDBERG, J.; JENSEN, T. E. Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (cyanophyceae). **Microbios**, v. 96 (385), p. 141-147, 1998.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 108, p. 249-253, 1990.

VAN-LOOSDRECHT, M. C.; SMOLDERS, G. J.; KUBA, T.; HEIJNEN, J. J. Metabolism of Microorganisms Responsible for Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 71 (1-2), p. 109-116, 1997.

VILLEN, R. A. Biotecnologia – Histórico e Tendências, **Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia**, São Paulo, 2003.

VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z.R. (1993) Cd(II) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 41, p. 826-829, 1993.

VOLESKY, B. Advances in biosorption of metals: Selection of biomass types. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, p. 291-302, 1994.

WHITE, S. A.; FARINA, P. R.; FULTON, I. Production and isolation of chitosan for *Mucor rouxii*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 38, p. 232-328, 1979.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. **Water Research**, v. 37, p. 4486–4496, 2003.

YETIS, U.; DOLEK, A.; DILEK, F. B.; OZCENGIZ, G. The Removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 34, p. 4090-4100, 2000.

ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J. E.; CERNIGLIA, C. E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS Microbial Letters**, v. 138, p. 221-226, 1996.