

**MUCORALES DE SOLO CONTAMINADO COM METAIS  
PESADOS NA REGIÃO DO PÓLO CERÂMICO DE SANTA  
GERTRUDES, SP: OCORRÊNCIA E CAPACIDADE DE  
BIOSSORÇÃO DE CHUMBO E ZINCO**

JOSÉ IVANILDO DE SOUZA

Orientador: Profa. Dra. IRACEMA HELENA SCHOENLEIN-CRUSIUS

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual Paulista “Julio de  
Mesquita Filho”, Campus de Rio  
Claro, para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas  
(Área de Concentração:  
Microbiologia Aplicada)**

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Dezembro de 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## Ficha Catalográfica

589.2 S729m	de Souza, José Ivanildo. Mucorales de solo contaminado com metais pesados na região do pólo cerâmico de Santa Gertrudes, SP : ocorrência e capacidade de bioissorção de chumbo e zinco.-- Rio Claro: [s.n.], 2006 221 f. :, gráfs., tabs., fots., mapas  Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Orientador: Iracema Helena Schoenlein-Crusius  1. Fungos terrestres. 2. Áreas contaminadas. 3. Taxonomia 4. Zigomicetos. 5. <i>Mucor hiemalis</i> ; Santa Gertrudes I. Título
----------------	---

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP - Campus de Rio Claro, SP.

...

Oh mãe

O amor que eu tenho por você é seu

Mãe

O amor que eu tenho por você é seu

Como é seu o meu aniversário...

(Nando Reis)

Obrigado por tudo, dona Dalva Maria de Souza

Dedico este trabalho a você, que me ensinou do seu jeito especial as primeiras letras, os primeiros algarismos.

Lembra?

Que sempre me incentivou e me direcionou aos estudos.

Muitas lições de vida colhemos juntos.

Obrigado mãe.

Ofereço aos meus queridos irmãos Ivaneide, Dalva, Cosme, Damião, Daniel e aos pequenos sobrinhos Rayssa e Théó. Nunca desistam de seus ideais!

Mariana A. V. Tezini, obrigado por tornar mais agradável o meu viver com a nossa convivência, pela compreensão e partilha de muitos momentos nesta caminhada.

Obrigado meu amor!

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1. Papel dos Fungos no Solo.....	7
3.2. Fungos da Ordem Mucorales (Zygomycetes, Zygomycota).....	9
3.3. Metais Pesados e a Micota Terrestre.....	14
3.4. Chumbo.....	21
3.5. Zinco.....	22
3.6. Bioissorção de Metais Pesados.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Caracterização da Área de Estudo.....	27
4.2. Amostragens de Solo.....	30
4.3. Técnica de Isolamento dos Fungos.....	31
4.4. Identificação Taxonômica.....	31
4.4.1. Preparo de Culturas Monospóricas.....	33
4.5. Curvas de Crescimento e Produção de Biomassa.....	34
4.6. Ensaio de Bioissorção de Pb e Zn.....	35
4.6.1. Análise Química de Pb e Zn.....	36
4.7. Análise Estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Ambiente Estudado e Fungos Obtidos.....	38
5.1.1. Caracterização Climática da Área de Estudo.....	38
5.1.2. Características das Amostras de Solo.....	44
5.1.3. Metodologia de Isolamento.....	50

5.2. Descrição taxonômica.....	68
5.2.1. Gênero <i>Absidia</i> van Tieghem.....	68
5.2.2. Gênero <i>Cunninghamella</i> Matruchot.....	75
5.2.3. Gênero <i>Mucor</i> Fresenius.....	80
5.2.4. Gênero <i>Rhizopus</i> Ehrenberg.....	117
5.2.5. Gênero <i>Zygorrhynchus</i> Vuillemin.....	122
5.3. Curvas de Crescimento e Produção de Biomassa.....	127
5.4. Ensaio de Biossorção de Pb e Zn.....	134
6. CONCLUSÕES.....	144
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
8. APÊNDICES.....	168
8.1. Apêndice 1 - ANOVA Curvas de Crescimento.....	169
8.2. Apêndice 2 - ANOVA Biossorção.....	188



## AGRADECIMENTOS

- A Dra. Iracema Helena Schoenlein-Crusius pela grande amizade, confiança depositada em mim e ao seu exemplo de profissionalismo.
- Aos grandes amigos e colegas de curso, Luísa Helena dos Santos Oliveira e Prof. Norberto Carlos Schoenlein. Valeu cada instante de convivência com vocês, muito obrigado!
- A Dra. Sandra F. B. Trufem pela grande amizade e inestimável auxílio nos meus primeiros passos rumo à taxonomia de Mucorales.
- A Dra. Carmen L. A. Pires-Zottarelli pela grande amizade, simpatia, espírito de equipe e por facilitar o uso do equipamento analisador de imagens, que propiciou belas fotos.
- A MSc. Mirian Cilene Spasiani Rinaldi da Seção de Ecologia do IBt pela enorme ajuda nas análises químicas das soluções de Pb e de Zn.
- A Maria Cecília Tomasi, ilustradora botânica do IBt, pelo acabamento em nanquim das ilustrações de fungos.
- Ao Dr. Cláudio José Barbedo e ao Dr. Nelson Augusto dos Santos Jr. da Seção de Sementes e Melhoramento Vegetal do IBt pelas importantes sugestões e ajuda nas análises estatísticas através do programa Sisvar.
- Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada, pela amizade, prontidão e grande auxílio com o envio dos padrões de Pb e de Zn.
- Ao geólogo André Luiz Bonacin Silva pela amizade e gentil concessão da figura 1 utilizada nesta tese, que estudou aspectos geológicos da mesma área de Sta. Gertrudes em seu doutorado.
- Às pessoas amigas com as quais convivo e convivi na Seção de Micologia e Liquenologia do IBt, que me proporcionam muito aprendizado, o meu muito obrigado: Dr. Aduino Ivo Milanez, Dra. Adriana de Mello Gugliotta, MSc. Adriano A. Spielmann (obrigado pelas dicas sobre o GPS), MSc. Alexandra L. Gomes, MSc. Carolina G. Moreira, Carla Puccinelli, Cristiane A. Nascimento, Dr. Dácio R. Matheus, Filipe R. Baptista, MSc. Glauciane D. Coelho, Dra. Kátia Maria G. Machado, Luciana J. Gimenez, MSc. Luciana S. Canêz, Maria Dorotéia F. Trude,

Maria Luísa Miranda, Dr. Marcelo P. Marcelli, Marina Bianchini, Dra. Marina Capelari, MSc. Michel N. Benatti (obrigado pela revisão final do abstract), Milton F. N. Martins, Dra. Milena L. A. Lima, Nara Ballaminut, MSc. Patrícia Jungbluth, Priscila da Silva, MSc. Ricardo R. Silva, Ricardo S. Oliveira, Dra. Rosely A. P. Grandi, Rosimeire Ap. S. Inácio, MSc. Sérgio L. Moreira Neto, Dra. Vera M. V. Vitali, e Zelinda R. B. Santana.

- Ao Lauro Borges Quaresma e colaboradores, técnicos em informática do IBt, pelo útil suporte em informática.
- Aos funcionários da Seção de Biblioteca do IBt, Maria Helena S. C. F. Gallo, Suely P. de Caldas e Jeferson Ap. de Souza pela simpatia e prontidão em auxiliar às consultas ao acervo.
- A Maria R. P. Oliveira, Rosalina de Mattos e Sirléia C. Ferreira, do setor de xerox do IBt, pela amizade e bons serviços prestados.
- A todos os funcionários do IBt, por fazerem deste lugar um ícone da pesquisa em meio ambiente.
- A todos os Professores e funcionários da UNESP, campus de Rio Claro, SP.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista geral da área de estudos na região dos lagos de Sta. Gertrudes, SP.....	29
Figura 2. Precipitações Pluviométricas ocorridas na região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Valores totais (somatória mensal), máximos e mínimos.....	40
Figura 3. Umidade relativa do ar da região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Ocorrências máximas, médias e mínimas mensais, de leituras diárias realizadas às 9, 15 e 21 h.....	41
Figura 4. Variação térmica da região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Ocorrências máximas, médias e mínimas mensais, de leituras diárias realizadas às 9, 15 e 21 h.....	42
Figura 5. Variação de pressão atmosférica da região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Ocorrências máximas, médias e mínimas mensais, de leituras diárias realizadas às 9, 15 e 21 h.....	43
Figura 6. <i>Absidia cylindrospora</i> v. <i>cylindrospora</i> SPC 2030: a) esporângios; b) columelas; c) rizóide; d) ramificações verticiladas; e) esporangiósoros; f) clamidósoros.....	73
Figura 7. <i>Absidia cylindrospora</i> v. <i>cylindrospora</i> SPC 2031: a) estolão com ramificações verticiladas e isoladas; b) esporangióforo com esporângio; c) esporangióforos com columelas; d) esporangiósoros.....	74
Figura 8. <i>Cunninghamella phaeospora</i> SPC 2032: a) tipos de esporóforos e vesículas; b) esporangiolos globosos e limoniformes; c) esporangiolos equinulados; d) micélio submerso.....	78
Figura 9. <i>Cunninghamella phaeospora</i> SPC 2032: a) esporóforo com esporangiolos aderidos à vesícula; b) esporóforo ramificado; c) vesícula nua; d) esporangiolos lisos; e) esporangiolos equinulados; f) esporangiolo germinando.....	79
Figura 10-A. <i>Mucor bainieri</i> SPC 2033: a) esporangióforos ramificados; b) esporângios; c) columelas; d) e e) azigosporângios; f) esporangiósoros; g) clamidósoros.....	86
Figura 10-B. <i>Mucor bainieri</i> SPC 2033: a) azigóforo longo; b) azigóforo e	

esporangióforo no mesmo ramo; c) azigóforos ramificados; d) esporangióforos em ramificação simpodial; e) azigosporângios diferenciados.....	87
Figura 11-A. <i>Mucor bainieri</i> SPC 2033: a) e b) ramificação com esporangióforos e azigóforos; c) esporângio; d)-f) esporangióforos com columelas.....	88
Figura 11-B. <i>Mucor bainieri</i> SPC 2033: g) e h) azigóforo ramificado; i) e j) azigosporângios; l) azigosporângio mostrando verrugas estelares; m) esporangiósoros.....	89
Figura 12. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> SPC 2034: a) esporângios; b) columelas; c) clamidósoros; d) esporangiósoros; e) esporangióforos em ramificação simpodial; f) esporangióforos circinados.....	94
Figura 13. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> SPC 2034: a) ramificação com esporangióforos curvos; b) esporangióforo curto com esporângio; c) esporangióforo curto com columela; d) esporangióforo longo com columela; e) esporangiósoros.....	95
Figura 14. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i> SPC 2035: a) esporângios; b) columelas; c) clamidósoros; d) esporangiósoros; e) esporangióforos em ramificação simpodial.....	98
Figura 15. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i> SPC 2035: a) esporangióforo com esporângio; b) e c) esporangióforos longos com columelas; d) esporangiósoros.....	99
Figura 16. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> SPC 2036: a) esporângios; b) columelas; c) e d) esporangióforos; e) clamidósoros; f) esporangiósoros.....	102
Figura 17. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> SPC 2036: a) ramificações com esporangióforos curvos e circinados; b) e c) esporangióforos com esporângios; d) esporangiósoros; e) e f) esporangióforos com columelas.....	104
Figura 18. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i> . SPC 2037: a) esporangióforos; b) esporangiósoros; c) columelas. SPC 2038: d) esporangióforos; e) columelas; f) esporangiósoros.....	107
Figura 19. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i> . SPC 2038: a) esporangióforo com esporângio; b) e c) esporangióforos com columelas; d) esporangiósoros.....	108
Figura 20. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>luteus</i> . SPC 2044: a) esporangióforos; b) columelas; c) esporangiósoros. SPC 2045: d) columelas; e) esporangiósoros; f) esporangióforos.....	111

Figura 21. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>luteus</i> SPC 2042: a) esporangióforo com esporângio; b) e c) esporangióforos com columelas; d) esporangiósporos.....	112
Figura 22. <i>Mucor racemosus</i> f. <i>racemosus</i> SPC 2048: a) esporangióforos; b) esporângios; c) columelas; d) clamidósporos; e) esporangiósporos.....	115
Figura 23. <i>Mucor racemosus</i> f. <i>racemosus</i> SPC 2048: a) ramificações simpodiais curtas; b) e c) esporangióforos longos com columelas; d) esporangiósporos.....	116
Figura 24. <i>Rhizopus oryzae</i> . SPC 2049: a) esporangióforos; b) columelas; c) esporangiósporos; d) rizóide. SPC 2050: e) esporangióforos; f) columelas; g) esporangiósporos; h) rizóide.....	120
Figura 25. <i>Rhizopus oryzae</i> SPC 2049: a) ramificação com esporangióforos e rizóide; b) esporangióforos com esporângios; c) esporangiósporos; d) e e) esporangióforos com columelas.....	121
Figura 26. <i>Zygorrhynchus moelleri</i> SPC 2051: a) esporangióforos; b) esporângios; c) columelas; d) esporangiósporos; e) e f) zigospórângios heterogâmicos.....	124
Figura 27. <i>Zygorrhynchus moelleri</i> SPC 2051: a) esporangióforo longo com esporângio; b) esporangióforo com columela; c) esporangiósporos; d) zigospórângios; e) zigospórângio.....	125
Figura 28. Produção de biomassa de <i>M. hiemalis</i> e <i>M. bainieri</i> em função de: A) linhagens, B) dias e C) pHi.....	128
Figura 29. Curvas de crescimento e de pH (final) do MA líquido referentes às linhagens de <i>M. hiemalis</i> : A) SPC 2042, B) SPC 2044, C) SPC 2043, D) SPC 2040 e E) SPC 2041; e <i>M. bainieri</i> : F) SPC 2033.....	131
Figura 30. Valores de pH <sub>f</sub> do MA líquido em relação ao pHi e às linhagens de <i>M. hiemalis</i> e <i>M. bainieri</i> .....	133

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Teores dos elementos Cu, B, Zn, Pb e matéria orgânica (MO) de amostras de solo coletadas a até 10 cm de profundidade na área de estudos em Sta. Gertrudes, SP.....	46
Tabela 2. Valores de pH e teor de umidade das amostras de solo dos cinco locais de coleta em Sta. Gertrudes, SP.....	49
Tabela 3. Táxons de Mucorales do solo de Sta. Gertrudes, SP isolados em MA sólido (2%) sem adição de metais, controles (C), ou adicionado de crescentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de Pb ou de Zn.....	55

## ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection, EUA.

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda.

DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Alemanha.

IMI - International Mycological Institute, Inglaterra.

NRRL - Northern Regional Research Laboratories, EUA.

SPC - Coleção de Culturas de Fungos do Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil.

UCP - Coleção de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco, PE, Brasil.

UFMG - Coleção de Culturas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, MG, Brasil.

## RESUMO

Em solo contaminado com metais pesados na região do pólo cerâmico do município de Santa Gertrudes, Estado de São Paulo, Brasil, foi realizado o levantamento taxonômico de fungos da ordem Mucorales (Zygomycota) utilizando-se o método da placa-de-solo, modificado pela aplicação de uma suspensão de solo (10%, p v<sup>-1</sup>) sobre malte agar (2%, p v<sup>-1</sup>) acrescido de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> nas concentrações de 0 (controle), 100, 200, 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup>. As identificações e descrições taxonômicas foram realizadas utilizando-se SMA (“synthetic *Mucor* agar”), sendo obtidos os táxons: *Absidia cylindrospora* v. *cylindrospora* Hesselt. & Ellis, *Cunninghamella phaeospora* Boedijn, *Mucor circinelloides* Tiegh. f. *circinelloides*, *M. circinelloides* Tiegh. f. *lusitanicus* (Bruderl.) Schipper, *M. circinelloides* Tiegh. f. *janssenii* (Lendn.) Schipper, *Mucor hiemalis* Wehmer f. *hiemalis*, *M. hiemalis* Wehmer f. *luteus* (Linnem.) Schipper, *Mucor racemosus* Fresen. f. *racemosus*, *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl., *Zygorrhynchus moelleri* Vuill. e *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal, que é citado pela primeira vez para o Brasil. Análises químicas de amostras de solo coletadas em quatro locais na área estudada confirmaram a contaminação severa por metais pesados em alguns dos locais, sendo que comparações entre o número de táxons obtidos no presente estudo com os dados de literatura permitiram concluir que houve prejuízo à diversidade de fungos na região. As biomassas secas e pulverizadas (2 g L<sup>-1</sup>) de *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (SPC 2040) e de *Mucor hiemalis* f. *luteus* (SPC 2044) foram colocadas em contato, sob agitação a 120 rpm por 14 h, com soluções aquosas (pH 4) de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> nas concentrações de 0,06, 0,13 e 0,17 mM e de 0,08, 0,16 e 0,23 mM, respectivamente, sendo comparadas ao carvão ativado (CA), utilizado como material adsorvente de referência. As quantidades percentuais de metais removidos das soluções, expressas pelo índice q%, apresentaram as seguintes seqüências de adsorção: CA > SPC 2044 > SPC 2040 em relação ao Pb e CA > SPC 2040 > SPC 2044 no caso do Zn. Embora o CA tenha exibido os maiores índices de adsorção de Pb e de Zn, as biomassas das duas linhagens de *M. hiemalis* apresentaram resultados que confirmaram seu potencial para a biossorção de metais pesados em soluções aquosas.



## ABSTRACT

In a heavy metal contaminated soil at ceramic pole of Santa Gertrudes region, São Paulo State, Brazil, a taxonomic survey of fungi of the order Mucorales (Zygomycota) have been done using the soil plate method, modified for a soil suspension (10%,  $p\ v^{-1}$ ) application on malt agar (2%,  $p\ v^{-1}$ ) added with  $Pb(NO_3)_2$  or  $Zn(NO_3)_2$  at 0 (control), 100, 200, 500 and 1000  $mg\ L^{-1}$  concentrations. Taxonomic identifications and descriptions have been done with SMA (synthetic *Mucor* agar), obtaining the taxa: *Absidia cylindrospora* v. *cylindrospora* Hesselt. & Ellis, *Cunninghamella phaeospora* Boedijn, *Mucor circinelloides* Tiegh. f. *circinelloides*, *M. circinelloides* Tiegh. f. *lusitanicus* (Bruderl.) Schipper, *M. circinelloides* Tiegh. f. *janssenii* (Lendn.) Schipper, *Mucor hiemalis* Wehmer f. *hiemalis*, *M. hiemalis* Wehmer f. *luteus* (Linnem.) Schipper, *Mucor racemosus* Fresen. f. *racemosus*, *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl., *Zygorrhynchus moelleri* Vuill. and *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal, that is cited first time for Brazil. Chemical analyses of soil samples taken from four sites in the studied area confirm a severe contamination of heavy metals in some of the sites, and comparisons between taxa numbers obtained in the present study with literature data allowed conclude that there was fungal diversity disturbance in the region. The dry and grounded biomasses (2  $g\ L^{-1}$ ) of *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (SPC 2040) and *Mucor hiemalis* f. *luteus* (SPC 2044) was kept in contact, under agitation at 120 rpm during 14 h, with aqueous solutions (pH 4) of  $Pb(NO_3)_2$  and  $Zn(NO_3)_2$  at 0.06, 0.13, 0.17 mM and 0.08, 0.16, 0.23 mM concentrations, respectively, being compared with activated charcoal (AC) as the reference adsorbent. The percentages amounts of metals removed from solutions, express by q% index, had presented the following adsorption sequences: AC > SPC 2044 > SPC 2040 for Pb and AC > SPC 2040 > SPC 2044 for Zn. Although the AC has shown the higher adsorption indices of Pb and Zn, the biomasses of *M. hiemalis* strains had presented results that confirm their potentialities for biosorption of heavy metals from aqueous solutions.

## 1. INTRODUÇÃO

No km 168 da rodovia Washington Luiz (SP-310), à margem esquerda do sentido capital-interior, localiza-se uma área pertencente ao município de Sta. Gertrudes, SP, dentro da qual existem seis lagos artificiais originados de antigas cavas de extração de argila, os quais são unidos pelo córrego da Fazenda Itaqui, subafluente do Rio Corumbataí. A região é conhecida como pólo cerâmico de Sta. Gertrudes e possui um pesqueiro do tipo pesque-pague, utilizado como local de entretenimento. O solo desta área encontra-se contaminado por metais pesados e outros elementos químicos derivados de efluentes líquidos e resíduos cerâmicos sólidos, descartados inadequadamente por indústrias cerâmicas locais (HIDRO AMBIENTE, 2000; BONACIN SILVA, 2001; FIALHO *et al.*, 2002).

BONACIN SILVA (2001) realizou estudo hidrogeoquímico detalhado da área, analisando amostras de água, solo e sedimentos de fundo dos lagos, tendo em vista a caracterização e o diagnóstico ambiental, assim como a determinação do comportamento e da mobilidade do Pb, do Zn e do B oriundos das atividades industriais. Houve a constatação que nos sedimentos de fundo, por exemplo, os teores destes três elementos atingiram, respectivamente, até 130, 100 e 125 vezes acima das concentrações observadas nos sedimentos do lago utilizado como referência. A partir da obtenção destes e de outros dados do estudo ficou evidenciada a necessidade urgente de intervenção na área contaminada do pólo cerâmico de Sta. Gertrudes, cujo parque industrial estende-se pelos municípios vizinhos de Cordeirópolis, Rio Claro, Iracemápolis, Araras, Limeira e Piracicaba (BONACIN SILVA, 2001).

A cidade de Sta. Gertrudes ocupa uma área de 97,7 km<sup>2</sup> na porção centro-oeste do Estado de São Paulo e possui as seguintes características geográficas: latitude - 22° 27' 24" S e longitude - 47° 31' 49" W; 595 m de altitude (sede municipal); limita-se com Rio Claro (Norte e Oeste), Iracemápolis (Sul), Cordeirópolis e Araras (Leste), contém cerca de 18.687 habitantes e densidade demográfica de 191,27 habitantes por km<sup>2</sup>; o relevo é suavemente ondulado, solo de formação sedimentar, constituído de camadas de arenito e xistos moles e alguns diques básicos, que por decomposição originam a terra roxa e a argila; o clima é mesotérmico, com estiagem no inverno e período chuvoso de novembro a janeiro e precipitação média anual de 1.280 mm; contém minérios tipo diábase, argila explorada pelas indústrias cerâmicas locais para a produção de pisos cerâmicos; a hidrografia é composta por córregos, represas e cinco poços artesianos; a economia base é voltada às indústrias cerâmicas, sendo o total de 18 indústrias responsáveis por um terço da produção nacional de pisos e revestimentos cerâmicos, que empregam diretamente cerca de 2.795 pessoas (PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA GERTRUDES, 2006).

Com o objetivo de sanar os problemas ambientais decorrentes da poluição industrial na área do pólo cerâmico, foram assinados em meados de 1998, dois tratados entre a Cetesb (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Agência de Piracicaba) e as indústrias ceramistas: o Protocolo de Intenções de Recuperação dos Lagos da Microbacia do Córrego da Fazenda Itaqui e o Protocolo de Intenções de Prevenção à Poluição. O primeiro envolveu 14 indústrias de Sta. Gertrudes e o segundo, as indústrias de mais sete municípios vizinhos, somando-se 40 indústrias (CORUMBATAÍ NEWS, 1999a). Estes acordos e seus desdobramentos foram inseridos no Projeto Corumbataí Cerâmicas, da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, no qual tentou-se iniciar a recomposição de vegetação da área degradada com o plantio de mudas de espécies nativas. Porém, foi constatado que a maioria das espécies apresentou injúrias foliares, desenvolvimento abaixo da expectativa e mortalidade.

Visando-se recuperar e restabelecer a área, aproveitando-a como local de lazer, foi idealizado o projeto "Parque dos Lagos de Sta. Gertrudes", por um grupo de profissionais do DPP (Departamento de Projetos da Paisagem), da CINP (Coordenadoria de Informações Técnicas, Documentação e Pesquisa Ambiental), do Instituto Florestal, da Fundação Florestal e do DEPRN (Departamento Estadual de Proteção dos Recursos Naturais) (CORUMBATAÍ NEWS, 1999b; c; 2000).

Em agosto de 2001 foi definido o “Plano de Intervenção da Região dos Lagos de Sta. Gertrudes”, que foi dividida em três partes: sub-área 1 = lagos 1, 2, 3 e 4; sub-área 2 = lago 5 e dois pesqueiros; e sub-área 3 = lago 6, as quais foram submetidas a novo programa de coletas de amostras de águas subterrâneas, solo e sedimentos para a identificação dos poluentes de maior risco (LEMOS & DIAS, 2001).

De acordo com os dados obtidos em diversos estudos (HIDRO AMBIENTE, 2000; LEMOS & DIAS, 2001; BONACIN SILVA, 2001), a região dos lagos do pólo cerâmico de Sta. Gertrudes está comprometida devido à poluição por diversos elementos químicos que já alcançaram ou poderão alcançar níveis tóxicos na água, no solo e nos sedimentos, inclusive com comprometimento do lençol freático, podendo acarretar sérios riscos às comunidades que utilizarem a água subterrânea do local. No que se refere ao local prioritário para uma ação emergencial quanto ao tratamento e despoluição, a sub-área 2 foi a indicada por abrigar poços de abastecimento de água, pastos e plantação de bananas. Contudo, nas três sub-áreas o solo foi considerado inútil à agricultura e as águas subterrâneas impróprias para a irrigação de plantações, ao consumo humano ou de animais (LEMOS & DIAS, 2001).

Conforme parecer técnico sobre o “Plano de Intervenção da Região dos Lagos de Sta. Gertrudes”, a sub-área 3 é considerada crítica em relação à contaminação do solo por metais pesados e outros elementos tóxicos. Nesta área, foram detectadas elevadas concentrações de Pb, Co, Cu, Zn, Na e B, sendo que a concentração de Pb atingiu  $2.890 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo entre 40-60 cm de profundidade na região alagadiça entre o lago 6 e um dos pesqueiros (LEMOS & DIAS, 2001). BONACIN SILVA (2001) detectou no solo desta mesma área concentrações ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de 122 a 14.700 de Pb, 53 a 2.930 de Zn, 12 a 2.291 de B, 8 a 61 de Ni, 26 a 1.267 de Cu, 124 a 1.104 de Ba, menos que 0,5 a 2,7 de Cd, 45 a 242 de Cr, 189 a 6.289 de Zr e menos que 2 a 13 de As.

Devido ao quadro de degradação ambiental exposto, a Secretaria de Estado do Meio Ambiente iniciou amplo programa com o objetivo de diagnosticar, monitorar e recuperar a área atingida, mediante a determinação de diversos fatores químicos, físicos, geológicos, biológicos e sociológicos (indústrias e população local) envolvidos no contexto do problema de contaminação de solo no pólo cerâmico de Sta. Gertrudes, SP.

Para que estas iniciativas tenham êxito é essencial que a fertilidade do solo esteja adequada, tanto em termos de macro e micronutrientes, como nos teores de matéria

orgânica e microrganismos envolvidos nos processos ecológicos do solo. Diante da reconhecida importância dos fungos na dinâmica de nutrientes do solo, foi sugerida através da extinta CINP, a realização de estudo na tentativa de diagnosticar os possíveis efeitos da presença de elevadas concentrações de metais pesados sobre as populações de fungos terrestres da região e seus reflexos sobre a capacidade de recuperação do solo.

Com este objetivo, foi conduzido na Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica (IBt), São Paulo, SP, o projeto “Fungos filamentosos de solo contaminado com metais pesados no pólo cerâmico do município de Santa Gertrudes, SP”, processo SMA 20.034/03, visando-se o isolamento e a identificação de fungos filamentosos do solo contaminado, bem como a avaliação de possíveis efeitos nocivos dos metais pesados sobre a comunidade fúngica estudada. Dentro deste contexto, a proposta do presente projeto foi: 1) contribuir para o levantamento diagnóstico da micota do solo de Sta. Gertrudes sob influência de metais pesados, concentrando-se nos representantes da ordem Mucorales; 2) analisar o potencial de biossorção de Pb e de Zn por biomassas de linhagens de *Mucor hiemalis* Wehmer, que foi a espécie mais comum dentre os Mucorales obtidos do solo contaminado.

Dentre os fungos isolados de solo, os representantes da ordem Mucorales (Zygomycetes, Zygomycota) constituem grupo relevante, pois ocupam posição definida na ciclagem de nutrientes, participando ativamente da degradação de açúcares simples, etapa inicial da decomposição da matéria orgânica (HESSELTINE & ELLIS, 1973; TRUFEM, 1998a). Todavia, sabe-se que elevadas concentrações de metais pesados tais como o Pb e o Zn no solo, podem alterar a composição original e a diversidade da micota, podendo levar ao desaparecimento de táxons que seriam considerados comuns no ambiente pouco perturbado e a predominância de outros táxons que normalmente teriam baixa representatividade, afetando o equilíbrio natural do ecossistema (NORDGREN *et al.*, 1983; 1985).

Outro aspecto relevante dos Mucorales é que muitos deles são produtores de compostos de interesse em processos biotecnológicos industriais tais como amilases, glicerina, etanol, gliceraldeído, ácido cítrico, láctico, fumárico, succínico e oxálico (*Mucor* spp.); ácido láctico, fumárico, amilases cortisona e hidroxiprogesterona (*Rhizopus* spp.);  $\beta$ -caroteno (*Choanephora cucurbitarum* (Berk. & Ravenel) Thaxt., *C. conjuncta* Couch, *Blakeslea trispora* Thaxt. e *B. circinans* H. Nagan. & N. Kawak.); cortisol e ácido

fumárico (*Cunninghamella blakesleeana* Lendn.); e proteases (*Helicostylum piriforme* Bainier e *Mortierella renispora* Dixon-Stew.); além de participarem da fermentação de alimentos típicos dos povos asiáticos como o shoyu, o tempeh, o miso, o sufu, dentre outros (HESSELTINE & ANDERSON, 1957; HESSELTINE, 1965; MILANEZ, 1995; TRUFEM, 1998b).

Mais recentemente, a biomassa residual de Mucorales utilizados industrialmente tem sido estudada quanto à remoção (biossorção) de íons metálicos presentes em soluções aquosas, tanto em efluentes sintéticos como em efluentes industriais e águas residuais. A utilização da biomassa residual de *Rhizopus arrhizus* Fischer da indústria de fermentação para remoção de U, Ra e Th de efluentes, por exemplo, pode superar em duas vezes a capacidade das resinas de troca iônica; em outro exemplo, foi patenteado um processo de utilização da biomassa de *Rhizomucor miehei* (Cooney & Emerson) Schipper e *Mucor mucedo* L. ex Fr. imobilizadas em colunas Perspex para tratamento de efluentes contendo metais (WAINWRIGHT, 1992).

Outros estudos mostram o emprego da biomassa de *R. arrhizus* para biossorção de Cr, La, Mn, Cu, Ni, Zn, Cd, Ba, Hg, Pb, U, Na, K, Rb, Ag e Cs (TOBIN *et al.*, 1984; HOLAN & VOLESKY, 1995; SAĞ & KUTSAL, 1995); de *Absidia orchidis* (Vuill.) Hagem e *Rhizopus nigricans* Ehrenb. para Cd, Pb, Ni (HOLAN & VOLESKY, 1995); de *R. oryzae* Went & Prins. Geerl. para Cu (HUANG & HUANG, 1996); de *Mucor rouxii* (Calmette) Wehmer para Cu, Pb, Cd, Ni e Zn (GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 1996; YAN & VIRARAGHAVAN, 2001); de *M. miehei* Cooney & Emerson para Cr (TOBIN & ROUX, 1998); e de *M. hiemalis* Wehmer para Cd e Cu (SILVA, 2002).

A biossorção é considerada uma das alternativas mais promissoras para a remoção e/ou recuperação de íons de elementos químicos tóxicos, radionuclídeos e metais preciosos diluídos em grandes volumes de soluções efluentes, pois através desta técnica pode-se concentrá-los na biomassa, que geralmente é de fácil produção e/ou aquisição. Esta técnica vem sendo amplamente pesquisada em todo o mundo como etapa final ou de polimento (acabamento) no tratamento de efluentes ou águas residuais contendo metais pesados, antes que estes sejam descarregados no meio ambiente, ou de modo mais estratégico, visando o reaproveitamento de recursos hídricos e também dos próprios metais adsorvidos à biomassa (ZOUBOULIS *et al.*, 1997; VEGLIO & BEOLCHINI, 1997).

## 2. OBJETIVOS

- ⊕ Efetuar o isolamento e a descrição taxonômica de linhagens de Mucorales (*Zygomycetes*, *Zygomycota*) de solo contaminado e não contaminado da região, tendo em vista o conhecimento de sua ocorrência em solos impactados.
- ⊕ Depositar as linhagens obtidas à Coleção de Culturas de Fungos do Instituto de Botânica, visando contribuir para o enriquecimento do acervo de germoplasma fúngico.
- ⊕ Selecionar linhagens de Mucorales e efetuar a produção de biomassa para a realização de ensaios de biossorção de Pb e Zn em solução aquosa.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Papel dos Fungos no Solo

Papéis fundamentais nos ciclos biogeoquímicos do C, do N, do P e de outros elementos químicos são desempenhados pelos fungos, que constituem significativa proporção da comunidade microbiana do solo agindo como decompositores, fitopatógenos e simbiontes (micorrizas) (GADD *et al.*, 2001), mas também atuando como produtores secundários nas cadeias alimentares por servirem de alimento para organismos considerados fungívoros tais como os insetos, crustáceos, ácaros, nematóides, protozoários, outros fungos, actinomicetos e bactérias (DIX & WEBSTER, 1995).

CHRISTENSEN (1989) enumerou algumas das funções e interações conhecidas, as quais os fungos desenvolvem nos diversos habitats e nichos ecológicos, podendo-se citar: decomposição da matéria orgânica envolvendo a volatilização de C, H, O e a mineralização de N, P, K, S e outros íons; imobilização de nutrientes, que reduz a lixiviação e pode levar a um estado de deficiência de determinados elementos na solução do solo; acúmulo de materiais tóxicos; transporte de elementos essenciais e água do solo às raízes de plantas, de nutrientes entre plantas diferentes e alteração no movimento de água e íons rumo às partes aéreas das plantas, executados por fungos micorrízicos; modificação da permeabilidade, agregação, capacidade de carga de água e de troca iônica do solo; desintoxicação do solo; síntese de substâncias húmicas, antibióticos, imunossuppressores e enzimas; promoção de simbioses parasíticas e mutualísticas; predação de rotíferos e nematóides; aumento da germinação de sementes por intermédio da erosão de suas cascas; alteração de desenvolvimento de nichos por meio da patogenicidade a outros seres;



assimilação por outros microrganismos e por consumidores de detritos; desgaste de minerais e rochas.

Os fungos talvez sejam os organismos que exibem a maior plasticidade fenotípica e genotípica, pois muitas espécies podem alternar entre as formas filamentosas ou leveduriformes, podem apresentar variados estados nucleares entre haploidia, heterocariose e diploidia e crescer sob a forma de colônias, em posições relativamente fixas no ambiente, de maneira que quando os recursos escasseiam eles podem mudar para um estado inativo e conservar energia até que as condições voltem a ser favoráveis, podem continuar crescendo para adquirir novos recursos ou podem formar propágulos de dispersão (ANDREWS & HARRIS, 1997). De acordo com LEMKE (2001), pelo fato dos fungos serem organismos predominantemente haplóides e exibirem elevada capacidade de reprodução assexuada, suas populações estão mais sujeitas à especiação através de mutações e de seleção. Além disso, os fungos sofrem pressão seletiva em favor da reprodução assexuada e apresentam a tendência à não-recombinação, de maneira que em muitas espécies houve a abolição da reprodução sexuada.

No ambiente natural os fungos raramente dispõem de condições que permitam o seu crescimento ótimo, encontrando-se geralmente privados de nutrientes e submetidos a limitações abióticas e bióticas impostas pelo ambiente (DIX & WEBSTER, 1995; GADD *et al.*, 2001). Há evidências de que a maioria dos fungos de solo existam em ambientes relativamente oligotróficos, com fontes escassas de carbono disponível para suportar o crescimento (GADD *et al.*, 2001). Porém, algumas características dos fungos lhes conferem certas vantagens ecológicas e permitem o máximo aproveitamento dos poucos recursos disponíveis no solo. Dentre elas pode-se citar a elevada superfície de contato das hifas, a presença de hifas com sítios de elevada afinidade para absorção de nutrientes, o crescimento crítico às custas do próprio micélio em busca de novas fontes de alimento e a provável utilização de gases e substâncias voláteis como CO<sub>2</sub>, metano, etileno, benzeno, aldeídos, cetonas e fenóis (GADD *et al.*, 2001).

Para a realização de estudos sobre os representantes da comunidade fúngica de solo, necessita-se associar procedimentos de isolamento com a escolha de meios de cultivo definidos conforme os grupos taxonômicos de interesse. Para estudos sobre espécies sapróbias usam-se, geralmente, meios de cultivo como o extrato de malte, batata dextrose agar (BDA), meio de farinha de milho (CMA, “cornmeal” agar), dentre outros, que são geralmente acrescentados de antibióticos ou bactericidas. Todavia, muitos táxons não

aparecem ou não são isolados com facilidade nestes meios de cultivo gerais, havendo a necessidade do emprego de meios seletivos (ZAK & RABATIN, 1997).

### **3.2. Fungos da Ordem Mucorales (Zygomycetes, Zygomycota)**

Conforme os conceitos taxonômicos vigentes, baseados principalmente em estudos morfológicos, a ordem Mucorales está inserida na classe Zygomycetes, do filo ou divisão Zygomycota e do reino Fungi (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996). ALEXOPOULOS *et al.* (1996) apresentaram 14 famílias para esta ordem, sendo elas: Mucoraceae, Absidiaceae, Gilbertellaceae, Dicranophoraceae, Saksenaeeae, Phycomycetaceae, Mortierellaceae, Pilobolaceae, Choanephoraceae, Thamniaceae, Cunninghamellaceae, Mycotyphaceae, Syncephalastraceae e Sigmoidomycetaceae, porém podem ser incluídas ainda as famílias Chaetocladiaceae e Radiomycetaceae (TRUFEM, 1998a).

A classificação taxonômica de Mucorales, de Zygomycetes e de fungos no geral está longe de ser totalmente resolvida. Com o advento da biologia molecular, toda a classificação biológica está passando por processo de revisão. KIRK *et al.* (2001) desconsideraram as famílias Absidiaceae, Mortierellaceae, Dicranophoraceae e Sigmoidomycetaceae para a ordem Mucorales e afirmaram que há evidências moleculares de que a classificação tradicional seja altamente artificial e mantida apenas por razões práticas. A família Mortierellaceae, por exemplo, foi enquadrada dentro de Mortierellales, uma nova ordem de zigomicetos criada em 1998 (KIRK *et al.*, 2001). Segundo HAWKSWORTH *et al.* (1995), na oitava edição do “Ainsworth & Bisby’s Dictionary of Fungi”, foram atribuídas à ordem Mucorales 13 famílias, 56 gêneros com 54 sinônimos e 299 espécies. Contudo, na nona edição foram consideradas apenas 12 famílias, 47 gêneros e 130 espécies (KIRK *et al.*, 2001), devido ao efeito de sinonimizações.

Mucorales é a maior ordem em número de espécies e em diversidade morfológica das ordens comumente reconhecidas para os Zygomycetes e, de maneira geral, os fungos pertencentes a esta ordem apresentam: micélio cenocítico, com ausência de poros nos septos, hialino, extensivo, multinucleado, rizóides e estolões em alguns casos, elevada taxa de crescimento vegetativo; reprodução assexuada pela liberação de esporangiósporos

(esporos) que são produzidos em esporângios ou em esporangiólos no ápice de esporangióforos, embora muitas espécies possam também reproduzir-se por artrósporos, clamidósporos e células leveduriformes; reprodução sexuada pela fusão de gametângios multinucleados que formam o zigosporângio que abriga o zigósporo, sendo que a maioria das espécies são heterotálicas, necessitando portanto de dois micélios geneticamente compatíveis (+ e -) para que haja a formação de zigósporos; há espécies homotálicas, cujo micélio é capaz de efetuar autofecundação. São sapróbios que ocorrem no solo, esterco, húmus, detritos vegetais e animais; alguns são patógenos de plantas; outros são parasitas de cogumelos e de outros Mucorales e mais raramente de insetos ou de vertebrados, incluindo o homem (HESSELTINE & ELLIS, 1973; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996).

Os fungos de maneira geral possuem papel importante no meio ambiente, por serem os principais agentes responsáveis pela decomposição da matéria orgânica de origem vegetal, pois devido a alguns aspectos de sua natureza, como a forma filamentosa, o modo de crescimento apical e a capacidade enzimática e metabólica, eles superam as bactérias quanto à degradação de compostos vegetais insolúveis tais como as paredes celulares e, desse modo, atuam decisivamente na ciclagem de nutrientes devolvendo C, N, P, K e outros elementos ao meio ambiente (CARLILE & WATKINSON, 1996). Sem essa atividade degradadora, acredita-se que toda a vida na biosfera estaria comprometida devido ao aprisionamento dos elementos nutrientes na matéria orgânica morta (CARLILE & WATKINSON, 1996; MOORE-LANDECKER, 1996). Os Mucorales estão inseridos nesse contexto ecológico participando principalmente da decomposição dos açúcares simples na fase inicial de degradação da matéria orgânica (HESSELTINE & ELLIS, 1973; TRUFEM, 1998a) e contribuindo para a manutenção da fertilidade do solo. Eles são considerados os únicos representantes de Zygomycetes verdadeiramente sapróbios, de maneira que a maioria pode degradar amido além de proteínas e lipídios, embora algumas espécies sejam celulolíticas ou quitinolíticas (CARLILE & WATKINSON, 1996). Dentre os gêneros *Mucor*, *Rhizopus* e *Mortierella*, a maioria das espécies avaliadas quanto à capacidade de hidrolisar celulose não apresentou êxito. Em relação às hemiceluloses (ex.: glicomanano, glicoronoxilano, dentre outras), que depois da celulose são os carboidratos mais abundantes nos tecidos vegetais, representando 25% do peso seco de plantas herbáceas e até 40% do peso seco das lenhosas, todas as espécies examinadas destes três gêneros

apresentaram capacidade de degradá-las, exibindo atividade de xilanase (DIX & WEBSTER, 1995).

A estratégia ecológica de sobrevivência dos Mucorales enquadra-se, principalmente, na categoria chamada de “seleção-R”, ou seja, são um dos primeiros fungos a colonizar os substratos e a capturar os carboidratos solúveis, sendo desse modo conhecidos como “fungos do açúcar”, pois não possuem aparato enzimático muito complexo e são considerados em sua maioria incapazes de degradar celulose ou lignina; apresentam micélio de crescimento rápido e reproduzem-se assexuadamente em abundância (ex.: *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp.) de modo que depois do consumo dos açúcares disponíveis, o micélio sofre lise ficando no ambiente apenas seus propágulos como os esporangiósporos, clamidósporos e, conforme a espécie, os zigospórângios ou azigospórângios; embora alguns representantes possam participar de etapas posteriores da sucessão fúngica, agindo como comensais mutualísticos (ex.: *Mucor oblongisporus* Naumov e *M. hiemalis*) associados aos fungos degradadores de celulose, sendo assim chamados de “fungos do açúcar secundários”, pelo fato de aproveitam-se da liberação de produtos da hidrólise de celulose (DIX & WEBSTER, 1995; TRUFEM, 1999).

Embora a reprodução sexuada em Mucorales tenha sido bem documentada para muitas das espécies conhecidas, através do cruzamento de linhagens geneticamente compatíveis (+ e -), culminando na produção de zigospórângios em ensaios laboratoriais (HESSELTINE & ELLIS, 1964; SCHIPPER, 1973; 1975; 1976; 1978; 1984; SCHIPPER & STALPERS, 1984; ZHENG & CHEN, 2001), a capacidade de reprodução sexuada destes fungos é considerada limitada por causa da baixa frequência de germinação dos zigósporos e da ocorrência comum de linhagens sexuadamente neutras (LEMKE, 2001). Apesar dos zigospórângios serem considerados estruturas de resistência capazes de permanecer no ambiente por longos períodos (DIX & WEBSTER, 1995; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996), é de certo modo surpreendente que através de técnicas de lavagens de solo como as exemplificadas por BARRON (1971), ou de peneiramento úmido para a obtenção de fungos micorrízicos arbusculares em que podem ser utilizadas peneiras com abertura de malha de 53  $\mu\text{m}$  (TRUFEM & MALATINSZKY, 1995) ou inferiores, não hajam relatos de isolamentos de zigospórângios diretamente do solo ou tentativas de desenvolvimento de metodologias com este objetivo, uma vez que grande parte dos zigospórângios de Mucorales ultrapassam 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Este fato pode reforçar

ainda mais a idéia de que a reprodução sexuada de Mucorales no ambiente natural seja evento de frequência relativamente baixa.

Segundo TRUFEM (1978), dentre as primeiras citações de Mucorales para o Brasil estão representados o trabalho de A. Möller em 1901, um dos estudos pioneiros de caráter sistemático para a ordem e a coletânea de estudos com enfoque fitopatológico apresentada por H.V.S. Grillo em 1936, reunindo os trabalhos de A. Puttemans em 1901 e 1906, A. Maublanc em 1913, J. Stevenson em 1926, A.A. Bitancourt e A.S. Muller em 1934. Dando seqüência aos estudos, foram realizados levantamentos taxonômicos com material procedente das regiões nordeste e norte do país, mais especificamente dos Estados de Pernambuco (BATISTA, 1948; BATISTA & VITAL, 1955; UPADHYAY, 1967; 1969; 1970; 1973) e Bahia (DANTAS, 1953a,b).

TRUFEM (1978) realizou extenso levantamento taxonômico de Mucorales de amostras de solo, fezes de mamíferos herbívoros, serapilheira e frutos, coletadas em cerca de 65 municípios paulistas, cobrindo praticamente todas as regiões do Estado, no qual foram identificados e descritos 29 táxons em nível específico e dois em nível genérico, sendo eles pertencentes às famílias Mucoraceae, Cunninghamellaceae, Pilobolaceae, Piptocephalidaceae e Kickxellaceae, embora as duas últimas famílias pertençam hoje às ordens Zoopagales e Kickxellales, respectivamente (TRUFEM, 1998a). A partir desse inventário micológico, foi publicada uma série de artigos derivados e complementares que se concentraram no isolamento de Mucorales a partir de solo (TRUFEM, 1981a,b,c) e de fezes de mamíferos herbívoros (TRUFEM, 1984; TRUFEM & VIRIATO, 1985; VIRIATO & TRUFEM, 1985a,b). Em adição a estes estudos, foi realizado estudo taxonômico de Mucorales isolados de solo e de fezes de mamíferos herbívoros (VIRIATO, 2003); e de fezes de mamíferos herbívoros, contemplando além do aspecto taxonômico o aspecto biotecnológico da produção de enzimas por linhagens de *Mucor* spp. (ALVES, 2002).

A pesquisa relativa aos Mucorales e outros Zygomycetes no Brasil tem sido conduzida de modo a contemplar os mais variados aspectos de sua natureza, como a diversidade quanto: à sucessão fúngica em folheto e distribuição na água e no solo de florestas tropicais úmidas como a Mata de Dois Irmãos em Recife, PE (MAIA, 1983; CAVALCANTI, 2000) e a Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP (SCHOENLEIN-CRUSIUS 1993; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ, 1997); aos efeitos de uma queimada sobre a micota de solo desta mesma reserva paulista

(ANTUNES *et al.*, 1993); ao solo de cerrado tratado com vinhaça em Corumbataí, SP (SCHOENLEIN-CRUSIUS & TAUKE, 1991); ao solo do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, afetado por excrementos de aves aquáticas (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 1996); aos ambientes terrestres e aquáticos da Ilha dos Eucaliptos e o terrestre das margens da altamente eutrofizada Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP (DOMINQUES, 1998; SANTOS *et al.*, 1998; WELLBAUM *et al.*, 1999); quanto à diversidade em areias de diversas praias do litoral paulista e seu possível efeito em relação à saúde pública (MAGALHÃES, 1998); e quanto à diversidade em amostras de solo e de folheto coletadas em regiões submetidas à poluição aérea em Cubatão, SP (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006).

Além destes estudos de base, focados na diversidade e ecologia de Mucorales, tem sido realizados estudos de caráter biotecnológico que poderão trazer novidades quanto ao emprego destes fungos em variados setores produtivos tais como a indústria e a agricultura. Dentre esses estudos pode-se citar alguns exemplos interessantes:

Há a possibilidade destes fungos estimularem os mecanismos de defesa das plantas, pois extratos de suspensão de esporangiósporos de *Mucor ramosissimus* Samuts. têm sido testados com sucesso quanto à indução da produção de fitoalexinas em cotilédones de soja e em folhas de *Palicourea marcgravii* A. St.-Hil., sugerindo que além de atuarem como decompositores da matéria orgânica no ambiente, eles também teriam papel importante na indução de mecanismos de defesa inespecíficos nos vegetais, tornando-os capazes de resistir a muitos fitopatógenos (CORDEIRO NETO, 1992; MARQUES, 1998).

Tem sido estudada a capacidade produtiva de ácido  $\gamma$ -linolênico, fármaco utilizado no tratamento de enfermidades como eczema atópico, doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome pré-menstrual e câncer, por Mucorales dos gêneros *Mucor*, *Absidia* e *Circinella*, isolados de solo da Estação Ecológica Juréia-Itatins, litoral sul do Estado de São Paulo (RUEGGER *et al.*, 2002).

ALVES *et al.* (2002a) estudaram a capacidade da produção de amilases, lipases, poligalacturonases e proteases por linhagens de *Mucor* spp. e observaram que as linhagens apresentaram especial potencial para a produção de lipases em relação às demais enzimas.

Foi descoberto que *Zygorrhynchus moelleri* Vuill., um representante de Mucorales que coloniza a rizosfera de diversas plantas cultivadas, é capaz de exercer micoparasitismo

e inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Pythium intermedium* de Bary e *P. paroecandrum* Drechsler, protegendo as raízes de plantas de interesse econômico como a linhaça (linho), o rabanete, a zínia (flor ornamental) e a salsa (BLAKEMAN, 1992).

### 3.3. Metais Pesados e a Micota Terrestre

No solo ocorrem os processos biogeoquímicos nos quais os elementos químicos, os microrganismos como as bactérias e os fungos, as plantas, os invertebrados e os vertebrados interagem entre si promovendo intenso fluxo de nutrientes. Sendo assim, o solo pode ser considerado um grande manancial de macro e micronutrientes, que nele se dispõem de acordo com as mais variadas características ambientais (MARKERT, 1992). Os seres vivos requerem muitos desses nutrientes que participam de processos vitais agindo como constituintes de biomoléculas estruturais e/ou funcionais tais como os carboidratos, os lipídios, as proteínas, as enzimas e os ácidos nucleicos, ou na manutenção dos mecanismos de obtenção de energia sob a forma de ATP como a fermentação, a fotossíntese e a fosforilação oxidativa (PELCZAR Jr. *et al.*, 1996).

Há diversas categorias de organismos e em cada uma delas a necessidade de micronutrientes varia conforme a constituição física, o modo de obtenção de energia e as características reprodutivas, que são aspectos determinados geneticamente. Muitos dos metais existentes são essenciais em pequenas quantidades ou concentrações traço, agindo como coadjuvantes ou cofatores nas reações biológicas (KUSHNER, 1993; GADD, 1993). Porém, alguns metais como o Pb, o Cd e o Hg não são considerados essenciais ou não tiveram esse aspecto evidenciado em relação à grande maioria dos organismos conhecidos, ou ainda podem ser tóxicos em pequeníssimas concentrações (MARKERT, 1992).

Os metais estão dispersos por toda a crosta terrestre fazendo parte de minerais e rochas, sendo liberados naturalmente por reações intempéricas causadas pelos fatores abióticos do meio ambiente ou pela ação biológica lenta e gradual de microrganismos como as bactérias, os fungos e os líquens (MARKERT, 1992; GADD, 1993; BURFORD *et al.*, 2003). Diversos substratos rochosos, por exemplo, podem abrigar fungos Mucorales, dentre os quais foram encontrados representantes dos gêneros *Absidia* em gnaiss e

quartzo, *Cunninghamella* em andesita, *Mucor* em mármore, gnaisse e quartzo e *Rhizopus* em mármore, arenito, andesita e quartzo (BURFORD *et al.*, 2003).

Ações antrópicas têm afetado de maneira radical a distribuição natural de metais pesados nos diversos compartimentos ambientais como a água e o solo, de modo que em curto ou em longo prazo ocorreu o aumento da concentração de muitos elementos nocivos nos diversos compartimentos do ambiente (TRAINA & LAPERCHE, 1999). São produzidas diariamente milhões de toneladas de lixo, seja doméstico ou industrial, em algumas das maiores cidades do mundo, sendo que a maior parte é depositada em aterros sanitários (SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, 1997) ou é incinerada. O setor agrícola contribui com os fertilizantes e agrotóxicos que são aplicados às lavouras, muitos dos quais contém elementos tóxicos em suas fórmulas que podem ser lixiviados pelas águas e concentrar-se no solo (ARMAS *et al.*, 2005). Os diversos setores industriais podem ser considerados responsáveis pela maior parcela da poluição do solo por metais pesados e, conseqüentemente, das águas e do ar, pois os contaminantes transitam por estes componentes dos ecossistemas podendo atingir vasta dispersão.

Os efeitos da poluição percebidos agora em muitos casos de contaminação por elementos químicos tóxicos carecem de medidas mitigadoras que visem o aperfeiçoamento e o desenvolvimento de tecnologias para a recuperação de áreas contaminadas e, simultaneamente, a avaliação dos impactos em relação à biota. Por deter o maior número de indústrias do país, o Estado de São Paulo representa uma das principais regiões com problemas dessa natureza em seus solos. O complexo de indústrias cerâmicas instaladas em Santa Gertrudes, SP e municípios adjacentes, constitui-se em exemplo atual de degradação do solo por metais pesados tais como o Pb, o Zn, o Co, o Zr, dentre outros elementos químicos (BONACIN SILVA, 2001).

As mudanças causadas na composição da comunidade fúngica do solo devido à presença de elevadas concentrações de metais pesados podem ser indicativas do grau de impacto ambiental e do perigo de transmissão dos metais a outros organismos. Em condições de concentrações sub-letais, um elemento químico tóxico quando localizado no interior de células fúngicas pode sofrer alterações químicas e físicas e tornar-se mais ou menos tóxico, pode ser imobilizado na biomassa, translocado ou liberado em outras regiões, ser transferido à cadeia trófica por ingestão ou ser liberado por vazamento ou por morte do micélio (DIGHTON, 2003).



Elevadas concentrações de metais pesados podem afetar a composição de populações fúngicas qualitativa e quantitativamente, diminuindo a diversidade de espécies. Porém, tanto os fungos presentes em locais poluídos quanto aqueles de locais não poluídos podem apresentar tolerância e/ou resistência aos metais, tornando difícil determinar se a ocorrência de espécies observadas foi em função da presença de metais ou de outros poluentes (WAINWRIGHT & GADD, 1997).

A presença de metais pesados no solo em concentrações elevadas pode reduzir de 10 a 50 vezes a atividade de enzimas, tais como as de N-acetilglicosaminases,  $\beta$ -glicosaminases, endocelulases e fosfatases ácidas e alcalinas (DIGHTON, 2003). Como a concentração e a composição de poluentes sofrem variações de acordo com o ambiente, as populações fúngicas sofrem alterações contínuas em resposta a estas mudanças (WAINWRIGHT & GADD, 1997).

A frequência de isolamento de microrganismos tolerantes a metais pesados no solo pode aumentar acompanhando o aumento dos níveis de metais, acarretando em diminuição da diversidade de espécies e mudança na composição da micota, que por conseguinte, pode resultar em redução na atividade funcional do solo (FOMINA *et al.*, 2005). *Zygorrhynchus moelleri* Vuill. foi um dos fungos isolados com maior frequência em um campo de golfe tratado com fungicida à base de mercúrio, em comparação ao local não tratado (WAINWRIGHT & GADD, 1997). Representantes dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* estiveram dentre os mais frequentes gêneros de fungos isolados de solos altamente poluídos com metais pesados na Argentina, República Tcheca e Ucrânia (FOMINA *et al.*, 2005).

Apesar de muitos esforços, as técnicas disponíveis para o estudo de fungos em relação ao solo ainda não são suficientemente apropriadas para a determinação ampla das mudanças em suas populações, comunidades e em suas atividades ambientais, limitando a capacidade de demonstração e de quantificação dos efeitos dos poluentes sobre estes microrganismos (WAINWRIGHT & GADD, 1997). Em diversos estudos, houve diminuição da produção de biomassa de fungos em relação ao aumento de concentrações de metais no solo, quando estimada através da taxa de respiração e de técnicas de coloração vital. Todavia, não ocorreram mudanças detectáveis em relação ao número de colônias isoladas do solo (WAINWRIGHT & GADD, 1997), existindo resultados controversos em relação às diferentes técnicas utilizadas.

Em termos teóricos e visto no aspecto amplo e mais geral, um distúrbio ecológico pode ser definido como “qualquer evento relativamente discreto no tempo, que cause rompimento na estrutura do ecossistema, da comunidade, ou da população e altere os recursos, a disponibilidade de substratos, ou o ambiente físico”. Porém, respeitando-se os níveis hierárquicos nos quais os ecossistemas são organizados (ex.: ecossistemas, comunidades, populações), um distúrbio ecológico pode ser definido como “uma mudança na estrutura mínima causada por um fator externo em relação ao nível ecológico de interesse” (ZAK, 1992). No caso de contaminação do solo por Pb, podem ser citados: os efeitos adversos sobre os organismos mais sensíveis do solo, redução nos processos do solo como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de N, P e S, além do risco de acúmulo do metal na cadeia alimentar, com a conseqüente dispersão ambiental dos efeitos tóxicos (COOK & HENDERSHOT, 1996).

Os distúrbios ecológicos causam efeitos que se diferenciam substancialmente no que diz respeito às proporções de espaço e tempo. Distúrbios de pequenas proporções ou pequenas escalas criam novos nichos colonizáveis, aumentam a heterogeneidade do sistema, permitem coexistência não competitiva entre algumas espécies e, conseqüentemente, elevam a diversidade e a riqueza de espécies, favorecendo principalmente os bons competidores (seleção-C). Ao contrário, distúrbios de grandes extensões impõem homogeneidade funcional ao sistema, resultando em baixa diversidade e riqueza de espécies, premiando principalmente os bons colonizadores (seleção-R). Hipoteticamente, foi sugerido ainda que a diversidade de espécies seria maior se o distúrbio fosse de proporções intermediárias (ZAK, 1992).

A concentração total de determinado contaminante em solos, sedimentos ou ambientes aquáticos não corresponde diretamente à sua biodisponibilidade e mobilidade química, de modo que a toxidez de uma substância, seja um elemento, um íon ou uma molécula, dependerá de seu estado químico e físico, ou especiação (TRAINA & LAPERCHE, 1999; COOK & HENDERSHOT, 1996). Por definição: “a biodisponibilidade de um metal pode ser definida como a forma do metal que pode ser absorvida pela biota”, ou seja, a forma ou espécie química do metal que é adicionada ao solo influenciará sua solubilidade e mobilidade (COOK & HENDERSHOT, 1996). Por outro lado, a especiação pode ser definida do seguinte modo: “especiação é a ocorrência de um elemento em formas identificáveis separadas (ex.: estado químico, físico ou morfológico)” (NIEBOER & FLETCHER, 1996). Nestes termos, entende-se que a

biodisponibilidade é muito mais relacionada à solubilidade do que à concentração total de um contaminante no meio ambiente (COOK & HENDERSHOT, 1996; TRAINA & LAPERCHE, 1999).

Embora haja considerável heterogeneidade em relação à biodisponibilidade e distribuição de nutrientes, os fungos naturalmente vivem sob condições oligotróficas ou de estresse nutricional devido aos baixos níveis de carbono disponíveis na maioria dos solos e demais ambientes, sendo que nestas condições são mais sensíveis aos poluentes do que quando crescem em meios ricos em nutrientes (WAINWRIGHT & GADD, 1997; GADD *et al.*, 2001). O efeito tóxico de metais no crescimento fúngico varia entre as diferentes espécies, entre diferentes linhagens da mesma espécie e depende da forma química em que o metal está presente, de maneira que a diminuição dos efeitos tóxicos pode estar correlacionada com o aumento da concentração de carbono disponível (FOMINA *et al.*, 2005). FOMINA *et al.* (2000) observaram que *Trichoderma viride* Pers., *Gliocladium roseum* Bainier, *Geotrichum candidum* Link e *Humicola grisea* Traaen, crescendo sobre blocos de 1 cm<sup>2</sup> de Czapek-Dox agar suplementado com diferentes teores de sacarose (1-30 g L<sup>-1</sup>) e adicionado de Cd ou Cu (0,25-5 mM), apresentaram quimiotropismo negativo em direção aos blocos de meio de cultivo contendo metais, constatando que o tropismo negativo foi menor quando houve maior concentração de sacarose.

Em ambientes poluídos com metais pesados, muitos fungos apresentam alterações de crescimento de micélio ou variações morfológicas tais como: tropismos negativos, cessação de crescimento e, em condições nutricionais pobres, a alternância estratégica entre duas formas de crescimento conhecidas como (i) falange, agregação e elevada ramificação de hifas que podem transitar entre os estados assimilativos e não assimilativos e produzir grande quantidade de substâncias quelantes ou seqüestrantes de metais, ou (ii) guerrilha, produção de hifas não assimilativas e não ramificadas que crescem linearmente e podem transpor regiões contaminadas (FOMINA *et al.*, 2005). De acordo com GADD *et al.* (2001) o Cu atua especificamente nos ápices das hifas, produzindo padrões de ramificação aberrantes, enquanto que o Cd impede a translocação de nutrientes pelas hifas, bloqueando o padrão de crescimento normal.

Dentre os fatores ambientais que influenciam a esporulação fúngica estão a nutrição, a luz, o pH, a aeração, a umidade e as injúrias sofridas (ANDREWS & HARRIS, 1997). É provável que níveis tóxicos de metais afetem a produção de biomassa fúngica e simultaneamente estimulem a esporulação em resposta aos efeitos da toxidez,

representando assim uma estratégia ecológica de escape, capaz de conduzir os esporos a locais menos nocivos.

Os fungos são muitas vezes dominantes em solos ácidos, onde os metais pesados podem estar sob a forma de espécies móveis (GADD *et al.*, 2001). Por causa da presença permanente e às vezes dominante de fungos em habitats poluídos com metais, da habilidade de bioacumulação de metais pesados e radionuclídeos por cogumelos comestíveis e do importante papel de fungos micorrízicos em ambientes poluídos, tem aumentado o interesse no estudo da interação entre fungos e metais pesados, metalóides, organometalóides e radionuclídeos (WAINWRIGHT & GADD, 1997). Em ambientes poluídos com metais pesados foi observada a proteção de fungos micorrízicos arbusculares aos seus hospedeiros vegetais, de modo que o papel das micorrizas na resistência aos metais pesados tem despertado interesse por causa do potencial de aplicação na recuperação de áreas contaminadas (DIGHTON, 2003). Porém, o efeito pode ser variável conforme as plantas hospedeiras e as espécies fúngicas relacionadas, de modo que em alguns casos pode haver o aumento na captação de metais e a conseqüente diminuição de crescimento do vegetal (GADD, 1993; WAINWRIGHT & GADD, 1997).

Os mecanismos de interação entre os microrganismos e os elementos químicos do solo como a volatilização, a biolixiviação, a bioacumulação e a biossorção têm sido pesquisados e utilizados em processos de recuperação industrial de metais, tendo em vista o tratamento de resíduos e efluentes líquidos contendo metais pesados (GADD, 1993; WHITE, *et al.*, 1997). Os fungos filamentosos do solo têm revelado elevado potencial nesses sistemas, devido à sua grande habilidade de alterar a especiação e a mobilidade de diversos metais, através da produção de oxalatos e óxidos, que os imobilizam e diminuem sua biodisponibilidade (FOMINA *et al.*, 2005). A disponibilidade de um poluente no solo depende de fatores como a adsorção à matéria orgânica e inorgânica, a forma em que o poluente ocorre (se solúvel ou insolúvel), assim como a capacidade de interação e de lixiviação exercida pela ação de microrganismos (WAINWRIGHT & GADD, 1997).

Metais e radionuclídeos têm sido descarregados no meio ambiente como conseqüência da rápida industrialização (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995), de modo que muitas atividades industriais conduziram a uma condição de distribuição artificial dos metais no ambiente terrestre (MORLEY & GADD, 1995), ocasionada por operações de disposição inadequadas que foram tornando o meio ambiente cada vez mais contaminado (KUREK *et al.*, 1982). Os setores industriais de mineração, refinamento de

petróleo, automobilístico, galvanização, curtume e produção de tintas estão dentre os principais responsáveis pela poluição das águas com o despejo de efluentes líquidos contendo excessivas quantidades de metais como Cd, Cr, Ni, Pb, Co e Cu (DEY *et al.*, 1995; WILHELMI & DUNCAN, 1995). Em ecossistemas de mangue, por exemplo, os efluentes industriais são a principal fonte de contaminação por metais pesados, que acumulam na lama e são absorvidos pelas plantas (TSUI *et al.*, 1998), havendo o risco de serem transferidos aos demais membros da biota.

No solo, os metais podem ser constituídos de partículas separadas, estar adsorvidos às partículas de solo formando um filme líquido ou sólido em torno delas, associar-se à fase orgânica, ou ocorrer como fases líquidas ou sólidas nos poros das partículas de solo (RULKENS *et al.*, 1998). De maneira geral, a remediação não depende apenas da natureza constituinte do solo como o conteúdo de areia e argila, o tamanho das partículas e o percentual de matéria orgânica, mas também das propriedades dos poluentes envolvidos como a volatilidade, solubilidade em água ou em solventes orgânicos, instabilidade química e térmica, biodegradabilidade, comportamento de adsorção e absorção, características magnéticas ou elétricas, de superfície, tamanho, forma e de densidade das partículas (RULKENS *et al.*, 1998).

Nos países das regiões oeste, central e leste da Europa, por exemplo, a poluição do solo constitui grave problema ambiental, mas, de maneira mais recente, os sedimentos poluídos também são motivo de grande preocupação para a sociedade (RULKENS *et al.*, 1998). Contudo, são escassas as opções de tratamento de sedimentos dragados em relação a outros resíduos (FÖRSTNER & CALMANO, 1998). Na Inglaterra, diversos casos de envenenamento de crianças por Pb foram atribuídos ao contato freqüente delas com solo altamente contaminado, devido ao hábito de brincarem e levarem as mãos à boca (BLOEMEN *et al.*, 1995). O continente sul-americano, por sua vez, também enfrenta a grande ameaça da poluição do solo, sendo que no Brasil a contaminação do solo por poluentes industriais como os organoclorados (MATHEUS *et al.*, 2000) e os metais pesados (CORUMBATAÍ NEWS, 1999a; JORDÃO *et al.* 1999; BONACIN SILVA, 2001) geralmente ocorreu devido à disposição inadequada de resíduos ou a ausência de controle na emissão de poluentes, como em muitos outros países do mundo.

### 3.4. Chumbo

O Pb está classificado na tabela periódica como o 82º dos elementos, possui massa atômica 207,2, densidade de  $11,35 \text{ g mL}^{-1}$  e ocorre nos estados de oxidação 2 e 4. Embora ocorram variações, o  $\text{Pb}^{2+}$  apresenta 119 pm (picômetros,  $10^{-12} \text{ m}$ ) de tamanho de raio iônico e o  $\text{Pb}^{4+}$  78 pm (NIEBOER & FLETCHER, 1996). A concentração média de Pb no solo varia de  $0,1\text{-}200 \text{ mg kg}^{-1}$  e nas plantas de  $0,1\text{-}5 \text{ mg kg}^{-1}$ ; a concentração inicial média de  $3\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$  é tóxica às plantas e em média  $1 \text{ mg dia}^{-1}$  é tóxico ao ser humano; é captado na forma de  $\text{PbCO}_3$ ; as plantas *Amorpha canescens* Nutt., *Minuartia verna* (L.) Hiern e o líquen *Stereocaulon pileatum* Ach. são organismos acumuladores; não é considerado essencial para bactérias, algas, fungos e plantas superiores, mas está sob discussão sua função biológica a alguns vertebrados; a produção estimada para o ano 2000 foi de 5.000 t; é usado na indústria de baterias, na cobertura de fios elétricos, dentre outras aplicações, sendo que o Pb entra no ambiente principalmente através do uso de chumbotetraetila pela indústria petrolífera (MARKERT, 1992).

No ambiente natural, o Pb normalmente ocorre na forma  $\text{Pb}^{2+}$ , complexado aos óxidos de Al, Fe e Mn, aos ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e a compostos orgânicos solúveis ou sólidos, estando disponível nas frações componentes do solo na seguinte ordem: cátions na fase líquida > cátions trocáveis > fixado a compostos orgânicos dissolvidos > compostos precipitados nas partículas de solo > fixado em substâncias orgânicas > fixado no interior de partículas minerais (COOK & HENDERSHOT, 1996).

Em solos contaminados com Pb, é provável que a maior parte do metal esteja fixada aos fosfatos e carbonatos, de modo que em condições aeróbias ocorre a formação de compostos estáveis tais como  $\text{PbCO}_3$ ,  $\text{Pb(OH)}_2$  (cerussita),  $\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$  (hidrocerussita),  $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (hidroxipiromorfita) e  $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$  (cloropiromorfita), cuja solubilidade depende altamente do pH, enquanto que em condições anaeróbias a redução de  $\text{SO}_4^{2-}$  leva à formação de PbS (galena), um composto altamente insolúvel e não-reativo (COOK & HENDERSHOT, 1996). Segundo TRAINA & LAPERCHE (1999), uma das maneiras mais eficazes de se reduzir a biodisponibilidade de Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Ni e outros elementos tóxicos em solos contaminados, seria através da aplicação de apatitas tais como  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  ou  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ , hidroxilapatita, fluorapatita e clorapatita, respectivamente, as quais exibem expressiva reação em que o Ca

é liberado e os metais pesados são incorporados no composto. No caso de reação com o Pb com estas apatitas, ocorre a formação de  $Pb_5(PO_4)_3OH$ ,  $Pb_5(PO_4)_3F$  e  $Pb_5(PO_4)_3Cl$ , respectivamente.

De acordo com LAVADO *et al.* (2001), os sistemas de lavragem de solo para o plantio modificam o padrão de distribuição de macro, micronutrientes e metais pesados no solo. Os autores observaram que em solos dos Pampas argentinos não afetados por contaminação e utilizados para o plantio experimental de soja (*Glycine max* Merr.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.), o tratamento de lavragem favoreceu em maior intensidade o acúmulo de metais pesados nas partes aéreas das plantas do que o acúmulo de macronutrientes, em comparação ao solo não lavrado (controle). Houve maior acúmulo de Pb nos grãos, folhas e talos de milho e nas folhas e talos de trigo que cresceram no solo lavrado, enquanto que nos três vegetais crescidos no solo controle o acúmulo de Pb foi maior nas raízes.

### 3.5. Zinco

O Zn é o 30º dos elementos da tabela periódica, possui massa atômica 65,39, densidade de  $7,14 \text{ g mL}^{-1}$  e ocorre no estado de oxidação 2. O raio iônico do  $Zn^{2+}$  é de 74 pm, salvo variações (NIEBOER & FLETCHER, 1996). A concentração média de Zn no solo é de 3-300  $\text{mg kg}^{-1}$  e nas plantas de 15-150  $\text{mg kg}^{-1}$ ; a concentração média inicial de 60-400  $\text{mg L}^{-1}$  é tóxica às plantas e em média 150-600  $\text{mg L}^{-1}$  é tóxico ao ser humano; é captado na forma de  $Zn^{2+}$ ,  $ZnOH^+$  e  $ZnCO_3$ ; é essencial às bactérias, algas, fungos, plantas superiores e animais, sendo que as plantas *Armeria maritima* Willd. subesp. *halleri*, *Minuartia verna* (L.) Hiern, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, *Thlaspi alpestre* C.C. Gmel. e *Viola tricolor* L. var. *calaminaria* são organismos acumuladores; o Zn atua na formação da clorofila, como ativador de enzimas, no metabolismo energético (desidrogenases), na degradação de proteínas, na formação de substâncias de crescimento e na transcrição; os sintomas de carência são inibição do crescimento, descoloração verde-clara de folhas maduras e distúrbios de frutificação; os sintomas tóxicos em humanos são a imaturidade sexual, lesões na pele e cabelos; a produção estimada para o ano 2000 foi de 11.000 t; a forma metálica é usada principalmente na galvanização de ferro e aço, o óxido de Zn é usado em catálises e em pigmentos, zinco bacitracina é usado como agente promotor de

crescimento na produção de suínos e aves; sais de Zn servem como inseticidas e fungicidas (MARKERT, 1992).

SAWAI & YOSHIKAWA (2004) expuseram que o pó de ZnO tem efeito bacteristático, atuando principalmente contra as bactérias gram-positivas pela formação de  $H_2O_2$  a partir de ZnO, ao passo que o  $Zn^{2+}$  liberado do composto foi inócuo às bactérias. O pó de ZnO foi ineficaz contra todos os fungos analisados, dentre eles *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., mas os pós de CaO e MgO apresentaram elevada eficiência como antifúngicos e, conseqüentemente, foram indicados para o combate de dermatomicoses, para prolongar a conservação de alimentos e para o controle de fitopatógenos na lavoura e pós-colheita.

A mineralização de N por fungos e bactérias pode ser reduzida devido à manutenção de elevados teores solúveis de Zn, Cd e Ni em solos ácidos, enquanto que o Pb mantém-se relativamente menos disponível neste tipo de ambiente devido ao fato de formar complexos com os compostos húmicos do solo (DIGHTON, 2003). Por outro lado, na região árida da Turquia, Anatólia Central, onde é cultivada metade da produção de trigo do país e há a soma de fatores ambientais adversos como os baixos índices de precipitação anual (280-400 mm), solos ricos em  $CaCO_3$ , com pH elevado (7,5-8,1) e baixo teor de matéria orgânica (<2%), ocorre acentuada imobilização de Zn no solo, tornando-o pobre no nutriente e causando baixa produção e qualidade na lavoura de trigo. O trigo produzido na região apresenta baixo teor de Zn, mas acaba constituindo a base da dieta da população de baixa renda através do consumo de pão. Devido à deficiência nutricional de Zn, num grupo de crianças avaliadas em 2000 escolas, 80% apresentaram estaturas corporais 25% inferiores àquelas adequadas para as respectivas faixas etárias (CAKMAK *et al.*, 1999).

### **3.6. Bioissorção de Metais Pesados**

De maneira geral, os metais pesados são retirados de efluentes por processos químicos e físicos de tratamento como precipitação química, cristalização, coagulação, floculação, redução, troca-iônica, ultrafiltração, eletrólise, eletrodialise, osmose reversa e adsorção. Porém, esses métodos apresentam desvantagens como remoção incompleta dos metais, elevada necessidade de reagentes e energia, geração de subprodutos ou resíduos tóxicos e custos elevados quando as concentrações estão entre os limites de 1 a 100 mg L<sup>-1</sup>



(AZAB *et al.*, 1990; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; SAĞ & KUTSAL, 1995; HUANG & HUANG, 1996; OSMAN & BANDYOPADHYAY, 1996).

Os metais são considerados contaminantes inorgânicos e seu tratamento biológico geralmente passa por processos de imobilização, mobilização e transformação, os quais compreendem mecanismos como bioacumulação, bioissorção, oxidação, redução, metilação, desmetilação, complexação orgânica, degradação de compostos de ligação e fitorremediação (BOLTON Jr. & GORBY, 1995). Dentre os diversos mecanismos citados, a bioissorção têm sido empregada com sucesso na captura de íons metálicos presentes em solução aquosa, com eficiência de até 100% de acordo com o metal e o tipo de biomassa (AZAB *et al.*, 1990; 1995; AZAB, 1994; MATIS *et al.*, 1994; SOLARI *et al.*, 1996; AMMAR *et al.*, 2000; LEDIN, 2000).

Há farta documentação na literatura mundial sobre o acúmulo, a captação ou a remoção de variadas espécies metálicas por biomassas microbianas (AZAB *et al.*, 1990; GADD, 1993; SKLADANY & METTING Jr., 1993; TOBIN *et al.*, 1994; AL-ASHEH & DUVNJAK, 1995; SAĞ & KUTSAL, 1995; GOMES & LINARDI, 1996; HUANG & HUANG, 1996; GARCIA Jr., 1997; SOUZA & LEITE, 1997; PALMIERI *et al.*, 2000; COSTLEY & WALLIS, 2001), incluindo os radionuclídeos (STRANDBERG *et al.*, 1981; TOBIN *et al.*, 1984; AVERY & TOBIN, 1992), corantes azóicos (CORSO *et al.*, 1987; MARCANTI, 1988; BARBOSA, 1995; BUSTARD *et al.*, 1998), moléculas (NING *et al.*, 1996) e material particulado (WAINWRIGHT, 1992).

A retenção por biomassas ocorre de duas formas: **bioacumulação** - processo ativo, lento e dependente de energia metabólica realizado pela biomassa viva; e **bioissorção** - processo passivo, rápido, reversível e independente de energia metabólica, realizado tanto por biomassa viva quanto por biomassa morta, no qual atuam forças físico-químicas que promovem a atração e a adsorção do íon metálico, molécula ou particulado à parede celular microbiana (GADD, 1993; TOBIN *et al.*, 1994; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; BLACKWELL *et al.*, 1995; PÜMPPEL *et al.*, 1995; SAĞ & KUTSAL, 1995; GARCIA Jr., 1997; GOMES *et al.*, 1998). No fenômeno da bioissorção não ocorre somente adsorção, pois de acordo com as características do bioissorvente e as condições experimentais, pode haver também o envolvimento de mecanismos de troca-iônica, precipitação ou condensação de hidróxidos metálicos na superfície do bioissorvente e quelação ou captura de íons nos poros da trama estrutural polissacarídica da biomassa (VOLESKY & HOLAN, 1995; DAVIS *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2001).

Os polissacarídeos quitina, quitosano e glucano são considerados biossorventes potencialmente eficazes na remoção de metais (WAINWRIGHT, 1992; GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 1996). A quitina e o glucano são os principais polissacarídeos estruturais da parede celular dos fungos e podem estar associados a captação de metais devido à sua natureza química e estrutural (VOLESKY & HOLAN, 1995). A biomassa fúngica tem recebido especial atenção devido à grande capacidade de fixação de metais, podendo ser usada em processos de tratamento de efluentes que superam em muitos casos os métodos físico-químicos em que são usadas, por exemplo, as resinas de troca-iônica (WAINWRIGHT, 1992). As biomassas de diversos gêneros de fungos superaram os produtos: Filtrasorb-400 (MURALEEDHARAN *et al.*, 1995), Amberlite (Ionex) IRA 400 (AZAB *et al.*, 1990) e o carvão ativado (AZAB, 1994) quanto à capacidade de adsorção de metais.

A biossorção tem sido testada e aplicada como alternativa eficiente e econômica em adição aos tratamentos convencionais de águas residuais e efluentes contendo metais e produtos químicos tóxicos gerados em diversos ramos industriais. AZAB *et al.* (1995) utilizaram a biomassa de diversas linhagens fúngicas (*Aspergillus terreus* Thom, *A. niger* Tiegh., *Penicillium capsulatum* Raper & Fennell, *Rhizopus sexualis* (G. Smith) Callen e *Mortierella ramanniana* (A. Møller) Linnem., isoladas ou colonizando bagaço de cana, para a biossorção de cianeto de uma solução preparada (KCN a 1%) e de um efluente contaminado com cianeto (10,4 mg L<sup>-1</sup>) da indústria química egípcia El-Nasr Company. As biomassas de *R. sexualis* e *M. ramanniana* removeram respectivamente 97,8 e 96,5% do teor de cianeto da solução preparada, sendo que do efluente *R. sexualis* removeu 98,3% do cianeto. Em outro estudo foram utilizados, em etapa posterior ao tratamento convencional de efluentes da refinaria Suez Oil Processing Company, três tipos de biossorventes: 1) bagaço de cana, 2) resíduos de café ou 3) cascas de arroz, todos colonizados pela linhagem S-48 de *Aspergillus niger*. Todos biossorventes foram capazes de retirar praticamente 100% do cádmio remanescente, sendo que os resíduos de café removeram até 94,12% do óleo (AMMAR *et al.*, 2000).

No que diz respeito às biomassas de origem fúngica, os estudos envolvendo biossorção no Brasil têm principalmente focado a retenção de corantes azóicos (OLIVEIRA, *et al.* 1983; CORSO *et al.*, 1987; TRINDADE, 1987; MARCANTI, 1988; BARBOSA, 1995; CAMARGO, 1996), metais pesados (GOMES & LINARDI, 1996; SOUZA & LEITE, 1997; MENEZES *et al.*, 1998; de SOUZA, 2001; SILVA, 2002) e

lantânídeos (PALMIERI *et al.*, 2000). Há também estudos em que foram utilizadas bactérias (MESQUITA *et al.*, 1998); microalgas de água doce (LEITE *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 1994); algas marinhas macroscópicas (*Sarghassum* spp.) do litoral nordestino (da COSTA *et al.*, 1996; DAVIS *et al.*, 2000) e de uma indústria de extração de polímeros (VALDMAN *et al.*, 2001); e estudos com macrófitas aquáticas (SCHNEIDER & RUBIO, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 1999; 2001) visando a remoção e recuperação de metais pesados de soluções aquosas contaminadas.

No atual estágio de conhecimento acerca da biossorção entende-se que sua utilização é alternativa promissora em relação aos métodos convencionais de remoção de metais de soluções aquosas (GADD, 1993; VOLESKY & HOLAN, 1995; GOMES *et al.*, 1998), que os biossorbentes poderão substituir materiais como as resinas de troca-iônica (ZOUBOULIS *et al.*, 1997), ou servir na fase final de tratamento de efluentes, sendo considerada técnica de polimento ou acabamento, como foi sugerido em relação às diversas biomassas de origem fúngica (GADD, 1993; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; TOBIN & ROUX, 1998) e para a biomassa da macrófita aquática *Potamogeton lucens* L. (SCHNEIDER & RUBIO, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 1999).

Revisões detalhadas sobre os mecanismos de captação de metais por microrganismos vivos e/ou biomassa microbiana morta são encontradas em diversos artigos (GADD, 1993; BLACKWELL *et al.*, 1995; KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1995; VOLESKY & HOLAN, 1995; VEGLIO & BEOLCHINI, 1997; ZOUBOULIS *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1998; LEDIN, 2000).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da Área de Estudo

A área de estudo localiza-se à margem esquerda do km 168 da Rodovia Washington Luis (SP-310), no sentido capital-interior, possui cerca de 1,5 km<sup>2</sup> e abriga algumas nascentes d'água e o córrego da Fazenda Itaqui, afluente do ribeirão Claro e subafluente do rio Corumbataí (BONACIN SILVA, 2001). Foram definidos quatro locais de coleta dentro desta área e um local controle, localizado à margem direita da rodovia no perímetro urbano de Sta. Gertrudes, para fins de comparação, sendo que foram coletadas três amostras de solo em cada local. A figura 1 exibe o aspecto geral da área de estudo, mostrando a localização da rodovia, as indústrias cerâmicas, os lagos artificiais e pesqueiros, bem como o córrego da Fazenda Itaqui e algumas de suas nascentes tributárias.

As coordenadas geográficas dos locais de amostragem de solo foram determinadas com um aparelho de GPS (Global Positioning System) Garmin 12 canais, sendo as seguintes: local 1, área de pouca vegetação e de solo pouco úmido, 22° 27' 46" S e 47° 32' 29" W; local 2, área rica em pastagens e de solo alagadiço, 22° 27' 49" S e 47° 32' 32" W; local 3, posição central em relação aos lagos, 22° 27' 58" S e 47° 32' 22" W; local 4, região alagadiça próxima aos dois lagos pesqueiros, 22° 27' 59" S e 47° 32' 22" W e local 5, área de referência localizada em jardim público no perímetro urbano de Sta. Gertrudes, 22° 27' 12" S e 47° 32' 39" W.

Foram obtidos dados meteorológicos da região tais como precipitações pluviométricas, umidade relativa do ar, temperatura e pressão atmosférica durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003. Os dados foram fornecidos pela Estação

Meteorológica de Rio Claro (22° 23' S e 47° 32' W, 626,5 m de altitude), pertencente ao CEAPLA (Centro de Análise e Planejamento Ambiental) do IGCE-UNESP (Instituto de Geociências e Ciências Exatas, UNESP, Rio Claro, SP).

⑤ Área de Referência (Jardim Público)

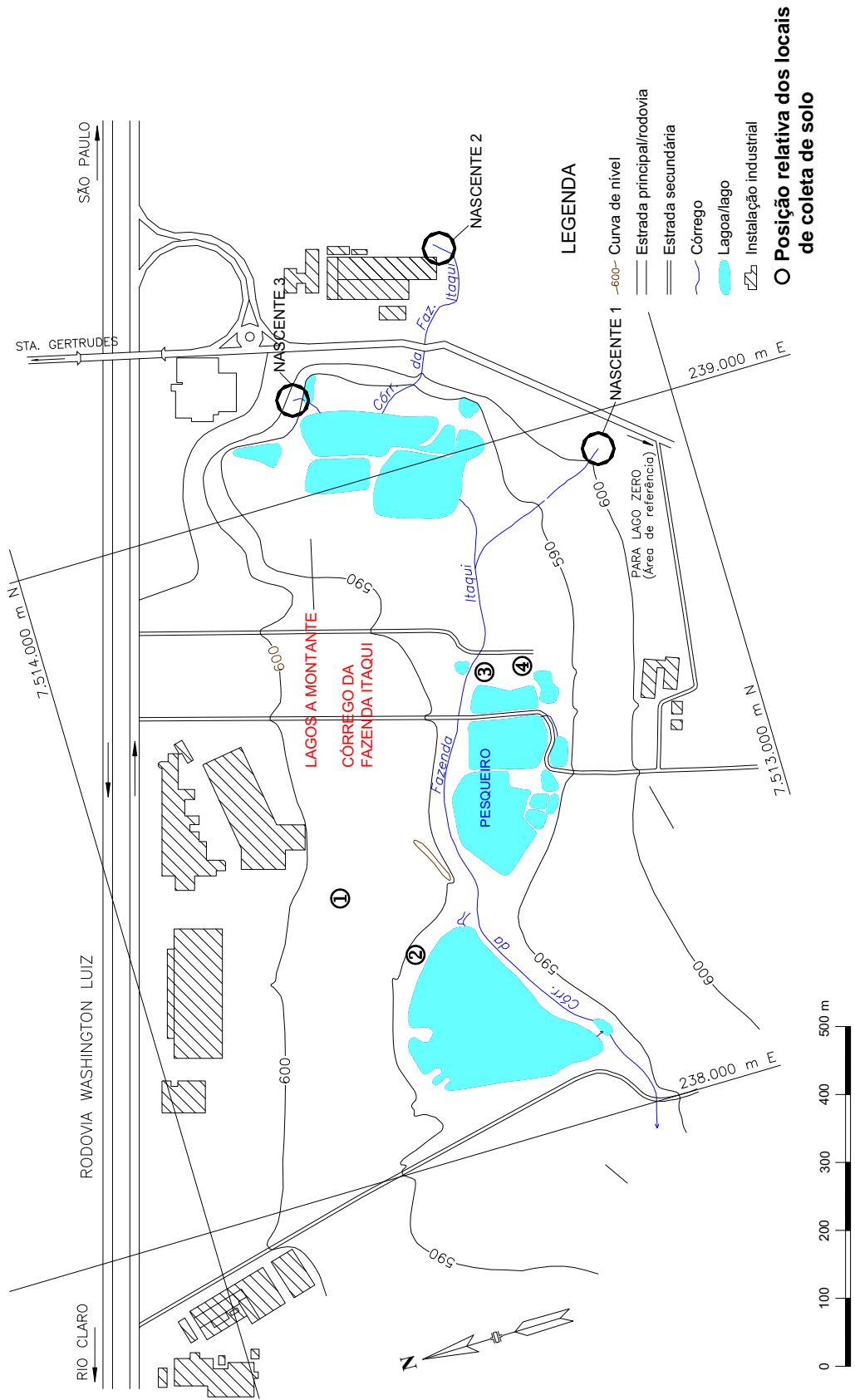


Figura 1. Vista geral da área de estudos na região dos lagos de Sta. Gertrudes, SP. Adaptado de BONACIN SILVA (2001).

## 4.2. Amostras de Solo

Em 15 de novembro de 2002, 18 de março, 28 de maio e 30 de junho de 2003, com auxílio de pás de jardinagem e sacos de PVC, foram coletadas amostras compostas contendo cerca de 600 g de solo, de três escavações com aproximadamente até 10 cm de profundidade, dentro de cada um dos quatro locais situados na área contaminada e no local situado fora desta área. Com auxílio de termômetro digital de haste metálica, foi medida a temperatura do solo a 20 cm de profundidade em cada ponto de coleta. As amostras foram conduzidas ao laboratório da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP, onde foram homogeneizadas manualmente com emprego de luvas de borracha e processadas objetivando o isolamento dos fungos.

Para a determinação do pH das amostras de solo foram preparadas, com água destilada, suspensões de solo a 40% (p v<sup>-1</sup>) (GAZARINI, 1983 segundo PIRES-ZOTTARELLI, 1999). O teor de umidade relativa das amostras de solo foi determinado em uma balança Marte ID50, na qual 3 g de solo foram submetidos a 105°C de temperatura por 20 minutos. Cerca de 200g de cada amostra de solo foram secos em estufa a 105°C durante cinco dias, moídos em almofariz e pistilo, armazenados em sacos plásticos e enviados ao ICASA (Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo), para a análise do teor de Pb, Zn, Cu, B e matéria orgânica (MO).

As amostras de solo foram classificadas de acordo com os valores orientadores para o grau de contaminação de solos e águas subterrâneas (CETESB, 2005), que serão conceituados a seguir:

“Valor de Referência de Qualidade (VRQ) - é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea, e é determinado com base em interpretação estatística de análises físico-químicas de amostras de diversos tipos de solos e águas subterrâneas de diversos aquíferos do Estado de São Paulo. Deve ser utilizado como referência nas ações de prevenção da poluição do solo e das águas subterrâneas e de controle de áreas contaminadas”.

“Valor de Prevenção (VP) - é a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea. Este valor indica a qualidade de um solo capaz de sustentar as suas funções primárias, protegendo-se os receptores ecológicos e a qualidade das águas subterrâneas. Foi

determinado para o solo com base em ensaios com receptores ecológicos. Deve ser utilizado para disciplinar a introdução de substâncias no solo e, quando ultrapassado, a continuidade da atividade será submetida a nova avaliação, devendo os responsáveis legais pela introdução das cargas poluentes proceder o monitoramento dos impactos decorrentes”.

“Valor de Intervenção (VI) - é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando-se um cenário de exposição genérico. Para o solo, foi calculado utilizando-se procedimento de avaliação de risco à saúde humana para cenários de exposição Agrícola-Área de Proteção Máxima – APM<sub>ax</sub>, Residencial e Industrial. A área será classificada como Área Contaminada sob Investigação quando houver constatação da presença de contaminantes no solo em concentrações acima dos Valores de Intervenção, indicando a necessidade de ações para resguardar os receptores de risco”.

#### **4.3. Técnica de Isolamento dos Fungos**

Com água destilada esterilizada, dentro de Erlenmeyers de 250 mL, foram preparados 100 mL de suspensões de solo (10%, p v<sup>-1</sup>) das amostras dos locais de coleta. Os frascos foram tampados com filme de PVC e acoplados em mesa agitadora a 70 rpm por 1,5 h. Com uma pipeta automática autoclavada foi retirado 1 mL de cada suspensão de solo, que foi espalhado sobre a superfície de placas de Petri (90 mm) contendo o meio MA (2%, p v<sup>-1</sup>), extrato de malte 20 g, agar 20 g e água destilada 1.000 mL, acrescido de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O nas concentrações de 0 (controle), 100, 200, 500 e 1.000 mg L<sup>-1</sup> em triplicata, método da placa-de-solo (WARCUP, 1950) modificado quanto ao meio de cultivo utilizado, à quantidade de solo e ao emprego de suspensão de solo. As placas foram incubadas durante 7 dias em sala climatizada, com temperatura entre 20-23°C. As colônias de Mucorales foram transferidas para placas de Petri (90 mm) contendo o meio BDA, batata 140 g, dextrose 10 g, agar 20 g e água destilada 1.000 mL, sendo incubadas entre 20-23°C por 5-7 dias.

#### **4.4. Identificação Taxonômica**

Para a identificação taxonômica, as linhagens de Mucorales inicialmente desenvolvidas em BDA foram transferidas para o meio SMA (synthetic *Mucor* agar),



dextrose 40 g, asparagina 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4$  0,25 g, tiamina 0,0005 g, agar 15 g e água destilada 1.000 mL (HESSELTINE, 1954), o qual foi vertido em placas de Petri (90 mm) que foram incubadas em câmara climática a 25°C por 5-7 dias em ausência de luz. Todas as placas foram mantidas com o verso voltado para baixo a fim de evitar a condensação excessiva de água nas tampas e tiveram as bordas seladas com filme de PVC para diminuir a possibilidade de contaminações aéreas. Quando necessário, algumas linhagens foram incubadas nas temperaturas de 20, 30, 36, 37, 40 e 45°C, de acordo com a literatura específica para cada táxon.

Foram medidos com régua milimetrada comum, os caracteres macroscópicos das colônias como a área e a altura com 5-7 dias e com 25-30 dias de cultivo em SMA, sendo observada a coloração dos versos e dos reversos. Para a análise microscópica dos aspectos morfológicos e biométricos, com estiletos pontiagudos de aço inoxidável foram retirados fragmentos das colônias, que foram colocados sobre: (i) gotas de água destilada + glicerol (2%, v v<sup>-1</sup>); (ii) ou de resina de PVLG, álcool polivinílico (PVA) 8,33 g, ácido láctico 50 mL, água destilada 50 mL e glicerina 5 mL (MORTON *et al.*, 1993), que foi preparada com 50% de PVA e de ácido láctico desta formulação original; (iii) ou de água destilada + resina de PVLG (6-10 gotas de PVLG em 30 mL de água), dispostas sobre lâminas e cobertas com lamínulas de vidro. Esporadicamente, foi utilizado o corante Azul de Algodão e Lactofenol para facilitar a visualização de estruturas de interesse taxonômico.

Foram observados e medidos em microscópio óptico 20 exemplares de cada uma das estruturas vegetativas e reprodutivas de valor taxonômico como os esporangióforos (aumento de 200x), esporângios, columelas, clamidósporos, azigosporângios e zigospórângios quando presentes (aumento de 400x) e esporangiósporos (aumento de 1.200x). Nas descrições taxonômicas são apresentados os intervalos que representam as menores e as maiores estruturas encontradas dentre 20 medições, seguindo-se a ordem comprimento x largura. Células leveduriformes (oídios), rizóides e outras estruturas de menor valor taxonômico foram citadas como presentes ou ausentes. Com o auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico, foram elaboradas figuras das estruturas visando a confecção de pranchas ilustrativas para as descrições taxonômicas. Fotografias das estruturas de interesse foram obtidas em microscópio óptico com analisador de imagens.

Os Mucorales foram identificados conforme as chaves de identificação e informações contidas na literatura pertinente aos gêneros: *Absidia* van Tieghem

(HESSELTINE & ELLIS, 1961, 1964; SCHIPPER, 1990); *Cunninghamella* Matruchot (BAIJAL & MEHROTRA, 1980; ZHENG & CHEN, 2001); *Mucor* Fresenius (BENJAMIN & MEHROTRA, 1963; SCHIPPER, 1973, 1975, 1976, 1978); *Rhizopus* Ehrenberg (SCHIPPER, 1984; SCHIPPER & STALPERS, 1984); *Zygorrhynchus* Vuillemin (HESSELTINE *et al.*, 1959; SCHIPPER, 1986).

#### 4.4.1. Preparo de Culturas Monospóricas

Como a linhagem SPC 2033 apresentou estruturas semelhantes a zigospórangios ou azigospórangios em abundância, houve a necessidade de preparação de culturas monospóricas a fim de se ter certeza de tratar-se de uma linhagem homotática produtora de zigospórangios ou de uma linhagem azigospórica.

Para isso, a linhagem foi incubada em placas de Petri (90 mm) contendo 20 mL de SMA sólido, no interior de câmara climática a 25°C, durante 5 dias na ausência de luz. Foi extraído um disco de 5 mm de diâmetro de uma colônia, para a introdução em um tubo de ensaio contendo 10 mL de uma solução autoclavada de Tween 20 a 0,04% (v v<sup>-1</sup>), baseada em BARCELLOS (2002), que utilizou Tween 80 a 0,01% para o preparo de uma suspensão de conídios de *Trichoderma pseudokoningii* Rifai. O tubo de ensaio foi agitado manualmente por 5 minutos, com uma pipeta automática esterilizada foi retirado 1 mL da suspensão de esporangiósporos, obtida do processo de agitação, sendo que este volume foi adicionado em novo tubo de ensaio com 9 mL da solução de Tween 20 e assim sucessivamente até a obtenção da diluição 10<sup>-6</sup>.

Foram esterilizadas placas de Petri contendo uma lâmina de vidro no interior, sobre as quais foi vertido asépticamente 1 mL de SMA, de modo a formar uma película sobre as lâminas. Sobre cada película de SMA, foram adicionadas, separadamente, seis gotas das suspensões de esporangiósporos das diluições 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> ou 10<sup>-6</sup>, sendo o ensaio realizado em triplicata. As placas foram movimentadas levemente para espalhar as suspensões de esporangiósporos nas lâminas, adicionadas de água destilada esterilizada, tampadas e incubadas em câmara climática a 25°C. Diariamente, as placas foram observadas de baixo para cima contra a luz ambiente e de cima para baixo sobre uma superfície negra, com uma lupa de relojoeiro de 20 vezes de aumento. Com um estilete pontiagudo, foram retirados fragmentos das películas de SMA correspondentes às colônias em início de

desenvolvimento, os quais foram transferidos para novas placas com SMA, que foram incubadas conforme já mencionado.

#### 4.5. Curvas de Crescimento e Produção de Biomassa

Foram escolhidas cinco linhagens de *Mucor hiemalis* Wehmer e uma linhagem de *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal para os experimentos visando elaboração de curvas de crescimento. As linhagens isoladas com MA adicionado de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  foram *Mucor bainieri* SPC 2033 ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040 ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2041 ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); com MA adicionado de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  foram *Mucor hiemalis* f. *luteus* SPC 2042 ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), *Mucor hiemalis* f. *luteus* SPC 2043 ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *Mucor hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ).

As linhagens cresceram em placas de Petri (90 mm) com 20 mL de MA sólido e foram incubadas em câmara climática por 5 dias a 25°C. Discos de 5 mm de cada colônia foram inoculados em Erlenmeyers (250 mL) contendo 150 mL de MA líquido, que teve o pH inicial (pHi) analisado, de modo que cada frasco recebeu apenas um disco de inóculo. Dez discos de inóculo das linhagens foram pesados, secos a 85°C por 5 dias e novamente pesados, sendo a massa seca subtraída da úmida para estimar a biomassa média inicial em cada experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata, de maneira que os frascos foram aleatoriamente acoplados em mesa agitadora orbital, agitados a 120 rpm em sala escura com temperatura mantida a 28°C e coletados em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16 e 20 dias (SILVA, 2002).

A biomassa produzida em cada frasco foi vertida em uma peneira Granutest (ABNT 270) com 53  $\mu\text{m}$  de abertura de malha, lavada abundantemente com água destilada, seca em estufa a 85°C por cinco dias (AZAB *et al.*, 1995) e do MA líquido foi medido o pH final (pHf), objetivando a elaboração de curvas de crescimento e pH em função do tempo e das condições experimentais.

As biomassas das duas linhagens selecionadas: *M. hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 e *M. hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040, foram preparadas conforme já descrito para o ensaio da curva de crescimento e pH, exceto em relação à temperatura e o tempo de incubação, 22 a 25°C e 5 dias, respectivamente. Depois de secas, as biomassas foram reduzidas a pó em almofariz cerâmico com pistilo (TOBIN *et al.*, 1984), colocadas em potes plásticos opacos com tampa de rosca e armazenadas em armário, constituindo o material biossorvente para

o ensaio de adsorção de Pb e Zn em comparação com o carvão ativado, utilizado como material de referência (AZAB *et al.*, 1990; AZAB, 1994).

#### 4.6. Ensaio de Biossorção de Pb e Zn

Com água destilada deionizada, foram preparadas soluções estoque contendo 100 mM de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ou de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ . Com o emprego de uma pipeta automática de 100 a 1.000  $\mu\text{L}$ , foram adicionados 2000  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{HNO}_3$  a 10% ( $\text{v v}^{-1}$ ) e 3000  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetato de sódio 1 M em 10 litros de água destilada deionizada com pH inicial de 5,538, seguindo-se da adição de mais 10 gotas da solução de  $\text{HNO}_3$  e cinco gotas da solução de acetato de sódio, obteve-se o pH final de 4,005 a 21,5°C. Utilizando-se as soluções estoque com 100 mM de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  e a água deionizada com pH 4, foram elaboradas diluições para a obtenção das soluções experimentais contendo 0,06, 0,13 ou 0,17 mM de Pb e 0,08, 0,16 ou 0,23 mM de Zn.

Em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de cada uma das soluções de Pb ou de Zn, foram adicionados separadamente 0,1 g da biomassa de cada linhagem (SPC 2044 e SPC 2040) ou de carvão ativado (CA) de grau analítico. Os controles foram constituídos da mesma quantidade de biomassa ou de carvão ativado em água destilada deionizada e das soluções de Pb ou de Zn isoladamente. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que os frascos foram agitados a 120 rpm em mesas agitadoras orbitais durante 14 horas em temperatura entre 22 e 25°C. As soluções de Pb e Zn foram separadas das biomassas e do carvão ativado por filtração sob vácuo através de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (PALMIERI *et al.*, 2000), a fase líquida foi armazenada em frascos de polietileno e congelada para posterior análise.

Antes do uso, os balões volumétricos, ponteiros de pipeta automática, Erlenmeyers de 250 mL, bem como os recipientes de vidro usados para armazenar as soluções estoque dos metais, foram lavados por três vezes em água de torneira, três vezes em solução de  $\text{HNO}_3$  a 10% e três vezes em água deionizada. Os frascos de polietileno utilizados para armazenar as soluções de metais pós-ensaios de biossorção foram lavados do mesmo modo, exceto pelo emprego de solução de HCl a 10% e secagem em estufa a 70°C.

#### 4.6.1. Análise Química de Pb e Zn

As análises químicas do teor remanescente dos metais em solução foram realizadas na Seção de Ecologia do Instituto de Botânica, em um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AAS) Shimadzu, modelo AA 6601F, utilizando-se padrões Titrisol (Merck) de Pb e de Zn para a elaboração de curvas de calibração do equipamento.

Para a análise de Pb, foram preparadas soluções-padrão nas concentrações de 0, 0,7, 1,5, 2,5, 3,5, 5,0, 7,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>, sendo que todas as amostras com Pb, inclusive os padrões, foram acrescentadas de EDTA dissódico para a concentração final de 0,1 M, a fim de evitar a possível interferência de ânions carbonato, fosfato, compostos de iodo ou de flúor, seguindo-se as recomendações do manual de instruções do aparelho. Para a análise de Zn, foram preparadas soluções-padrão nas concentrações de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> (MALAVOLTA *et al.*, 1997), sem a necessidade de aditivos. O preparo de todas as soluções-padrão foi feito utilizando-se água bideionizada tipo I ultrapura, quase isenta de material orgânico, produzida num aparelho Barnstead, modelo Easypure RF, assim como a diluição das amostras.

Os valores das concentrações remanescentes de Pb e de Zn nas soluções foram subtraídos das concentrações iniciais conhecidas (TOBIN *et al.*, 1984; MATIS *et al.*, 1994) para calcular os índices q, q<sub>M</sub> e q% (com base em VOLESKY, 2004), segundo as equações:

$$q = C_i - C_f \cdot B^{-1} \quad (1)$$

$$q_M = q \cdot M_M^{-1} \quad (2)$$

$$q\% = \{[(C_i - C_f) \cdot 100] \cdot C_i^{-1}\} \cdot B^{-1} \quad (3)$$

Onde q é a quantidade de metal adsorvida por unidade de biomassa (mg g<sup>-1</sup>), C<sub>i</sub> é a concentração inicial do metal em solução (mg L<sup>-1</sup>), C<sub>f</sub> é a concentração final do metal em solução no equilíbrio (mg L<sup>-1</sup>), B é a quantidade de biomassa (g L<sup>-1</sup>), q<sub>M</sub> é a quantidade de metal adsorvida por unidade de biomassa (mM g<sup>-1</sup>), M<sub>M</sub> é a massa atômica do metal e q% é o percentual de metal adsorvido em relação à quantidade de biomassa (B).

#### 4.7. Análise Estatística

O delineamento experimental dos ensaios foi do tipo inteiramente ao acaso (VIEIRA, 1999). No ensaio para a elaboração de curvas de crescimento e pH, foram avaliados os seguintes tratamentos: linhagens, dias, pH<sub>i</sub> do MA e linhagens x dias, em relação às variáveis produção de biomassa (g) e pH<sub>f</sub> do EM, sendo analisadas as seguintes hipóteses:

$H_0$ : a produção de biomassa é igual entre as linhagens.

$H_1$ : a produção de biomassa é diferente entre as linhagens.

No ensaio de biossorção, os tratamentos avaliados foram: materiais adsorventes, Ci e materiais adsorventes x Ci, em relação às variáveis Cf, q, q<sub>M</sub> e q%, sendo testadas as hipóteses:

$H_0$ : a capacidade de adsorção de Pb e Zn pelas biomassas das linhagens é igual à encontrada para o carvão ativado.

$H_1$ : a capacidade de adsorção de Pb e Zn pelas biomassas das linhagens é diferente da encontrada para o carvão ativado.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) através do programa estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2000), sendo escolhido o teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Os detalhes da análise estatística são apresentados nos apêndices 1 e 2.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Ambiente Estudado e Fungos Obtidos**

#### **5.1.1. Caracterização Climática da Área de Estudo**

De acordo com o sistema de classificação de Köppen, o clima de Sta. Gertrudes é do tipo Cwa, subtropical, seco no inverno e chuvoso no verão, de modo que o período seco vai de março a setembro e o chuvoso de outubro a fevereiro, ocorrendo menos de 20% e mais de 80% das precipitações totais, respectivamente, em cada período (BONACIN SILVA, 2001). Os valores de precipitações pluviométricas ocorridas de setembro de 2002 a agosto de 2003 confirmam esta tendência (figura 2), embora neste período a época chuvosa tenha ocorrido de outubro de 2002 a março de 2003 e a época seca nos meses restantes.

De acordo com os dados da Estação Meteorológica do CEAPLA, IGCE-UNESP, as figuras 2-4 mostram o comportamento da região em relação às precipitações pluviométricas, umidade relativa do ar e temperatura, respectivamente, de acordo com o seguinte:

No dia 15 de novembro de 2002 (1ª coleta) houve precipitação pluviométrica de 27,6 mm na região, sendo que o total mensal foi de 288,2 mm. A umidade relativa do ar média do dia foi de 74% e a média mensal foi de 68%, a temperatura média do dia foi de 24°C e a média mensal foi de 25°C.

Em 18 de março de 2003 (2ª coleta) não houve precipitação pluviométrica, mas no dia anterior foi de 27,1 mm, sendo que o total mensal foi de 96,9 mm. A umidade relativa

do ar média do dia foi de 71% e a média mensal foi de 73%, a temperatura média do dia foi de 24°C e a média mensal foi de 25°C.

Em 28 de maio de 2003 (3ª coleta) não ocorreram precipitações pluviométricas, nem nos três dias anteriores, nem nos três dias seguintes à coleta, sendo que o total mensal foi de 45,8 mm. A umidade relativa do ar média do dia foi de 75% e a média mensal foi de 70%, a temperatura média do dia foi de 17°C e a média mensal foi de 20°C.

Em 30 de junho de 2003 (4ª coleta) não houve precipitação pluviométrica, ocorreram precipitações pluviométricas somente entre os dias quatro e nove do mês, sendo que o total mensal foi de 15,6 mm. A umidade relativa do ar média do dia foi de 57% e a média mensal foi de 72%, a temperatura média do dia foi de 19°C e a média mensal foi de 21°C.

Em relação à pressão atmosférica (figura 5), foi observado que o período de menor pressão correspondeu justamente aos meses de maiores precipitações pluviométricas e elevações térmicas, de outubro de 2002 a março de 2003.



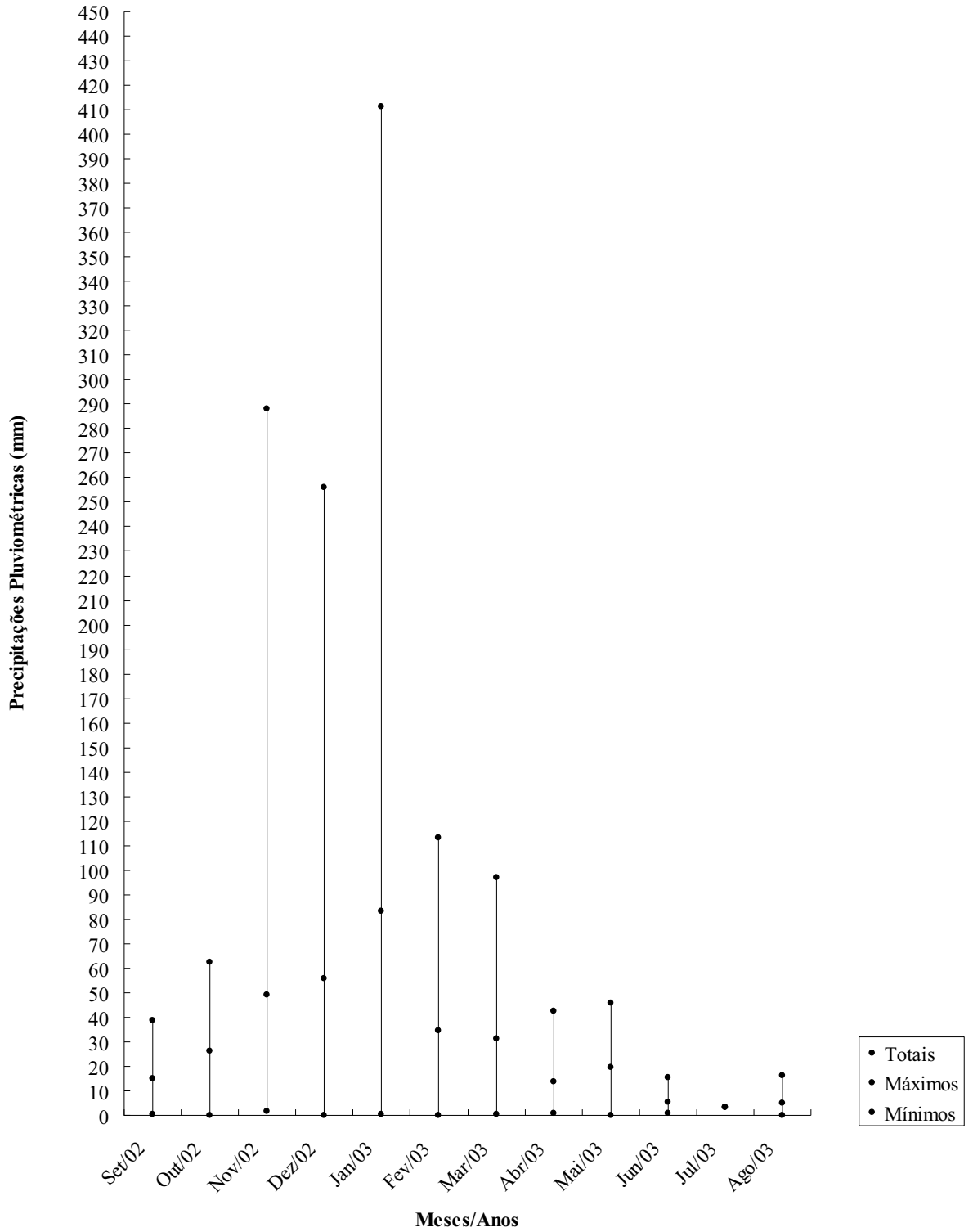


Figura 2. Precipitações pluviométricas ocorridas na região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Valores totais (soma mensal), máximos e mínimos. Fonte: CEAPLA, IGCE-UNESP.

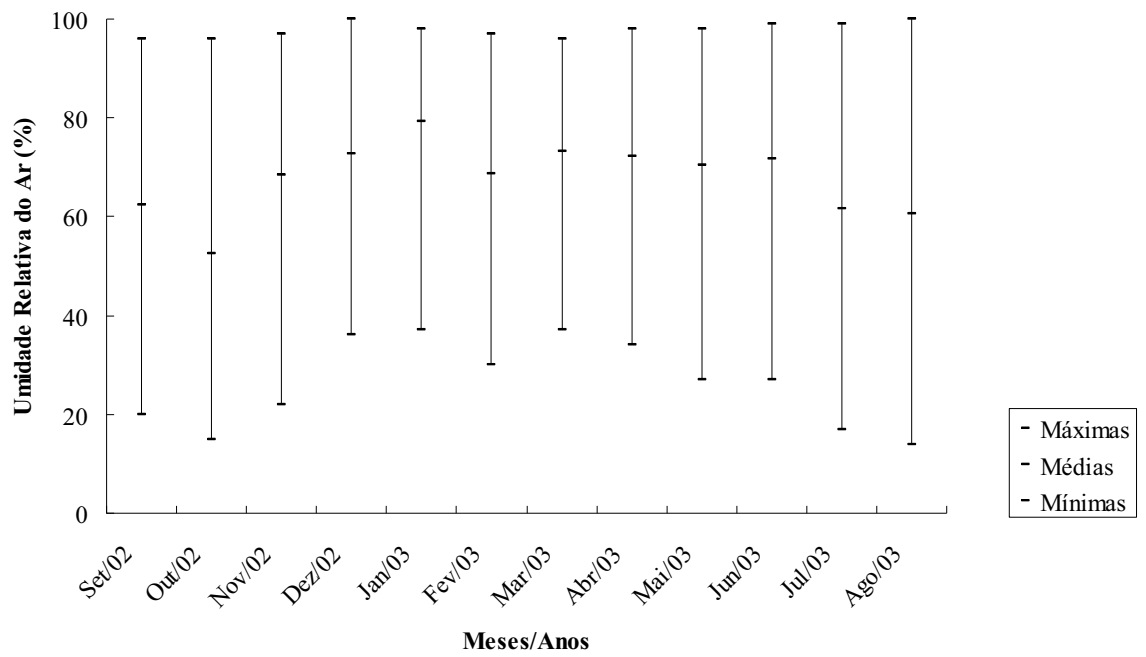


Figura 3. Umidade relativa do ar da região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Ocorrências máximas, médias e mínimas mensais, de leituras diárias realizadas às 9, 15 e 21 h. Fonte: CEAPLA, IGCE-UNESP.

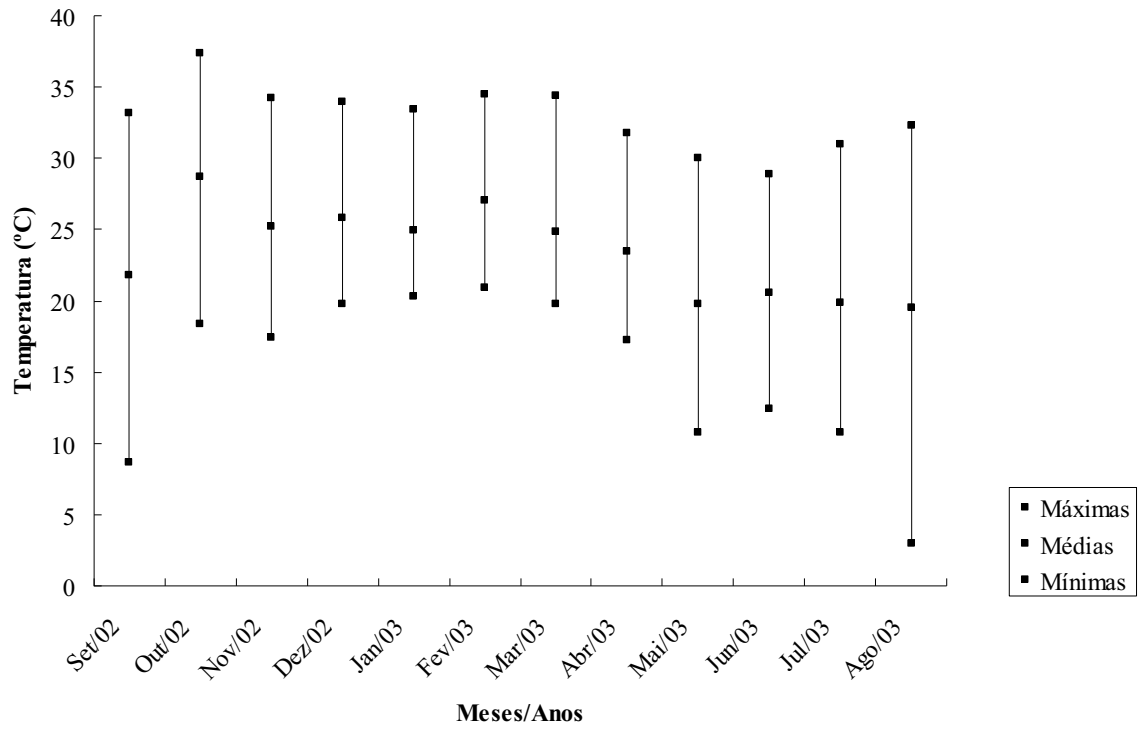


Figura 4. Variação térmica da região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Ocorrências máximas, médias e mínimas mensais, de leituras diárias realizadas às 9, 15 e 21 h. Fonte: CEAPLA, IGCE-UNESP.

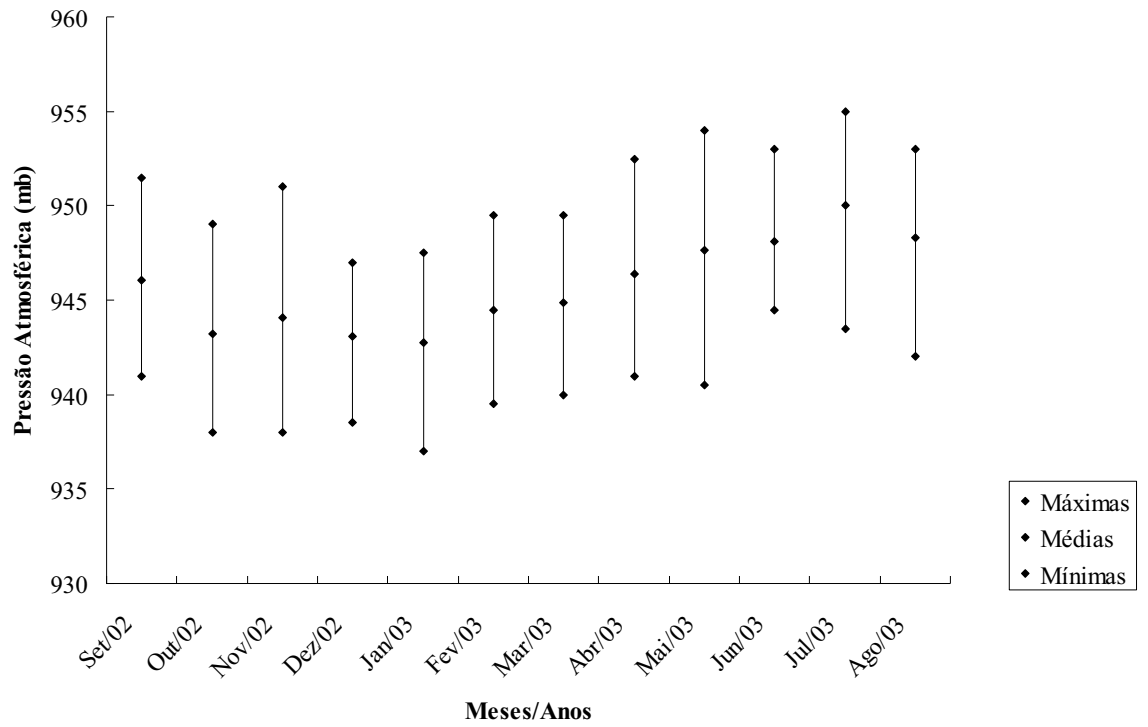


Figura 5. Variação de pressão atmosférica da região de Sta. Gertrudes, SP durante setembro de 2002 a agosto de 2003. Ocorrências máximas, médias e mínimas mensais, de leituras diárias realizadas às 9, 15 e 21 h. Fonte: CEAPLA, IGCE-UNESP.

### 5.1.2. Características das Amostras de Solo

Segundo o mais recente sistema de classificação de solos do Estado de São Paulo, adotado pelo Instituto Agronômico de Campinas, o Latossolo Vermelho (LV 4) é o tipo de solo predominante na área de estudo, enquanto que o Latossolo Vermelho (LV 9) e o Argissolo (Podzólico) Vermelho Amarelo (PVA 31) predominam nas áreas adjacentes (BONACIN SILVA, 2001).

De modo geral, tanto os Latossolos como os Argissolos são considerados solos de textura argilosa (OLIVEIRA *et al.*, 1992) e foi esta característica que possibilitou o histórico desenvolvimento da indústria cerâmica na região de Sta. Gertrudes a partir de 1918, surgindo primeiro a manufatura artesanal de telhas paulistas e francesas, manilhas e lajotões coloniais e, com o passar do tempo, a grande indústria de pisos e revestimentos cerâmicos esmaltados, que embora movimente intensamente a economia local, também gera enorme carga poluidora (BONACIN SILVA, 2001). A atividade mineradora do Estado produz principalmente areia, argila, pedra de talhe e cantaria, sendo que no processo ocorre a remoção de grandes volumes da camada superficial do solo (camada insaturada), responsável pela limpeza natural das águas que se infiltram no solo (SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, 1997).

O índice VRQ para os elementos Cu, Pb e Zn corresponde a 35, 17 e 60 mg kg<sup>-1</sup> e o índice VP corresponde a 60, 72 e 300 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O índice VI para os três cenários de exposição, agrícola, residencial e industrial, corresponde respectivamente a 200, 400 e 600 mg kg<sup>-1</sup> para o Cu, 180, 300 e 900 mg kg<sup>-1</sup> para o Pb e 450, 1.000 e 2.000 mg kg<sup>-1</sup> para o Zn (CETESB, 2005). De acordo com o resultado das análises de solo efetuadas no ICASA, os teores de Pb, Zn, Cu, B e matéria orgânica (MO) no solo de Sta. Gertrudes foram os seguintes:

Os teores de Cu no solo dos cinco locais investigados durante as quatro coletas não ultrapassaram os 21,60 mg kg<sup>-1</sup>, referentes à 2ª coleta do local 3, estando portanto abaixo do limite de VRQ (tabela 1). BONACIN SILVA (2001) efetuou um intensivo levantamento de amostragens de solo dentro desta mesma região (variando de 15 a 60 cm de profundidade) e encontrou teores de Cu entre 26 e 1.267 mg kg<sup>-1</sup>, que transpuseram em mais de duas vezes o VI para o cenário industrial.

Quanto ao B, não há a indicação de valores de referência orientadores para o solo, mas somente o VI para águas subterrâneas que corresponde a 500 µg L<sup>-1</sup> (CETESB, 2005).

De acordo com MARKERT (1992), a ocorrência de B no solo varia entre 5-80 mg kg<sup>-1</sup> (peso seco). No solo do local 3 (3ª coleta) foi detectada a concentração de 175,83 mg kg<sup>-1</sup>, que supera em mais de duas vezes o limite máximo de concentração de B para o ambiente natural (tabela 1). BONACIN SILVA (2001) encontrou teores de B variando de 12 a 4.331 mg kg<sup>-1</sup> no solo e de 1,4 a 504 mg L<sup>-1</sup> na água subterrânea da região, mostrando que dependendo do local investigado tanto o solo quanto as águas subterrâneas contém teores elevadíssimos deste elemento.

A água potável geralmente contém menos que 0,1 mg de B por litro, concentração esta considerada inócua ao consumo humano. Por outro lado, a ingestão de grandes quantidades de B pode prejudicar o sistema nervoso central, sendo que a ingestão por tempo prolongado pode acarretar em uma síndrome conhecida como borismo. O elemento pode ocorrer naturalmente em algumas águas, como as águas marinhas, na concentração aproximada de 5 mg L<sup>-1</sup>. (APHA, 1995).

O B está classificado entre os micronutrientes essenciais ao funcionamento do metabolismo vegetal (incluindo algas), estando associado aos processos de divisão celular, glicometabolismo e transporte de açúcar, síntese de flavonóides e ácidos nucleicos e construção da parede celular. Ocorre nas plantas de referência na concentração estimada de 40 mg por kg de peso seco, ou entre 30-75 mg kg<sup>-1</sup> nas demais, sendo que os representantes das famílias Cruciferae e Leguminosae são considerados os organismos acumuladores. O elemento estimula a fixação do nitrogênio por bactérias, embora não seja considerado essencial aos fungos e animais. É usado em ligas, abrasivos, nas indústrias do vidro, cerâmicas e esmaltes e serve como fertilizante e pesticida (MARKERT, 1992).

Tabela 1. Teores dos elementos Cu, B, Zn, Pb e matéria orgânica (MO) de amostras de solo coletadas a até 10 cm de profundidade na área de estudos em Sta. Gertrudes, SP (fonte: ICASA). Os traços indicam amostras não analisadas devido à influência de grande quantidade de MO, sendo feita a mudança de área de amostragem nas coletas subseqüentes. Md. = média.

Locais	Coletas	Elementos (mg kg <sup>-1</sup> )				MO (g kg <sup>-1</sup> )
		Cu	B	Zn	Pb	
1	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
1	2 <sup>a</sup>	0,88	2,01	2,44	0,73	10,30
1	3 <sup>a</sup>	0,50	2,91	4,48	0,68	12,00
1	4 <sup>a</sup>	0,36	2,86	3,00	1,00	10,30
	Md.	0,58	1,85	3,31	0,80	10,87
2	1 <sup>a</sup>	5,80	35,28	22,80	45,16	41,30
2	2 <sup>a</sup>	0,74	0,45	0,82	1,19	20,60
2	3 <sup>a</sup>	1,04	1,21	1,44	2,09	22,40
2	4 <sup>a</sup>	0,88	0,88	0,92	1,67	20,60
	Md.	2,12	9,46	6,50	12,53	26,23
3	1 <sup>a</sup>	2,46	13,42	3,80	7,42	24,10
3	2 <sup>a</sup>	21,60	35,71	34,20	908,40	15,50
3	3 <sup>a</sup>	6,66	175,83	30,60	281,00	20,60
3	4 <sup>a</sup>	7,40	53,75	29,20	193,92	44,70
	Md.	9,53	69,68	24,45	347,69	26,23
4	1 <sup>a</sup>	5,40	60,34	10,04	58,00	41,30
4	2 <sup>a</sup>	9,84	17,16	23,80	206,80	48,20
4	3 <sup>a</sup>	8,52	55,03	25,80	340,40	18,90
4	4 <sup>a</sup>	11,00	78,58	35,40	323,40	25,80
	Md.	8,69	52,78	23,76	232,15	33,55
5	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
5	2 <sup>a</sup>	2,02	1,34	5,14	3,56	39,60
5	3 <sup>a</sup>	1,98	3,15	6,74	3,48	43,00
5	4 <sup>a</sup>	2,06	2,56	5,92	5,79	48,20
	Md.	2,02	2,35	5,93	4,28	43,60

O teor de Zn nas amostras não ultrapassou o VRQ (tabela 1), sendo que o máximo valor encontrado foi 35,40 mg kg<sup>-1</sup> no local 4. BONACIN SILVA (2001) encontrou teores de Zn entre 53 e 2.930 mg kg<sup>-1</sup>, este último valor ultrapassando em 930 mg kg<sup>-1</sup> o VI estabelecido para o cenário industrial.

No caso do Pb (tabela 1), o limite de VI foi ultrapassado em três quartos do total de amostras dos locais 3 e 4. Em relação ao local 3, o VI para o cenário agrícola (APMax) foi superado na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas, sendo que na 2<sup>a</sup> coleta foi ultrapassado o VI para o cenário industrial, atingindo 908,40 mg kg<sup>-1</sup>. Na 2<sup>a</sup> coleta do local 4, o VI para o cenário agrícola foi ultrapassado atingindo o valor de 206,80 mg kg<sup>-1</sup>. Na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas os teores do metal foram de 340,40 e 323,40 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, situados acima do VI para o cenário residencial. Os teores de Pb antes detectados para a área se situaram entre 15 a 14.700 mg kg<sup>-1</sup> (BONACIN SILVA, 2001).

Em relação à matéria orgânica (MO), foram detectados teores que variaram entre 10,30 a 12,00 g kg<sup>-1</sup> (1,03 a 1,2%) no local 1; de 20,60 a 41,30 g kg<sup>-1</sup> (2,06 a 4,13%) no local 2; de 15,50 a 44,70 g kg<sup>-1</sup> (1,55 a 4,47%) no local 3; de 18,90 a 48,20 g kg<sup>-1</sup> (1,89 a 4,82%) no local 4; e de 39,60 a 48,20 g kg<sup>-1</sup> (3,96 a 4,82%) no local 5 (tabela 1). Na mesma região, entre 15 a 60 cm de profundidade, BONACIN SILVA (2001) detectou teores de MO entre 0,1 a 1,7% na maioria dos sete locais em que foram retiradas amostras de solo, sendo que em apenas um deles os teores de MO variaram de 2 a 4,8%.

Os dados aqui apresentados, que representam os teores dos elementos Cu, B, Zn e Pb e da MO em amostras de solo retiradas a até 10 cm de profundidade, constituem as informações para a camada mais superficial do solo e complementam os dados fornecidos por BONACIN SILVA (2001), que trabalhou com amostras coletadas de 15 a 60 cm de profundidade na mesma região. A maior parte dos propágulos fúngicos e a diversidade das espécies diminui com o aumento na profundidade do solo, devido à diminuição da quantidade de matéria orgânica nas camadas ou horizontes inferiores (DIX & WEBSTER, 1995).

Na tabela 2 são exibidos os valores de pH e umidade das amostras de solo. De maneira geral, o pH das amostras permaneceu praticamente constante ao longo das coletas, sendo que a maior variação ocorreu entre a 1<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> coleta do local 3, pH = 6,08 e 8,65, respectivamente. Foram encontrados anteriormente valores de pH entre 4,9 e 8,3 para o solo da região (BONACIN SILVA, 2001). Os fungos predominam em solos ácidos, onde



sofrem menor competição de bactérias e actinomicetos, mas de maneira geral podem ser encontrados numa faixa de pH entre 3 e 9 (BRANDÃO, 1992).

Em relação à umidade do solo, observa-se que houve uma tendência de diminuição no teor de umidade das amostras da 1ª à 4ª coletas em todos os locais de amostragens. Esta redução do teor de umidade pode ser explicada pelos índices de precipitações pluviométricas já apresentados, que relacionam as coletas 1 e 2 aos meses chuvosos e as coletas 3 e 4 aos meses relativamente secos (figura 2). Não obstante, os teores de umidade do solo dos locais 1, 2 e 3 referentes à 3ª coleta superaram os teores da 2ª coleta. A umidade ideal do solo para o desenvolvimento dos fungos é de 60 a 70% da capacidade de retenção de água do solo (BRANDÃO, 1992). Em adição, a temperatura do solo na região apresentou baixa oscilação, estando entre os valores de 21, 24, 25 e 24°C da 1ª à 4ª coletas, respectivamente.

Tabela 2. Valores de pH e teor de umidade das amostras de solo dos cinco locais de coleta em Sta. Gertrudes, SP. Os traços indicam amostras não analisadas devido à influência de grande quantidade de MO, sendo feita a mudança de área de amostragem nas coletas subseqüentes.

Locais	Coletas	pH	Umidade (%)
1	1 <sup>a</sup>	-	-
1	2 <sup>a</sup>	6,45	16,24
1	3 <sup>a</sup>	6,50	18,42
1	4 <sup>a</sup>	6,35	8,94
2	1 <sup>a</sup>	6,03	28,15
2	2 <sup>a</sup>	6,29	13,84
2	3 <sup>a</sup>	6,52	17,60
2	4 <sup>a</sup>	6,22	7,60
3	1 <sup>a</sup>	6,08	16,65
3	2 <sup>a</sup>	8,09	13,08
3	3 <sup>a</sup>	8,65	17,67
3	4 <sup>a</sup>	7,84	7,83
4	1 <sup>a</sup>	5,00	17,44
4	2 <sup>a</sup>	6,89	19,43
4	3 <sup>a</sup>	7,31	11,22
4	4 <sup>a</sup>	6,65	4,89
5	1 <sup>a</sup>	-	-
5	2 <sup>a</sup>	6,01	12,46
5	3 <sup>a</sup>	6,91	8,22
5	4 <sup>a</sup>	6,64	4,17

### 5.1.3. Metodologia de Isolamento

Com base na clássica técnica de WARCUP (1950), no presente estudo foi utilizada uma suspensão de solo a 10%, objetivando-se facilitar a desagregação de partículas de solo, devido à natureza altamente argilosa apresentada pelo solo da região de Sta. Gertrudes. Houve a preocupação de que existissem poucos propágulos fúngicos viáveis nas amostras de solo, por causa da influência de algumas atividades causadoras, ou potencialmente causadoras de distúrbios ambientais na área de estudos, destacadas a seguir:

À montante da área houve o intenso descarte de resíduos contendo metais pesados e outros elementos químicos das indústrias de cerâmicas e pisos esmaltados, constantes revolvimentos de solo, escavações e aterros efetuados pelas indústrias em diversos setores; ocorre intensa movimentação de veículos pesados tais como tratores e caminhões das fábricas; e há a proximidade com a rodovia estadual SP-310. À jusante da área, existe uma lavoura de cana-de-açúcar. Sabe-se que nas lavouras de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo são utilizados 24 tipos de herbicidas declarados (ARMAS *et al.*, 2005), dentre outros possíveis agrotóxicos não declarados ou não controlados.

Todas estas atividades causadoras de impacto sobre o solo podem desequilibrar o ambiente e a comunidade fúngica. Distúrbios causados por metais pesados podem afetar negativamente a sobrevivência dos fungos, atingindo o número e a diversidade de espécies, a habilidade de crescimento e produção de biomassa, a fisiologia, a produção de enzimas e, conseqüentemente, prejudicar a realização de importantes funções dos fungos nos ecossistemas tais como a decomposição de serapilheira (WAINWRIGHT & GADD, 1997; DIGHTON, 2003). Por esta razão, foi utilizado 1 mL da suspensão integral de solo a 10% ( $m\ v^{-1}$ ) como inóculo sobre os meios de cultivo, sem o emprego de diluições seriais, com o intuito de se garantir uma quantidade razoável de propágulos fúngicos às placas de Petri destinadas aos isolamentos.

Conforme o estudo de WARCUP (1950), para solos muitos argilosos é conveniente a adição de pequena quantidade de água para facilitar o melhor espalhamento dos agregados de solo, sobre o qual é vertido o meio de cultivo escolhido. O autor ponderou que no caso do método de isolamento direto, com a disposição de alíquotas de solo sobre o meio de cultivo, há a formação de um filme de água junto às partículas de solo, que acaba por favorecer o crescimento de bactérias e, por outro lado, comentou que o método da

diluição em série pode ser muito seletivo se apenas for usada a suspensão de solo sem o emprego da fase residual que permanece normalmente nos recipientes em que foram preparadas as suspensões.

BARRON (1971) informou que o método da diluição em série é muito criticado por ecologistas, por ser considerado favorecedor das espécies altamente esporulantes, que não representariam necessariamente a micota ativa do solo, mas salientou que muitas espécies nas quais há outros interesses científicos, não somente ecológicos, são obtidas através deste método e que a técnica de WARCUP (1950) é menos seletiva e de preparo consideravelmente mais simples do que a diluição seriada.

Toda técnica de isolamento de fungos ou de estimativa da micota total de determinado ambiente ou substrato é seletiva (FRANKLAND, 1990), devido a fatores diversos tais como o tratamento dado ao substrato, os meios de cultivo utilizados, as condições de crescimento, as variáveis químicas e físicas envolvidas (GRANDI & ATTILI, 2004). Segundo FRANKLAND (1990), poucos micologistas obtiveram o sucesso de J. H. Warcup quanto ao isolamento de fungos a partir de fragmentos de hifas retiradas diretamente do solo. Desta maneira, os objetivos que se pretende atingir irão determinar a escolha da técnica mais adequada, que por sua vez estará influenciada pelo tipo e as características constituintes da amostra a ser analisada (ex.: água, solo, folheto, esterco de animais) e pelos grupos de fungos alvo que se deseja estudar (ex.: zigomicetos, fungos zoospóricos, fungos anamórficos, hifomicetos aquáticos, basidiomicetos).

Um dos grandes dilemas que acompanham os estudos de isolamentos de fungos pelas técnicas da placa-de-solo e da diluição seriada, é o fato de não se ter certeza se as colônias obtidas provém de esporos e de outros propágulos viáveis ou de hifas ativas no solo, dificultando a distinção entre as espécies que estariam ativas no ambiente na ocasião do isolamento, daquelas que estariam em estado de dormência (DIX & WEBSTER, 1995) e puderam germinar nas condições de fartura de nutrientes dos meios de cultivo. Este problema, de certo modo, tem atormentado ecologistas preocupados em desvendar o comportamento da comunidade fúngica nos diversos ambientes (FRANKLAND, 1990; DIX & WEBSTER, 1995).

Devido ao papel dos fungos como produtores secundários em relação à microbiota do solo que os consome (DIX & WEBSTER, 1995), parece quase utópico que alguns estudiosos queiram, a rigor, detectá-los sob a forma de micélio e menosprezem os esporos e outros propágulos através dos quais os fungos sobrevivem e dispersam-se no meio

ambiente. Em contraste com os organismos unitários, os fungos pertencem à classe de organismos modulares, de modo que muitos de seus atributos ecológicos provêm desta característica fundamental que expressa-se nas fases do ciclo de vida como dormência, crescimento, esporulação, germinação e dispersão, que são representadas por diferentes partes funcionais do organismo (ANDREWS & HARRIS, 1997).

Os componentes ou módulos que representam o talo fúngico e seus propágulos devem ser levados em consideração, mesmo quando o objetivo é saber qual é a representatividade ecológica de determinada espécie em um dado ambiente. Nenhuma espécie de fungo apresenta apenas micélio ou somente propágulos de dispersão ou resistência, há um balanço entre os módulos de sobrevivência conforme as condições e as variáveis ambientais. Diversas variáveis ambientais influenciam o comportamento dos fungos, o qual expressa-se numa combinação de estratégias de sobrevivência em relação ao seu estágio de desenvolvimento no ciclo de vida, ao *status* de decomposição do substrato, aos competidores presentes e às variáveis abióticas do ambiente (DIX & WEBSTER, 1995). De acordo com a combinação destes fatores, as características fundamentais das espécies fúngicas e as estratégias prevalentes de sobrevivência, pode-se encontrar em dado momento somente partes de um todo orgânico ou um organismo que à primeira vista pode se apresentar numa forma diferente da usualmente vista, como por exemplo o dimorfismo entre as formas filamentosa e leveduriforme, expresso por algumas espécies de *Mucor* sob a condição de anaerobiose (LÜBBEHÜSEN *et al.*, 2003).

No intuito de se estudar a representatividade dos fungos em relação à microbiota, foram desenvolvidas diversas metodologias para a avaliação estimativa da biomassa fúngica total do solo. A técnica da suspensão de partículas de solo em agar fundido, por exemplo, permite a avaliação da biomassa fúngica (volume x densidade) e a distinção entre as hifas vivas e mortas através do uso de corantes vitais e de técnicas autoradiográficas, porém é somente quantitativa e não permite a distinção entre as espécies; métodos imunológicos tais como imunofluorescência e ELISA são utilizados, mas apresentam o problema de reações cruzadas entre muitos antígenos compartilhados por grupos taxonômicos distintos; é também possível estimar a biomassa de fungos através da extração e mensuração de ATP do solo, da liberação do corante fluoresceína devido à hidrólise de diacetato de fluoresceína catalizada por esterases fúngicas, do teor de quitina e de ergosterol, de medidas de respiração através da produção de CO<sub>2</sub> (DIX & WEBSTER, 1995); da análise do conteúdo de ácidos graxos de fosfolípidios (PLFA) 18:2 $\omega$ 6, que são

considerados específicos de membrana celular fúngica, embora tenham sido detectados PLFAs de natureza vegetal idênticos a estes que podem levar a interpretações confusas (WAINWRIGHT & GADD, 1997), dentre outros métodos. Em adição, análises de sequências de rRNA e de rDNA obtidas diretamente do solo podem, relativamente, trazer informações acerca da dinâmica da comunidade fúngica do solo e da rizosfera de plantas de interesse agrônomo, contudo, de acordo com GOMES *et al.* (2003), deve haver esforços no sentido de combinar técnicas moleculares a técnicas de cultivo para se chegar ao melhor entendimento sobre a dinâmica da diversidade fúngica.

Durante a fase de isolamento das linhagens foi observado que em algumas placas, especialmente naquelas sem metais, houve a excessiva formação de mucilagens, constituídas certamente por bactérias e leveduras, de maneira que poucos fungos filamentosos puderam ser isolados nestas condições. Provavelmente, nestes casos tenha ocorrido o chamado fenômeno “killer”, caracterizado como a habilidade de secretar um agente tóxico para indivíduos sensíveis da mesma espécie ou de espécies relacionadas, que foi identificado em algumas linhagens de fungos leveduriformes tais como *Kluyveromyces lactis* (Boidin, Abadie, J.L. Jacob & Pignal) Van der Walt, *Saccharomyces cerevisiae* Gasp. e *Ustilago maydis* (DC.) Corda. Este fenômeno vêm sendo estudado quanto ao potencial de aplicação no controle biológico de fungos fitopatogênicos e é considerado similar ao que ocorre com as bactérias produtoras de toxinas conhecidas como colicinas (KOLTIN *et al.*, 1993).

Por outro lado, os fungos Mucorales obtidos no presente estudo foram isolados conjuntamente com grande quantidade de fungos anamórficos altamente esporulantes, dentre os quais estiveram presentes linhagens de *Trichoderma* spp. que na maioria das vezes exibiram crescimento rápido e agressivo sobre as demais linhagens, dificultando o isolamento. Diversas espécies de *Trichoderma* apresentam reconhecida atividade antifúngica ou parasítica em relação a outras espécies de fungos encontradas no solo, através da produção de metabólitos voláteis e não-voláteis de ação antifúngica, do entrelaçamento de suas hifas entorno das hifas de outros fungos ou da invasão das hifas de outros fungos (DOMSCH *et al.*, 1993; DIX & WEBSTER, 1995). *Trichoderma viride* Pers. é capaz de executar hiperparasitismo em muitos dos fitopatógenos encontrados no solo e sobre os seguintes membros da ordem Mucorales: *Actinomucor elegans* (Eidam) C.R. Benj. & Hesselt., *Circinella muscae* (Sorokín) Berl. & De Toni, *Mucor hiemalis* Wehmer, *M. plumbeus* Bonord., *Phycomyces nitens* (C. Agardh) Kunze, *Rhizopus oryzae*

Went & Prins. Geerl., *Syncephalastrum racemosum* Cohn ex J. Schröt. e *Zygorrhynchus moelleri* Vuill. (DOMSCH *et al.*, 1993). No campus da ESALQ-USP em Piracicaba, SP, por exemplo, foi desenvolvido um produto à base de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de fungos fitopatógenos encontrados no solo (AGÊNCIA FAPESP, 2003).

A metodologia de isolamento de fungos pela técnica de suspensão de solo possibilitou o isolamento de 22 linhagens de fungos pertencentes à ordem Mucorales, que representam 11 táxons distribuídos em cinco gêneros. Os táxons foram os seguintes: *Absidia cylindrospora* Hagem v. *cylindrospora*, *Cunninghamella phaeospora* Boedijn, *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal, *Mucor circinelloides* van Tieghem f. *circinelloides*, *M. circinelloides* van Tieghem f. *lusitanicus* (Bruderlein) Schipper, *M. circinelloides* van Tieghem f. *janssenii* (Lendner) Schipper, *Mucor hiemalis* Wehmer f. *hiemalis*, *M. hiemalis* Wehmer f. *luteus* (Linnemann) Schipper, *Mucor racemosus* Fresenius f. *racemosus*, *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs e *Zygorrhynchus moelleri* Vuillemin. Destaque para o táxon *Mucor bainieri*, descrito pela primeira vez para o Brasil (tabela 3).





Além do estudo sobre os Mucorales, as 18 amostras compostas de solo retiradas dos cinco locais em Sta. Gertrudes, do total de 20 amostras de solo coletadas, foram empregadas simultaneamente para o isolamento de fungos anamórficos através da mesma técnica utilizada aqui e também para o estudo de fungos zoospóricos através de técnicas apropriadas de isolamento utilizando-se diversos substratos como isca (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006). Nestes estudos paralelos, foram obtidos 71 táxons de fungos anamórficos (deuteromicetos) com predomínio dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* (SCHOENLEIN *et al.*, 2005) e 14 táxons de fungos zoospóricos, cinco de Chytridiomycota e nove de Oomycota, com duas citações inéditas para o Brasil (MIRANDA *et al.*, 2005). Somando-se a micota representada pelos Mucorales descritos aqui com os fungos anamórficos e os fungos zoospóricos dos outros estudos (SCHOENLEIN *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2005), chegou-se ao total de 96 táxons de fungos do solo do pólo cerâmico de Sta. Gertrudes, correspondendo a 74% de fungos anamórficos, 15% de fungos zoospóricos e 11% de Mucorales.

Durante estudo realizado na Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI), que abrange diversos municípios do litoral sul paulista, foram realizadas quatro coletas de água e de solo em seis locais às margens do rio Una do Prelado, sendo obtidos 90,2% de fungos anamórficos e 4,9% de Zygomycota e de Ascomycota do total de fungos encontrados no solo e 88,9% de fungos anamórficos, 9,2% de Zygomycota e 1,8% de Ascomycota do total de fungos encontrados na água (PINTO, 1999). Com base nas informações de GRANDI & ATTILI (2004), noutros levantamentos sobre fungos microscópicos realizados na EEJI em que os Zygomycota também foram alvo de estudo, estes fungos corresponderam a 6,3 % da micota obtida. Apesar de muito reduzida do que era originalmente, a Mata Atlântica abriga ainda hoje enorme diversidade biológica, sendo que por motivos históricos e dificuldade de acesso a EEJI constitui-se num dos trechos mais preservados desta cobertura vegetal (MAMEDE *et al.*, 2004).

Em levantamento de fungos de solo sob vegetação natural e vegetação secundária na EEJI, foram coletadas oito amostras de solo compostas de três sub-amostras cada, sendo utilizada a técnica da diluição seriada para isolamento dos fungos. Foram fornecidas três diferentes condições em relação aos meios de cultivo e três ajustes de pH, sendo que do total de 112 táxons obtidos apenas quatro foram pertencentes ao filo Zygomycota (TAUK-TORNISIELO *et al.*, 2005), representando 3,6% do total de fungos isolados. Desta maneira, pode-se considerar que o percentual de 11% de fungos Mucorales obtidos do solo

do pólo cerâmico de Sta. Gertrudes e adjacências está de acordo com o que pode ser esperado para o solo de regiões consideradas preservadas, tais como a Mata Atlântica da EEJI.

Em comparação ao estudo de TAUKE-TORNISIELO *et al.* (2005), torna-se aparente que embora os autores tenham utilizado condições de cultivo teoricamente mais favoráveis ao isolamento de fungos, a técnica de diluição pode ter, de certo modo, limitado o isolamento de zigomicetos ou favorecido aos demais grupos taxonômicos de fungos, de maneira que foram isolados somente quatro táxons representantes deste grupo. Em contraste, a técnica utilizada aqui permitiu o isolamento de 11 táxons de zigomicetos, apesar de ter sido utilizado apenas um tipo de meio de cultivo e de adição de Pb e de Zn na forma de sais de nitrato.

SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (2006) realizaram 13 coletas de solo, água, e folheto no período de 1993 a 1995 em duas áreas de Mata Atlântica, a saber, localizadas na Serra do Mar, município de Cubatão, SP, visando o levantamento de fungos microscópicos. Em área do Vale do Rio Moji, cuja vegetação foi severamente afetada por material particulado, fluoretos, compostos nitrogenados e de enxofre, emitidos por indústrias de fertilizantes, metalúrgicas e de produtos químicos; e em área do Vale do Rio Pilões, localizada a 30 km de distância da primeira e considerada menos afetada pela poluição aérea industrial. Foram obtidos 280 táxons de fungos no total, sendo que através da técnica de placa-de-solo foram isolados 36 táxons de Mucorales (13%), dentre os quais houve quatro citações novas para o Brasil. Os autores concluíram que a diversidade de Mucorales observada em seu estudo foi elevada em comparação a outros estudos realizados em áreas de Mata Atlântica, apesar da poluição ter reconhecidamente desequilibrado os ecossistemas da região estudada.

O primeiro levantamento de Mucorales para o Brasil foi realizado por TRUFEM (1978), no qual foi executado amplo programa de amostragens em cerca de 65 municípios de praticamente todas as regiões do Estado de São Paulo. Foram coletadas 94 amostras de solo, 12 de fezes de mamíferos herbívoros, quatro de serapilheira, duas de folhas e uma de fruto, sendo obtidos 31 táxons de Mucorales em meio de Martin através da técnica da placa-de-solo de WARCUP (1950). As 18 amostras de solo estudadas aqui representaram o total de 54 amostras, porque cada amostra foi composta por três sub-amostras, sendo que a razão entre o número de táxons obtidos (11) e o total de amostras foi 0,204, representando a projeção de 20 táxons 100 amostras<sup>-1</sup>.

A projeção estimativa de 26 táxons 100 amostras<sup>-1</sup>, obtida a partir dos dados de TRUFEM (1978), pode ser considerada a mais completa representação estimativa da população de Mucorales para os solos do Estado de São Paulo, embora tenham sido identificadas algumas limitações impostas pela metodologia de trabalho. Este número é 23,08% superior à projeção estimativa de 20 táxons 100 amostras<sup>-1</sup>, observada aqui para o solo de Sta Gertrudes. Com base nas informações de SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (2006) sobre Mucorales e outros fungos obtidos de regiões de Mata Atlântica afetadas por poluição aérea industrial e na projeção estimativa da população de Mucorales para os solos do Estado, pode-se concluir que a micota tenha sido perturbada do ponto de vista qualitativo e quantitativo, ou seja, houve danos à diversidade de táxons.

De modo geral, a ocorrência de Mucorales ao longo das coletas foi esparsa, com o surgimento de táxons apenas nas amostras de solo da 2ª coleta em diante e havendo pouquíssimos casos de repetição nos isolamentos. Tal comportamento, impossibilitou a aplicação de algum índice comparativo (ex.: índice de Sørensen) que permitisse relacionar os táxons obtidos com as condições em que foram submetidos, tanto em relação à caracterização das amostras de solo das quais originaram, quanto em relação aos meios de cultivo adicionados de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> dos quais foram inicialmente isolados (tabela 3).

Em relação à 2ª coleta, as amostras compostas de solo do local 2 apresentaram (em mg kg<sup>-1</sup>) 0,74 de Cu, 0,82 de Zn, 0,45 de B e 1,19 de Pb, 20,60 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, pH = 6,29 e 13,84% de umidade, surgindo apenas a espécie *Zygorrhynchus moelleri* (SPC 2051) em MA com Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>). *Zygorrhynchus moelleri* é uma espécie cosmopolita considerada das mais comuns da família Mucoraceae, é encontrada quase que exclusivamente em solos, a uma profundidade de até 1 m, nos diversos hábitats e biomas do mundo, inclusive em ambientes afetados por poluição orgânica, tem preferência pela faixa ácida de pH (3,9-6,5), mas *in vitro* pode desenvolver-se em pH entre 3,1-8,8, o crescimento ótimo ocorre a 25°C e o máximo a 32°C, utiliza como fontes de carbono o glicerol, acetato, D-glicose, D-frutose, D-manose, D-xylose, arabinose, decompõe pectina e hemicelulose, mas não utiliza lactose, amido ou celulose (DOMSCH *et al.*, 1993).

As amostras do local 4 (2ª coleta) apresentaram (mg kg<sup>-1</sup>) 9,84 de Cu, 23,80 de Zn, 17,16 de B e 206,80 de Pb, 48,20 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, pH = 6,89 e 19,43% de umidade, obtendo-se somente *Absidia cylindrospora v. cylindrospora* (SPC 2031) em MA com Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>). *Absidia cylindrospora v. cylindrospora* é a espécie mais

comum de *Absidia* entre as que apresentam esporos cilíndricos, possui ampla distribuição mundial, ocorre em vários tipos de solo numa profundidade que pode chegar 1 m, tolera ampla faixa de pH e elevada salinidade, 25°C é a temperatura ótima de crescimento e a máxima é 30°C, possui atividade amilolítica, proteolítica, assimilação de sorbose, sacarose, rafinose, inulina, produção de fenol oxidase, utilização de lignosulfonato, ácido húmico, ácido fúlvico e é capaz de metabolizar *in vitro* o herbicida linuron ao subproduto 3,4-diclorofenil-1-metoxiuréia (DOMSCH *et al.*, 1993).

Dentre 47 linhagens de fungos isolados de solo contaminado com fluoreno, um hidrocarboneto policíclico aromático, *A. cylindrospora* foi a mais efetiva na biodegradação do poluente, alcançando 98% de eficiência (GARON *et al.*, 2004). De acordo com os estudos de STROO *et al.* (1986), foi provado que *A. cylindrospora* Hagem é capaz de promover a nitrificação em ambientes de solo ácido, sob condições de pH entre 4 e 5 que normalmente são limitantes às bactérias nitrificadoras autotróficas, pois foi capaz de produzir nitrito na presença de amônio e acetato, ou nitrito e nitrato utilizando-se de  $\beta$ -alanina como única fonte de C e N. As bactérias quimilitotróficas, que promovem a nitrificação de amônio no solo, tais como: *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrobacter winogradskyi* e *Nitrobacter agilis*, no geral, toleram a faixa de pH entre 5,7 a 10,2 (VICTORIA *et al.*, 1992).

As amostras do local 5 (2ª coleta) tiveram 2,02 de Cu, 5,14 de Zn, 1,34 de B e 3,56 de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), 39,60  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria orgânica, pH = 6,01 e 12,46% de umidade, surgindo novamente *A. cylindrospora v. cylindrospora* (SPC 2030) em MA com  $\text{Zn(NO}_3)_2$  (200  $\text{mg L}^{-1}$ ) e os táxons *Cunninghamella phaeospora* (SPC 2032) em MA com  $\text{Zn(NO}_3)_2$  (100  $\text{mg L}^{-1}$ ) e *Mucor circinelloides f. janssenii* (SPC 2036) em MA com  $\text{Pb(NO}_3)_2$  (100  $\text{mg L}^{-1}$ ).

As espécies de *Cunninghamella* são principalmente encontradas nas regiões do Mediterrâneo e zonas subtropicais, raramente são isoladas de regiões temperadas (DOMSCH *et al.*, 1993). A maioria das linhagens de *C. phaeospora* estudadas por ZHENG & CHEN (2001) foi isolada de diversas amostras brasileiras de castanhas do Pará enviadas aos EUA, possivelmente como produto de exportação; de amostras de solo do Brasil, da Indonésia, do Zaire, da China e de Hong Kong; ou da planta *Myrmecodia* sp. de Papua Nova Guiné.

*Mucor circinelloides f. janssenii* (CBS 232.29) foi utilizado em um processo de patente industrial desenvolvido para a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA) a partir da

biodegradação de um efluente da indústria química, que continha aproximadamente 1-3% de ácidos monocarboxílicos, cetonas e aldeídos, sendo capaz de produzir 24,32 mg de GLA g<sup>-1</sup> de biomassa após 44 h de cultivo (BOTHÁ & KOCK, 1995).

Na 3ª coleta, a amostra de solo do local 1 exibiu 0,50 de Cu, 4,48 de Zn, 0,68 de B e 0,68 de Pb (mg kg<sup>-1</sup>), 12,00 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, pH = 6,50 e 18,42% de umidade, surgindo cinco linhagens de *Mucor hiemalis* f. *luteus*: SPC 2042 em MA com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>); SPC 2043, SPC 2044 e SPC 2045 em MA com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (200 mg L<sup>-1</sup>); e SPC 2046 em MA com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (500 mg L<sup>-1</sup>). Na amostra do local 2, caracterizada por 1,04 de Cu, 1,44 de Zn, 1,21 de B e 2,09 de Pb (mg kg<sup>-1</sup>), 22,40 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, pH = 6,52 e 17,60% de umidade; e do local 5, com 1,98 de Cu, 6,74 de Zn, 3,15 de B e 3,48 de Pb (mg kg<sup>-1</sup>), 43,00 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, pH = 6,91 e 8,22% de umidade, surgiu o táxon *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. Em relação às linhagens do local 2, SPC 2037 e SPC 2038, foram isoladas em MA sem metais e MA com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (200 mg L<sup>-1</sup>), respectivamente. A linhagem do local 5 (SPC 2039) foi isolada em MA com Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>).

*Mucor hiemalis* f. *hiemalis* é um dos mais comuns fungos de solo e dos mais freqüentes dentro da ordem Mucorales, possui distribuição mundial desde as regiões árticas e alpinas até os trópicos, apresenta crescimento rápido, ocorre nos mais variados tipos de solo, em ambientes preservados e poluídos, em contato com diversos tipos de vegetação e substratos orgânicos, pode ser encontrado no solo a até 1 m de profundidade, ocorre com a mesma freqüência em solos de desertos quanto em solos de várzeas úmidas, cresce e esporula entre 5-25°C (ótimo entre 15-25°C), não cresce a 30°C, tolera ampla faixa de pH (*in vitro* entre 2,5-8,8), cresce numa atmosfera CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> (18:1), utiliza pectina ou uréia como única fonte de C, decompõe hemicelulose, amido e quitina, não utiliza nitrato, apresenta atividade de proteinase, fosfatase e aminoácido oxidase, produz β-caroteno, o alcalóide ergosina, etileno, etanol, os ácidos acético, pirúvico, 2-oxoglutárico e acumula o herbicida paraquate no micélio (DOMSCH *et al.*, 1993).

Na 4ª coleta, a amostra de solo do local 1 teve 0,36 de Cu, 3,00 de Zn, 2,86 de B e 1,00 de Pb (mg kg<sup>-1</sup>), 10,30 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, pH = 6,35 e 8,94% de umidade. Foram isolados os táxons: *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (SPC 2040) em MA com Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>), *Mucor hiemalis* f. *luteus* (SPC 2047) em MA com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>), *Mucor bainieri* (SPC 2033) em MA com Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (200 mg L<sup>-1</sup>), *Mucor racemosus* f.

*racemosus* (SPC 2048) em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *Rhizopus oryzae* (SPC 2049 e SPC 2050) em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Não há muita informação disponível na literatura acerca de *Mucor bainieri*, tanto em termos de sua distribuição mundial, quanto no que tange os aspectos ecológicos e a possibilidade de aplicação biotecnológica, de maneira que a espécie pode ser considerada relativamente pouco freqüente, quando comparada a *M. hiemalis*, *M. circinelloides* e *M. racemosus*. Em relação ao potencial biotecnológico, *M. bainieri* (CBS 293.63) produziu  $27,67 \text{ mg de GLA g}^{-1}$  de biomassa após 44 h de cultivo, no mesmo processo de patente industrial em que foram estudadas outras espécies de Mucorales (BOTHÁ & KOCK, 1995).

*Mucor racemosus* f. *racemosus* foi uma das primeiras espécies de fungos de solo descobertas, tendo sido isolada em 1886, é uma das mais comuns espécies do gênero, especialmente na Europa central, apresenta distribuição mundial, tem sido isolada de solos com pH de 4,4 a 8,0 e cultivada em pH de 2,0-8,5, pode ser encontrada geralmente no solo a até 40 cm de profundidade (excepcionalmente a até 1 m), a adubação com NPK ou esterco aumenta fortemente a freqüência de isolamento deste fungo, mas a aplicação de fungicidas de solo reduz, cresce e esporula entre  $5\text{-}30^\circ\text{C}$  (ótimo entre  $22\text{-}25^\circ\text{C}$ ), não cresce a  $37^\circ\text{C}$ , decompõe pectina rapidamente, hemicelulose, aparentemente utiliza carboximetilcelulose, têm sido demonstradas atividades de proteinase, lipase e polifenoloxidase, utiliza os herbicidas simazina e atrazina como única fonte de N, oxida triptamina ao ácido indol-3-acético e o herbicida fenilamida, promove a hidroxilação do inseticida carbaryl, produz os ácidos pirúvico, 2-oxoglutárico, glucorônico, cítrico e succínico, além de fucose, manose e galactose (DOMSCH *et al.*, 1993).

*Rhizopus oryzae* é primariamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, em ampla variedade de solos (freqüentemente com pH de 6,3 a 7,2 ou superiores) e diversos substratos orgânicos, cresce em temperaturas entre  $15\text{-}45^\circ\text{C}$  (ótimo aproximadamente  $34^\circ\text{C}$ ), pode crescer numa atmosfera  $\text{CO}_2:\text{O}_2$  (18:1), sintetiza o ácido indol-3-acético utilizando triptofano como precursor, utiliza fontes minerais de N (exceto nitrato) e uréia, possui propriedades proteolíticas, fermenta D-glicose, utiliza amido e frutose, utiliza celobiose como única fonte de C, produz poligalacturonase e enzimas coagulantes do leite, álcool desidrogenase, lipases, fenol oxidases, promove transformações de esteróis, degrada as aflatoxinas  $A_1$  e  $G_1$ , o inseticida difonato, metaboliza o herbicida fenilamida e o fungicida carboxina, produz o alcalóide agroclavina

(tóxico ao homem, ovinos e bovinos), é agente causal de mucormicoses em animais (inclusive homem) e exibe atividade antibiótica a algumas bactérias (DOMSCH *et al.*, 1993).

No solo do local 3 (4ª coleta) foram detectados 7,40 de Cu, 29,20 de Zn, 53,75 de B e 193,92 de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), 44,70  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria orgânica,  $\text{pH} = 7,84$  e 7,83% de umidade, aparecendo novamente *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (SPC 2041) em MA com  $\text{Pb(NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Na amostra do local 5 foram detectados 2,06 de Cu, 5,92 de Zn, 2,56 de B e 5,79 de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), 48,20  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria orgânica,  $\text{pH} = 6,64$  e 4,17% de umidade, surgindo *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* (SPC 2034) em MA com  $\text{Pb(NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* (SPC 2035) em MA com  $\text{Pb(NO}_3)_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ).

*Mucor circinelloides* f. *circinelloides* é encontrado nas mais diferentes zonas climáticas do mundo, incluindo solos de áreas permanentemente congeladas do Alaska e Canadá, tem sido isolado em diversos tipos de solos e vegetações, esterco de animais (inclusive animais árticos), em produtos de compostagem, no ar e na água de rios, cresce e esporula entre 5-30°C, degrada amido e proteínas, pode utilizar ácido tânico, produz lipídios e lipases, metaboliza DDT, tolera 3-10% de sacarose, até 15% de NaCl no meio e assume a forma leveduriforme em condições de anaerobiose (DOMSCH *et al.*, 1993).

No relato referente ao processo de patente industrial citado para outras espécies de Mucorales, *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* (CBS 203.28), também tratado no estudo como *M. javanicus*, foi capaz de produzir 36,72  $\text{mg GLA g}^{-1}$  de biomassa após 44 h de cultivo, enquanto que *M. circinelloides* f. *lusitanicus* produziu 30,62  $\text{mg GLA g}^{-1}$  de biomassa (BOTHÁ & KOCK, 1995). A plasticidade de *M. circinelloides* (ATCC 1216B) quanto à capacidade de transição entre as formas filamentosa e leveduriforme e seu significado para o ciclo de vida da espécie, tem sido estudados tendo-se em vista a aplicação deste fungo em processos fermentativos industriais como a produção de enzimas degradativas e de metabólitos primários (LÜBBEHÜSEN *et al.*, 2003).

Em estudo que visou o isolamento de novos microrganismos produtores de lacases, *Mucor circinelloides* apresentou de acordo com a linhagem estudada as seguintes reações positivas de degradação: 1) RBBR, Poli R-478 e Guaiacol, 2) Guaiacol e ácido tânico e 3) Poli R-478 e Guaiacol, enquanto que *M. hiemalis* f. *corticulus* e *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* foram capazes de degradar RBBR, Poli R-478 e Guaiacol, mas não o ácido tânico (KIISKINEN *et al.*, 2004). Este relato constituiu-se no primeiro em que

linhagens de Mucorales dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus* foram detectadas como produtoras de enzimas ligninolíticas.

A despeito da falta de duas das amostras de solo referentes aos locais 1 e 5 (1ª coleta), estes locais foram os que apresentaram a maior diversidade de táxons, na seguinte ordem decrescente: local 5 = local 1 > local 2 > locais 3 e 4. No local 5 foram obtidos seis táxons, com exclusividade para *Cunninghamella phaeospora*, *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*, *M. circinelloides* f. *lusitanicus* e *M. circinelloides* f. *janssenii*; no local 1 foram obtidos cinco táxons, com exclusividade para *Mucor bainieri*, *M. hiemalis* f. *luteus*, *M. racemosus* f. *racemosus* e *Rhizopus oryzae*; no local 2 foram obtidos dois táxons, exclusividade para *Zygorrhynchus moelleri*; em cada um dos locais 3 e 4 foi obtido um táxon sem exclusividade.

Considerando-se todas as coletas, foi observada a seguinte ordem decrescente em relação à concentração média de elementos químicos (Cu, Zn, B e Pb) no solo: local 3 > local 4 > local 2 > local 5 > local 1; e em relação ao teor médio de matéria orgânica a ordem foi a seguinte: local 5 (4,36%) > local 4 (3,36%) > locais 2 e 3 (2,62%) > local 1 (1,09%).

Deste modo, o local 5 pode ser considerado como o local controle em relação aos demais locais, por estar fora da área contaminada sob influência direta das indústrias, ter apresentado os mais elevados teores de matéria orgânica, a maior diversidade de táxons e, juntamente com o local 1, os menores teores dos elementos químicos analisados, abaixo do valor de referência de qualidade (VRQ) indicado por CETESB (2005). Entretanto, por estar localizado em jardim público, o local 5 certamente pode sofrer influência da poluição urbana.

Pode-se supor que as concentrações mais elevadas de elementos químicos, detectadas nos locais 2, 3 e 4, tenham sido responsáveis por menor diversidade de fungos obtidos das amostras de solo destes locais. Contudo, a concentração total de elementos químicos no solo não é o principal fator determinante da biodisponibilidade dos elementos, que dependerá da solubilidade das formas ou espécies químicas dos elementos presentes no ambiente (TRAINA & LAPERCHE, 1999).

Os solos contaminados com metais muitas vezes apresentam distribuição espacial heterogênea em relação às concentrações de metais e de nutrientes disponíveis (FOMINA *et al.*, 2005). CARDOSO (1992) complementa que o solo deve ser visto como um hábitat composto por inúmeros microsítios ou microhábitats microbianos, que possuem entre si



elevada disparidade em relação às condições edafoclimáticas, de matéria orgânica, de trocas gasosas, dentre outros fatores, que tornam difícil e problemática a obtenção de informações precisas acerca das comunidades microbianas presentes.

De maneira geral, os teores de poluição nas camadas superiores de solo dos locais estudados em Sta. Gertrudes, das quais as linhagens de fungos foram isoladas, não foram tão severos e não parecem ter influenciado tão negativamente a ocorrência de Mucorales. O grande problema de elevadíssimos índices de poluição por metais pesados e outros elementos encontra-se nas camadas inferiores de solo da região (BONACIN SILVA, 2001), quadro que pode ser definido como um verdadeiro mosaico no que se refere à enorme variedade na amplitude de concentrações observadas.

Se houve de fato prejuízo à sobrevivência dos fungos, não se pode afirmar com toda a certeza que a poluição do solo, ou apenas este fator isoladamente, tenha causado distúrbios significativos na população de Mucorales durante a época analisada, uma vez que o solo da área estudada passou por um histórico de freqüentes e diferentes despejos de resíduos industriais contendo metais pesados, porém variados em intensidade espacial e temporal. Outra causa importante, certamente, foi a intensa mobilização de massa de solo não só devido aos constantes aterramentos elaborados com máquinas, mas também de modo gradual e cumulativo devido ao efeito de alterações geológicas sofridas na região. Por motivo da configuração topográfica, do intenso escoamento superficial e de falta de ações conservacionistas efetivas tais como o reflorestamento, foram detectados efeitos como: aceleração de processos de dinâmica superficial, principalmente erosão, transporte, sedimentação e assoreamento, que se somam à poluição (BONACIN SILVA, 2001). Estes mecanismos de dinâmica superficial podem carrear a matéria orgânica do solo e causar sua depleção, diminuindo as condições favoráveis à sobrevivência da microbiota em detrimento da fertilidade do solo e, conseqüentemente, causar diminuição na capacidade de fixação das plantas.

O meio MA não foi adicionado de antibióticos para tentar restringir o aparecimento de bactérias e leveduras, mas preparado com  $Pb(NO_3)_2$  e  $Zn(NO_3)_2$  ou sem estes metais (controles). Foi justamente nos meios de cultivo com metais em que surgiram a grande maioria das linhagens de Mucorales. Em relação ao Pb, surgiram oito linhagens no meio com  $100\text{ mg L}^{-1}$  e quatro linhagens no meio com  $200\text{ mg L}^{-1}$ . No caso do Zn a situação foi praticamente inversa, surgindo cinco linhagens no meio com  $200\text{ mg L}^{-1}$ , três linhagens no meio com  $100\text{ mg L}^{-1}$  e uma linhagem no meio com  $500\text{ mg L}^{-1}$ . No meio de cultura sem

metais foi obtida apenas uma linhagem e no MA com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de Pb ou Zn nenhuma linhagem surgiu.

Inesperadamente, nos meios adicionados de Pb foram observadas a maior variedade e quantidade de linhagens, sendo 12 do total de 22 linhagens obtidas (tabela 3). Provavelmente, isto se deve ao fato que o Zn tem função biológica conhecida, agindo como parte essencial de diversas enzimas (KUSHNER, 1993; GADD, 1993) e sua presença até determinada concentração no meio de cultivo com relativamente elevado teor de carbono teria acirrado ainda mais a competição microbiana. Enquanto que o Pb teria eliminado muitos competidores devido à sua elevada toxidez reconhecida, favorecendo a sobrevivência dos menos sensíveis.

Os fungos podem suportar a presença de metais pesados no ambiente por tolerância e/ou resistência, de modo que a tolerância pode ser interpretada como a habilidade de sobrevivência por intermédio de propriedades intrínsecas e/ou modificação da toxidez ambiental (ex.: espécies que possuem parede celular com pigmentos impermeáveis a metais, excreção de polissacarídeos ou metabólitos que fixam ou precipitam metais), enquanto que a resistência pode ser definida como a capacidade de sobrevivência por intermédio de mecanismos de resposta direta à espécie metálica envolvida, ex.: síntese de metalotioninas e de peptídios  $\gamma$ -glutamyl (GADD 1993; WAINWRIGHT & GADD, 1997).

Num estudo com *Mucor racemosus* Fresen., houve produção de cisteína, glutatona e outros compostos ricos em SH quando o fungo foi cultivado em meio de cultura adicionado de 100  $\mu$ M Cd (MIERSCH *et al.*, 2001). A glutatona pode fixar metais pesados em células microbianas e é precursora de fitoquelatinas, peptídeos de baixo peso molecular encontrados em plantas e fungos que atuam na proteção das células em relação aos metais pesados (MIERSCH *et al.*, 2001).

De acordo com WAINWRIGHT & GADD (1997), para que haja uma visão mais realística dos efeitos de poluentes em relação ao crescimento fúngico, podem ser utilizados meios de cultivo contendo baixas concentrações de carbono disponível. GADD *et al.* (2001) sugeriram que sob condições de baixo teor de nutrientes, os processos pelos quais os fungos toleram e/ou resistem à presença de metais pesados não funcionariam, ocasionando aumento da toxidez de metais. Houve aumento considerável no crescimento radial de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo oligotrófico adicionado de 0,1 mM de Zn e glicose nas concentrações de 0,5, 1, 5 ou 10%, quando comparado ao crescimento observado em meio de cultivo com o metal mas sem adição de glicose. Esta tendência

também foi observada em relação ao Cu e ao Cd para este mesmo fungo e para *Trichoderma viride* Pers. (GADD *et al.*, 2001).

Com base nos resultados obtidos e nas informações mencionadas na literatura, foram formuladas algumas hipóteses básicas a fim de interpretar o provável comportamento das linhagens em relação à metodologia de isolamento utilizada:

1) O meio de cultivo promoveu seleção positiva das linhagens de Mucorales, que toleraram e/ou resistiram à presença de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  principalmente nas concentrações de 100 e 200  $\text{mg L}^{-1}$ , promovendo ao mesmo tempo seleção negativa em relação a outros microrganismos antagônicos como as bactérias e as leveduras.

2) O meio de cultivo promoveu seleção positiva das linhagens de Mucorales, que apresentaram algum tipo de adaptação de dependência em relação ao  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e ao  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  nas concentrações de 100 e 200  $\text{mg L}^{-1}$ , que explicaria a quase ausência nos meios de cultivo sem adição de metais e com adição de 500  $\text{mg L}^{-1}$  e a completa ausência no meio adicionado de 1.000  $\text{mg L}^{-1}$ .

3) Devido aos Mucorales apresentarem estratégias ecológicas que capacitam sua sobrevivência em ambientes sujeitos a estresses, as linhagens obtidas puderam ser prontamente isoladas em malte agar rico em carbono, mesmo sofrendo forte competição com outros microrganismos e tolerando certas concentrações de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ou de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ .

Pode ser que as hipóteses 1 e 2 não sejam excludentes entre si e que haja realmente complementaridade entre ambas. Entretanto, com base nos resultados obtidos em relação à tendência das linhagens nas diferentes condições de isolamento e nas informações disponíveis na literatura sobre fungos e metais pesados, a hipótese 1 parece ser a mais plausível e aceitável, sendo complementada pela hipótese 3.

Deste modo, a quase ausência de linhagens no meio de cultivo sem metais pode ser atribuída à intensa competição oferecida por outros microrganismos tais como bactérias, leveduras e outros fungos filamentosos, uma vez que não houve acréscimo de antibióticos aos meios de cultivo. Em adição, nos meios de cultivo adicionados de elevadas concentrações de metais (ex.: 1.000  $\text{mg L}^{-1}$ ) não houve isolamento de linhagens, de maneira que as linhagens obtidas podem ser consideradas tolerantes às condições que lhes foram impostas pela técnica de isolamento, no que se refere ao meio de cultivo com 100 e 200  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ .

No que diz respeito às características das amostras de solo, concentrações de elementos químicos analisados, teor de MO e pH, torna-se pouco produtiva a elaboração

de hipóteses no sentido de tentar interpretar o comportamento de ocorrência das linhagens de Mucorales no solo de Sta. Gertrudes, devido às características multivariadas do comportamento dos fungos em relação aos diversos fatores bióticos e abióticos do ambiente.

Embora a poluição por metais pesados possa afetar tanto qualitativamente quanto quantitativamente a comunidade microbiana, é difícil distinguir os efeitos causados por metais daqueles causados por outros componentes ambientais, ou seja, a influência ambiental na toxidez dos metais, bem como a natureza dos mecanismos de tolerância e/ou resistência microbiana envolvidos (FOMINA *et al.*, 2005). GADD (1993) utilizou-se da figura de um triângulo equilátero cujos vértices foram representados por ambiente, metais e fungos, ligados entre si por setas de via dupla, para representar a intensa interação destes três componentes.

A coleção de fungos obtida do solo de Sta. Gertrudes foi composta por espécies comumente encontradas em solos brasileiros, salvo a espécie *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal, que em consideração aos levantamentos anteriores de fungos de solo em que os Mucorales foram alvo de estudo, pode ser vista como relativamente rara.

No contexto ambiental estudado aqui e em outros estudos com Mucorales provenientes de solos poluídos com metais pesados, tais como a encosta da Serra do Mar em Cubatão, SP (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006) e a represa do Guarapiranga em São Paulo, SP (SILVA, 2002), além de estudos em diversos ambientes cujo solo não foi submetido a este tipo de impacto ambiental (TRUFEM, 1978; TRUFEM, 1981a; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 1996; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ, 1997; RUEGGER *et al.*, 2002; TAUKE-TORNISIELO *et al.*, 2005), a espécie *Mucor hiemalis* Wehmer e suas formas podem ser consideradas como modelos representativos para o estudo de Mucorales de solo. No Brasil e talvez em outros países tropicais, estes sejam os táxons de Mucorales encontrados com maior frequência em solos, tirando-se por base os muitos relatos em que foram citados. *Mucor racemosus* Fresen. f. *racemosus* e *Mucor hiemalis* Wehmer f. *hiemalis* são os táxons mais comuns do gênero, porém o primeiro táxon é considerado o mais frequente na Europa Central (DOMSCH *et al.*, 1993).

## 5.2. Descrição Taxonômica

Os táxons de fungos da ordem Mucorales encontrados no solo do pólo cerâmico de Sta. Gertrudes e adjacências são descritos e comentados em ordem alfabética, a seguir. Preliminarmente, apresentam-se descrições das principais características dos gêneros aos quais os táxons pertencem. As linhagens representantes de cada táxon foram preservadas pelo método de Castellani (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 1994), em tubos de ensaio inclinados, liofilizadas e depositadas no acervo da Coleção de Culturas de Fungos do Instituto de Botânica, no qual receberam a sigla da coleção “SPC”, seguida de numeração conforme a ordem de registro.

### 5.2.1. Gênero *Absidia* van Tieghem

O gênero *Absidia* foi descrito por van Tieghem em 1876 e tem como principais características: micélio desenvolvido na forma de estolões arqueados que possuem rizóides na parte que contacta o substrato e esporangióforos verticilados em maior ou menor grau na parte aérea; esporângios globosos ou piriformes com apófises em forma de funil; maioria das espécies heterotálicas (DOMSCH *et al.*, 1993). A espécie tipo é *Absidia repens* van Tieghem (HESSELTINE & ELLIS, 1964).

Segundo HESSELTINE & ELLIS (1964), por causa da presença de estolões, rizóides, apófises e o micélio aéreo de crescimento indefinido o gênero *Absidia* van Tieghem é proximamente relacionado ao gênero *Rhizopus* Ehrenberg. Entretanto, em *Absidia* os esporangióforos surgem ao longo dos estolões no micélio aéreo de modo que não são opostos aos rizóides, o que não acontece em *Rhizopus*, no qual os esporangióforos caracteristicamente são ligados ao substrato através de rizóides, embora também ocorram esporangióforos no micélio aéreo. Outras diferenças são a parede esporangial difluente e os esporangiósoros relativamente menores e sem estriações de *Absidia*, quando comparados à parede esporangial persistente e aos esporangiósoros estriados de *Rhizopus* (HESSELTINE & ELLIS, 1964).

De acordo com ALEXOPOULOS *et al.* (1996), o gênero *Absidia* pertence atualmente à família Absidiaceae, criada para abrigar dez gêneros de zigomicetos que antes pertenciam à família Mucoraceae mas que se distinguem dos típicos representantes desta

família por produzirem esporângios apofisados com paredes difluentes ou persistentes, micélio com estolões e rizóides, em muitos casos, e zigospórangios com células suspensórias opostas. Através de diferenças encontradas na morfologia dos zigospórangios foram criados dois subgêneros de *Absidia*: o subgênero *Mycocladus* para as espécies cujas células suspensórias dos zigospórangios são desprovidas de apêndices e, o subgênero *Absidia*, para as espécies que contém apêndices nas células suspensórias (HESSELTINE & ELLIS, 1964).

Dentre outras características, as espécies de *Absidia* podem ser distinguidas de acordo com a morfologia dos esporangiósoros, de modo que as principais formas são as cilíndricas, globosas, ovóides e cuneiformes (HESSELTINE & ELLIS, 1964). As cinco espécies mais comuns de *Absidia* no solo são *A. coerulea* Bainier, *A. corymbifera* (Cohn) Sacc. & Trotter, *A. cylindrospora* Hagem var. *cylindrospora*, *A. glauca* Hagem e *A. spinosa* Lendner (DOMSCH *et al.*, 1993).

Os mais importantes estudos taxonômicos de referência para o gênero *Absidia* van Tieghem são: HESSELTINE & ELLIS (1961), no qual foram publicadas uma nova espécie (*A. pseudocylindrospora* Hesseltnine & Ellis) e uma nova variedade (*A. cylindrospora* var. *rhizomorpha* Hesseltnine & Ellis); HESSELTINE & ELLIS (1964), que traz descrições detalhadas e uma chave de identificação para as espécies com esporangiósoros cilíndricos; ELLIS & HESSELTINE (1965), com descrições e chave de identificação para as espécies com esporangiósoros globosos; HESSELTINE & ELLIS (1966) e HESSELTINE *et al.* (1990), com descrições e chave de identificação para as espécies com esporangiósoros ovóides e cuneiformes; ELLIS & HESSELTINE (1966), para as espécies com esporangiósoros ovóides que podem ser patogênicas para animais, inclusive o homem (ex.: *A. ramosa* e *A. corymbifera*).

SCHIPPER (1990), que reuniu as informações dos autores supracitados e de demais autores numa chave de identificação para o gênero, adicionando novas informações de seus estudos sobre a coloração das colônias, requerimentos de temperatura e resultados de cruzamentos, considerando os subgêneros *Mycocladus* e *Absidia*, e subdividindo o subgênero *Absidia* nos grupos A, B, C, D, E e F. Novos táxons foram adicionados ao gênero por HESSELTINE *et al.* (1990) e CHEN & ZHENG (1998).

*Absidia cylindrospora* Hagem var. *cylindrospora*, Mycologia 56: 591. 1964.

Registro das linhagens: SPC 2030, solo da 2ª coleta (18/03/2003), local 5, em MA com  $Zn(NO_3)_2$  (200 mg L<sup>-1</sup>); SPC 2031, solo da 2ª coleta, local 4, em MA com  $Pb(NO_3)_2$  (100 mg L<sup>-1</sup>). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 6 e 7.

Colônia com 5 dias em SMA, verso branco levemente acinzentado, castanho com 25-30 dias, e reverso em roseta, bege claro leitoso, 76 x 75 mm de área e 15 mm de altura; esporangióforos de coloração castanho claro, bege clara, ou hialina levemente esverdeada (pequenos), verticilados em arranjos de 2, 3 ou 4 (5), ou isolados, dispostos em estolões, 50-363,5 µm de comprimento, 2,5-8,2 µm de largura basal e 2,2-5,5 µm de largura apical, septados abaixo da apófise numa distância que geralmente não ultrapassa o comprimento apófise-esporângio; esporângios esféricos no ápice, afunilados na base, apofisados, com parede difluente lisa, verdes-oliva claros a castanhos, 12,5-30,2 x 13,8-32,5 µm; columelas com ou sem projeções eretas e delgadas de 1,2-6,2 µm e ápice às vezes levemente inflado, resquícius de parede esporangial presentes ou não na região entre a columela e a apófise, verdes-oliva claras a tom bege claro, 6,2-20 x 10-22,5 µm; esporangiósporos cilíndricos com extremidades arredondadas, verdes claros, 3,5-5,7 x 2,2-3,2 µm; clamidósporos apicais ou isolados, pouco abundantes, 4,5-17,5 x 4,5-10,5 µm; gotículas verdes-oliva no micélio submerso; zigospórangios e azigospórangios não observados.

*Absidia cylindrospora* Hagem pode ser separada em três variedades: *A. cylindrospora* Hagem var. *cylindrospora* (variedade típica), *A. cylindrospora* Hagem var. *nigra* Hesseltine & Ellis e *A. cylindrospora* Hagem var. *rhizomorpha* Hesseltine & Ellis, de modo que *A. cylindrospora* var. *nigra* difere de *A. cylindrospora* típica por não reagirem entre si em testes de cruzamento (HESSELTINE & ELLIS, 1964). Enquanto que *A. cylindrospora* var. *rhizomorpha* difere de *A. cylindrospora* típica por apresentar crescimento com hifas semelhantes a rizomorfas, excelente crescimento em meio de Czapek Agar, bom crescimento a 37°C e reação de cruzamento negativa entre ambas (HESSELTINE & ELLIS, 1961).

*Absidia pseudocylindrospora* Hesseltine & Ellis é uma espécie relacionada a *Absidia cylindrospora* Hagem, porém difere desta por apresentar: ótimo crescimento em

Czapek Agar, algum crescimento e considerável esporulação a 37°C em SMA, quando comparada ao crescimento em SMA a 25°C, colônias de coloração muito mais escura, esporangióforos mais curtos, em número acima de quatro nos verticilos e produção de zigospórângios não detectada no cruzamento entre ambas (HESSELTINE & ELLIS, 1961). No entanto, o cruzamento entre *A. cylindrospora* var. *nigra* e *A. pseudocylindrospora* produziu alguns zigospórângios, o que não aconteceu entre *A. cylindrospora* var. *nigra* e *A. cylindrospora* típica (HESSELTINE & ELLIS, 1964).

Para auxiliar na identificação da espécie, a linhagem SPC 2030 foi submetida à incubação sob diferentes condições de temperatura (SCHIPPER, 1990). Quando cultivada a 30°C por 5 dias, o crescimento radial foi afetado, desenvolvendo-se colônias com 61 x 56 mm de área, 15 mm de altura, verso branco levemente acinzentado a castanho claro oliváceo, reverso branco levemente amarelado a bege claro acinzentado, crescimento em roseta e esporulação normal. Após cultivo a 36°C por 7 dias, não houve crescimento, ocorrendo apenas o desenvolvimento de micélio branco de 2-3 mm em torno do inóculo. As mesmas placas foram novamente incubadas a 25°C por 9 dias e exibiram crescimento de 73 x 68 mm de área e 15 mm de altura, com coloração do verso castanho e do reverso idêntica ao observado na temperatura de 25°C, praticamente restabelecendo o padrão de crescimento normal. De acordo com os resultados dos testes, a temperatura de 25°C foi considerada ideal ao desenvolvimento da linhagem, enquanto que a temperatura de 36°C foi considerada altamente limitante.

SCHIPPER (1990) classificou *A. cylindrospora* var. *cylindrospora*, *A. cylindrospora* var. *nigra* e *A. cylindrospora* var. *rhizomorpha* no subgênero *Absidia* grupo B, sendo estes táxons caracterizados por apresentar esporangiósporos cilíndricos de extremidades arredondadas, esporangióforos em verticilos, crescimento nulo ou negligenciável a 36°C e crescimento e esporulação entre 15-30°C. *A. cylindrospora* var. *cylindrospora* e *A. cylindrospora* var. *nigra* podem ser diferenciadas através da incubação em extrato de malte a 25°C. Nestas condições a primeira variedade apresenta colônias de coloração castanha-clara esverdeada e a segunda, colônias castanho-escuras esverdeadas (SCHIPPER, 1990).

A linhagem SPC 2030 foi submetida a este teste, sendo cultivada em MA (2%) a 25°C por 5 dias e exibiu colônias castanho-claras, indicativas da variedade *cylindrospora*. O cultivo de *A. cylindrospora* SPC 2031 por 5 dias em SMA a 30°C produziu colônias com 58,5 x 50 mm de área, 15 mm de altura, verso branco acinzentado (areia), reverso bege



claro e esporulação normal. A exemplo do que houve com a linhagem SPC 2030, o cultivo em SMA a 36°C por 5 dias não produziu colônias e, em meio MA (2%) a 25°C por 5 dias, surgiram colônias de coloração castanha clara.

*Absidia cylindrospora* Hagem tem sido comumente isolada de diversos substratos em ambientes brasileiros. Em 1919 foi isolada de castanhas do Pará e, posteriormente, de solo de jardim em Niterói, RJ (HESSELTINE & ELLIS 1964); UPADHYAY (1970) a obteve de solo das regiões Nordeste e Norte do Brasil; LIRA (1971) constatou sua presença em solos de áreas florestadas e reflorestadas no Estado do Maranhão; TRUFEM (1978, 1981b) a isolou de amostras de solo de cinco municípios paulistas; ANTUNES *et al.* (1993) e SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1997, 1998) obtiveram-na de amostras de água, solo e folhas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (1996) isolaram-na de amostras de solo coletadas no Instituto de Botânica, VIRIATO (2003) também obteve linhagens de solo do Instituto de Botânica e de fezes de mamíferos herbívoros do Parque Zoológico de São Paulo, ambos inseridos no limites do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP; RIBEIRO *et al.* (2003) encontraram este fungo em amostras de fubá de milho (*Zea mays* L.) utilizadas na alimentação humana e comercializadas na região metropolitana de Recife, PE.

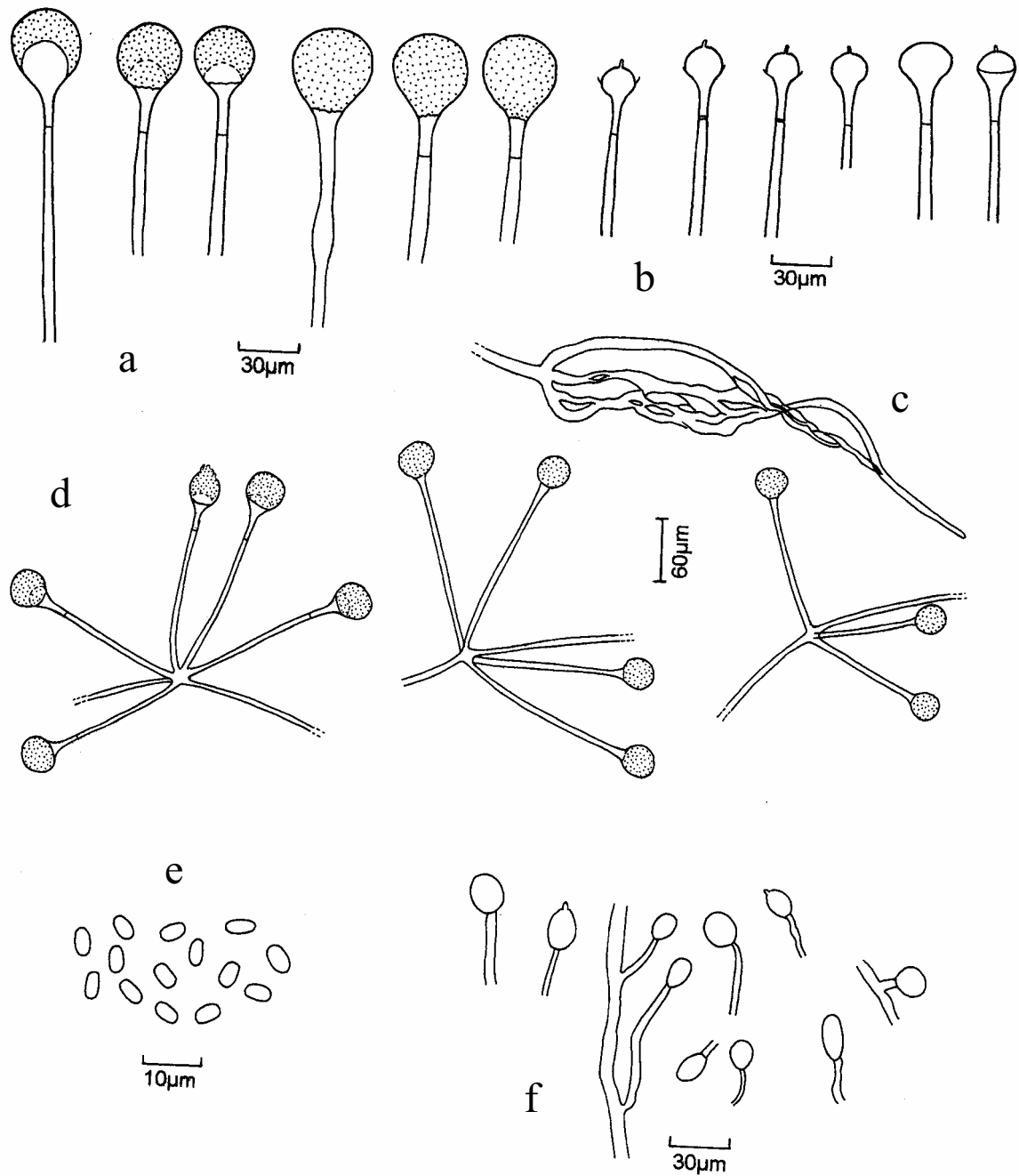


Figura 6. *Absidia cylindrospora* v. *cylindrospora* SPC 2030: a) esporângios; b) columelas; c) rizóide; d) ramificações verticiladas; e) esporangiósoros; f) clamidósporos.

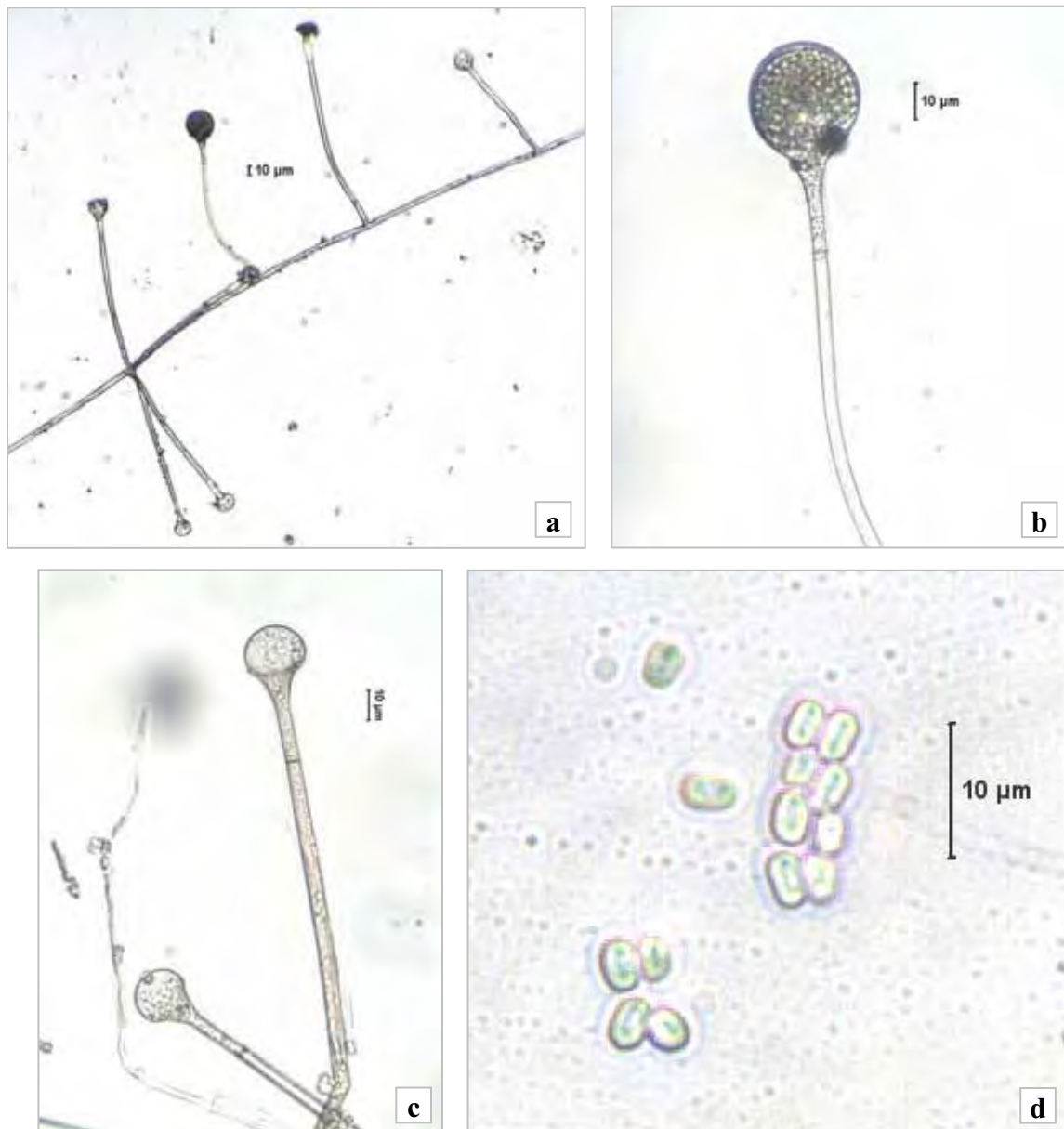


Figura 7. *Absidia cylindrospora* v. *cylindrospora* SPC 2031: a) estolão com ramificações verticiladas e isoladas; b) esporangióforo com esporângio; c) esporangióforos com columelas; d) esporangiósoros.

### 5.2.2. Gênero *Cunninghamella* Matruchot

O gênero *Cunninghamella* foi descrito por Matruchot em 1903, pertence à família monotípica Cunninghamellaceae (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996), é um dos mais comuns gêneros da ordem Mucorales, sendo que seus representantes são normalmente encontrados no solo, em grãos e em outros substratos orgânicos (BAIJAL & MEHROTRA, 1980). Embora, também sejam relatados como agentes causadores de zigomicoses em pacientes portadores de leucemia e linfossarcoma (WEITZMAN & CRIST, 1979; 1980). A espécie tipo é *Cunninghamella echinulata* (Thaxter) Thaxter ex Blakeslee (ZHENG & CHEN, 2001).

As espécies pertencentes ao gênero *Cunninghamella* Matruchot apresentam colônias de crescimento rápido variando do branco ao cinza; esporangióforos com ramificações verticiladas ou cimosas irregulares, que terminam em vesículas globosas ou piriformes das quais surgem esporângios uniesporados globosos a ovais, de paredes equinuladas a lisas; zigosporângios globosos, tuberculados, de coloração marrom escura e com células suspensórias iguais; a maioria das espécies é heterotálica (DOMSCH *et al.*, 1993).

O mais recente e detalhado estudo sobre o gênero *Cunninghamella* Matruchot é a monografia de ZHENG & CHEN (2001), na qual foi elaborada intensiva revisão das espécies conhecidas e propostas novas espécies e variedades com base em características morfológicas, fisiológicas e de seqüências da região ITS de rDNA.

*Cunninghamella phaeospora* Boedijn, Sydowia 12:348. 1958.

Registro da linhagem: SPC 2032, solo da 2ª coleta (18/03/2003), local 5, em MA com Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 8 e 9.

Colônia com 5 dias em SMA, aspecto de algodão úmido, verso branco acinzentado e reverso branco leitoso, em roseta, verso cinza claro e reverso bege acinzentado de aspecto leitoso com 25-30 dias, 84 x 61 mm de área e 16 mm de altura; micélio aéreo abundante, 6,2-22,5 µm de largura; esporóforos verdes-oliva hialinos, septados ou não, em

ramificações monopodiais, dicotômicas ou em estolões (minoria), ramificações verticiladas ausentes, 7,5-13,7  $\mu\text{m}$  de largura e até 90  $\mu\text{m}$  de comprimento; vesículas terminais verdes-oliva hialinas, 17,5-46,2  $\mu\text{m}$  na parte mais larga, pequenas vesículas laterais do micélio aéreo com até 11,2  $\mu\text{m}$  de largura; pedicelos com até 5  $\mu\text{m}$  de comprimento; esporângios uniesporados, quase esféricos ou globosos, raramente limoniformes, verdes-oliva hialinos a castanhos claros, 12,5-18,8 x 12,2-18,2  $\mu\text{m}$ , sem espinhos, ou raramente com espinhos de 1,8-3,6  $\mu\text{m}$  de comprimento; clamidósporos ausentes; rizóides digitiformes ou não; micélio submerso apresentando regiões infladas, com ou sem gotículas verdes-oliva de tamanho variado, terminando em ramificações irregulares na espessura que se afinam em direção às extremidades; zigosporângios e azigosporângios não observados.

Os testes de crescimento da linhagem SPC 2032 em diferentes condições de temperatura foram baseados nas informações de ZHENG & CHEN (2001). Após cultivo a 20 e a 30°C por 5 dias, desenvolveram-se colônias de aspecto úmido, com 77 x 71 mm de área e 15 mm de altura, verso branco, reverso branco levemente amarelado e esporulação normal. A 36° e a 45°C durante 7 dias de incubação não houve crescimento, de modo que as mesmas colônias foram incubadas a 25°C pelo mesmo período e novamente não foram capazes de desenvolver-se. A linhagem neótipo de *C. phaeospora* (IMI 198489; CBS 692.68; NRRL 2842) foi incapaz de crescer a 37°C (LUNN & SHIPTON, 1983).

Numa reavaliação sobre o gênero, BAIJAL & MEHROTRA (1980) apresentaram uma chave de identificação que no 3º passo distribuiu as espécies de *Cunninghamella* em dois grupos: 1º) colônias de coloração branca a pálida na maturidade e 2º) colônias cinzas na maturidade. Conforme as características observadas na linhagem SPC 2032 e as informações da chave para os passos seguintes: presença única de conídios (esporângios) globosos, com até 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, chegou-se ao táxon *Cunninghamella phaeospora* Boedijn. As características da espécie fornecidas por BAIJAL & MEHROTRA (1980) foram complementadas com os dados contidos no estudo de ZHENG & CHEN (2001), sendo que a linhagem SPC 2032 apresentou as principais características mencionadas por estes autores, tais como: colônias de coloração cinza; micélio aéreo abundante; esporóforos escassos, em ramificações monopodiais, dicotômicas, não verticiladas ou pseudo-verticiladas; temperatura máxima de crescimento entre 32-35°C. Além das formas globosas, as linhagens estudadas por ZHENG & CHEN (2001) apresentaram esporângios lacrimóides ou ovóides, o que não aconteceu com a linhagem SPC 2032.

Em relação ao tamanho dos esporângios de *C. phaeospora*, pode-se observar que: BAIJAL & MEHROTRA (1980) encontraram esporângios de 6,6-11 µm de diâmetro e, segundo estes mesmos autores, Boedijn relatou esporângios de 9-15 µm de diâmetro na descrição original da espécie; LUNN & SHIPTON (1983) mencionaram que 2,7% dos isolados analisados em seu estudo apresentaram esporângios de 12,1-16,0 µm de diâmetro; ZHENG & CHEN (2001) observaram esporângios de 5,5-12,5 µm de diâmetro e de 8,5-12,5 x 7-11 µm. Portanto, as medidas de esporângios observadas em *C. phaeospora* SPC 2032, 12,5-18,8 x 12,2-18,2 µm, concordam com a amplitude de variação registrada para a espécie, embora sejam ligeiramente superiores.

*Cunninghamella phaeospora* Boedijn foi previamente isolada de amostras de solo dos Estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Maranhão (UPADHYAY, 1970); de amostras de solo coletadas no Instituto de Botânica, PEFI (VIRIATO, 2003); e de solo sob diferentes tipos de vegetação, *Eucalyptus* spp., mata secundária e na região de interseção entre ambas vegetações, na Ilha dos Eucaliptos, Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP (SANTOS *et al.*, 1998).

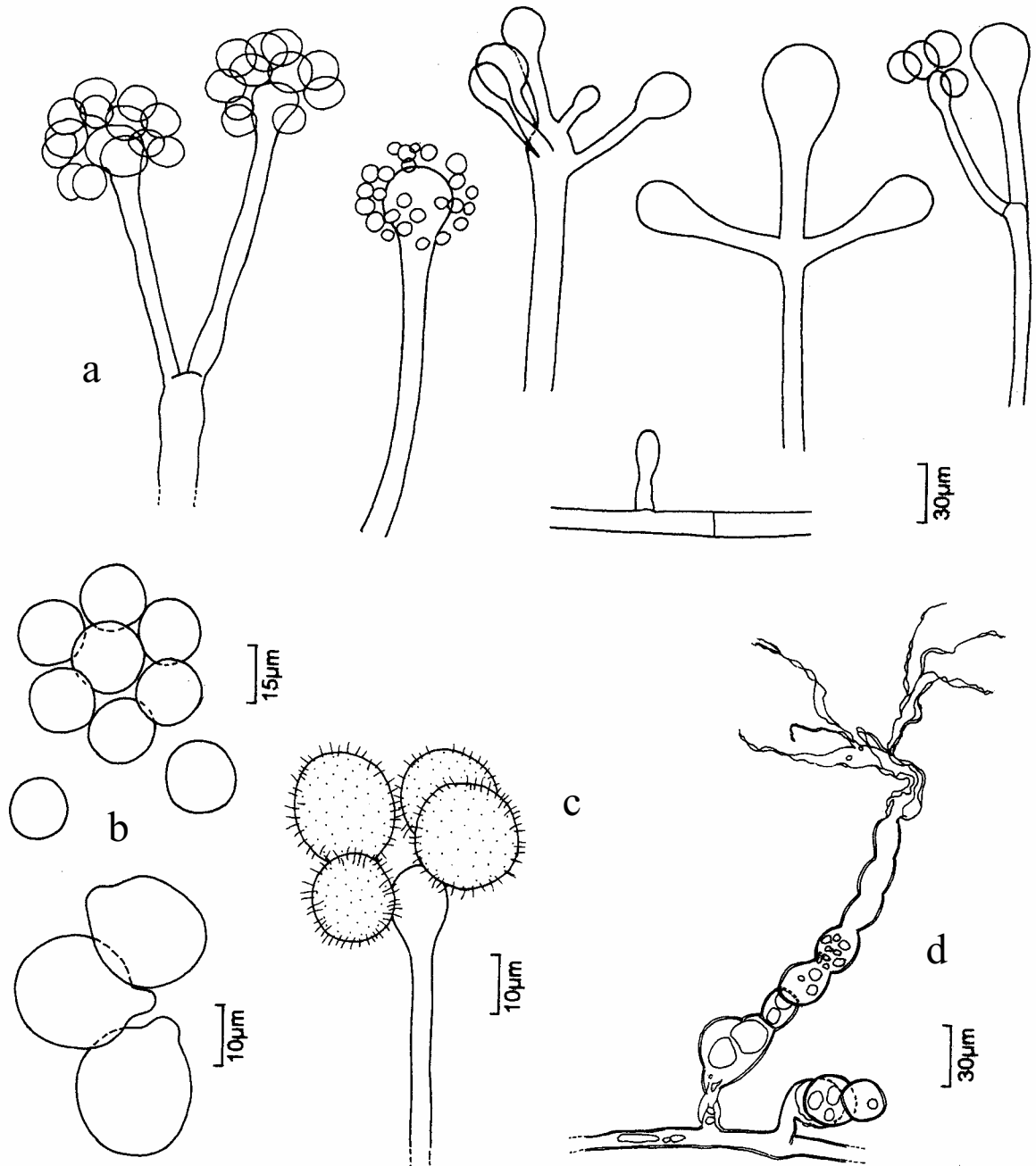


Figura 8. *Cunninghamella phaeospora* SPC 2032: a) tipos de esporóforos e vesículas; b) esporangíolos globosos e limoniformes; c) esporangíolos equinulados; d) micélio submerso.

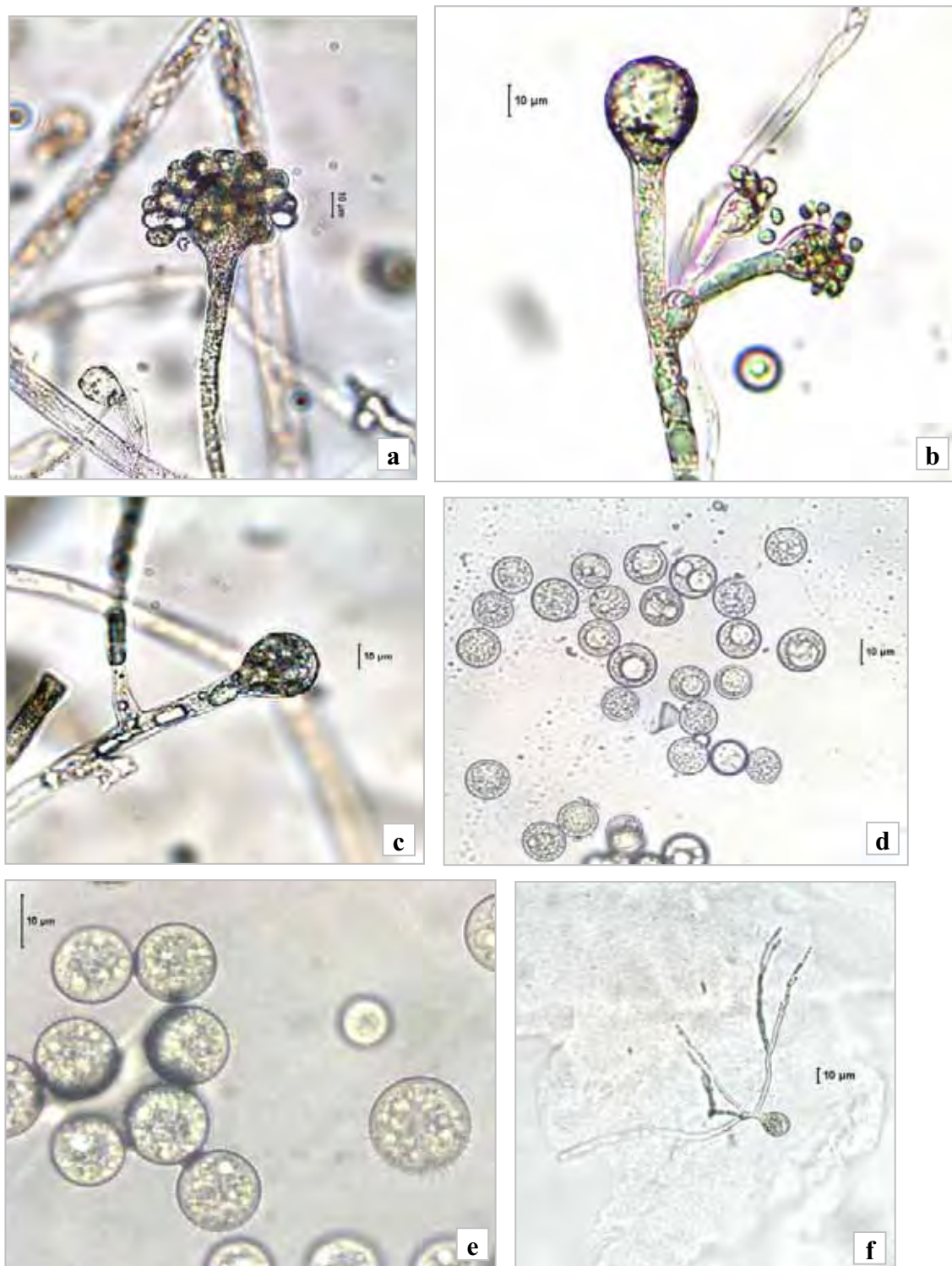


Figura 9. *Cunninghamella phaeospora* SPC 2032: a) esporóforo com esporangíolos aderidos à vesícula; b) esporóforo ramificado; c) vesícula nua; d) esporangíolos lisos; e) esporangíolos equinulados; f) esporangíolo germinando.



### 5.2.3. Gênero *Mucor* Fresenius

O gênero *Mucor* Fresenius foi descrito em 1850 e trata-se de um nome conservado, conforme a nona edição do “Dictionary of the Fungi” (KIRK *et al.*, 2001), seguindo-se a proposta de conservação apresentada por KIRK (1986) em substituição à denominação *Mucor* Micheli ex L., 1753.

*Mucor* é considerado o gênero mais primitivo da família Mucoraceae e apresenta como principais características: colônias de crescimento rápido, muitas vezes cobrindo todo o espaço aéreo nas placas de Petri, de coloração branca a amarela, tornando-se cinza-esverdeadas com o desenvolvimento dos esporângios; esporangióforos sem rizóides basais, com ramificações simpodiais, às vezes racemosas, mas não dicotômicas; esporângios multiesporados, não apofisados, de paredes difluentes ou persistentes, algumas vezes cobertas com espinhos de oxalato de cálcio; columelas bem desenvolvidas; esporangiósporos globosos a elipsóides, de paredes lisas ou finamente ornamentadas, hialino-esverdeados ou amarronzados; clamidósporos presentes ou ausentes; hifas submersas leveduriformes (oídios); zigosporângios produzidos no micélio aéreo por linhagens compatíveis, marrons-escuros, com verrugas estelares, células suspensórias iguais, sendo que a maioria das espécies é heterotálica; espécie tipo: *Mucor mucedo* Micheli ex St.-Amans (DOMSCH *et al.*, 1993). De acordo com SCHIPPER (1975), a denominação correta desta espécie é *Mucor mucedo* L. ex Fr.

Os mais representativos estudos de referência que agregaram a maioria das espécies de *Mucor* são a série de publicações produzidas por SCHIPPER (1973; 1975; 1976; 1978), que podem ser complementadas por publicações de espécies avulsas (BENJAMIN & MEHROTRA, 1963; PRAKASH & SARBHOY, 1993; SCHIPPER & SAMSON, 1994; WATANABE, 1994; ZALAR *et al.*, 1997).

*Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal, Aliso 5:237. 1963.

Registro da linhagem: SPC 2033, solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 1, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (200 mg L<sup>-1</sup>). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 10-A, 10-B, 11-A e 11-B.

Colônia com 5 dias em SMA a 25°C, exalando forte cheiro de fermento de pão, verso com micélio delgado, bege pálido pontilhado em castanho, ou esbranquiçado com ou sem borda amarelo creme, reverso amarelo creme a bege pálido, com 25-30 dias verso bege pálido e reverso bege alaranjado, 71 x 68 mm de área e até 5 mm de altura (até 7 mm com 25-30 dias); esporangióforos ramificados simpodialmente, 56,8-1.560 µm de comprimento, 3,2-11,7 µm de largura basal e 2,7-9,2 µm de largura apical; esporângios globosos levemente aplanados, de coloração âmbar, com parede difluente, 24-60,8 x 26,4-67,2 µm; columelas elipsóides, obovóides, ou piriformes, algumas globosas, verdes hialinas a levemente acinzentadas, com ou sem colarete, 11,6-40 x 13,2-45 µm; esporangiósporos elípticos, plano-convexos, verdes claros, 4,2-9,7 x 2,2-5 µm; azigóforos ramificados ou não, às vezes partindo do mesmo ramo que os esporangióforos, 5-12,5 µm de largura; azigosporângios aplanados, verdes-musgo, âmbar a quase negros, presentes no ápice de azigóforos, localizados lateralmente em algumas hifas do micélio aéreo ou no micélio submerso, 26-61,75 x 28-74,25 µm, com espinhos de até 5 µm, isolados ou em verrugas estelares; clamidósporos isolados, catenulados, apicais e intercalares, verdes hialinos, contendo gotículas verde oliva, 7,2-26,4 x 8-16,4 µm; micélio submerso com pigmento verde oliva a alaranjado; zigospórângios não observados.

Inicialmente, havia a dúvida se as estruturas observadas na linhagem SPC 2033 representavam zigospórângios, azigosporângios ou ambos e se a linhagem era realmente homotática. Algumas características fisionômicas observadas nas colônias da linhagem tais como coloração, altura, velocidade de crescimento, bem como o tamanho e a forma dos esporângios, columelas e esporangiósporos, assemelharam-se muito às de *Mucor hiemalis* Wehmer, chegando-se à impressão de tratar-se de:

- Uma nova variedade ou, simplesmente, uma linhagem azigospórica atípica de *M. hiemalis* (GAUGER, 1975).

- *Mucor genevensis* Lendner, uma espécie homotática que apresenta a produção de zigospórângios e azigospórângios sem que tenha ocorrido o cruzamento entre linhagens geneticamente compatíveis, morfológicamente muito semelhante a *M. hiemalis* (SCHIPPER, 1973).
- Ou, provavelmente, uma espécie nova para o gênero *Mucor* Fresenius.

Inicialmente, a linhagem apresentava colônias de coloração laranja intenso em torno da região do inóculo, onde havia azigospórângios em grande quantidade e a suspeita da presença de zigospórângios. Com as sucessivas repicagens, estas características foram desaparecendo e a linhagem perdendo o vigor, tornando-se pálida, diminuindo a capacidade de crescimento e de produção de azigospórângios.

Diversos autores relataram a necessidade da obtenção de culturas monospóricas para os representantes do gênero *Mucor* cujas colônias apresentassem zigospórângios ou azigospórângios, a fim de se ter certeza da condição de homotalismo (HESSELTINE, 1954; WATANABE, 1994; ALVES *et al.*, 2002b), pois esta condição é decisiva para a identificação taxonômica em nível de espécie. Quando Margarita A.A. Schipper publicou sua chave de identificação para todas as espécies de *Mucor* reconhecidas até 1978, colocou em alguns dos itens da chave a seguinte informação: zigospórângios ou azigospórângios presentes em culturas monoesporangiais. O que dá a entender que foram preparadas culturas com um esporângio, não com um único esporo (SCHIPPER, 1978). Todavia, grande parte dos trabalhos taxonômicos menciona, em algum momento, a necessidade de se obter culturas monospóricas.

Durante o ensaio para preparação de culturas monospóricas foi observado o seguinte: após os cinco minutos de agitação do 1º tubo de ensaio contendo a solução de Tween 20 que recebeu o disco de 5 mm retirado de uma colônia da linhagem SPC 2033, foi constatada a formação de um colarinho de espuma de aproximadamente 1 cm. Houve a preocupação que com a possível formação exacerbada de espuma, a grande maioria dos esporangiósoros pudessem concentrar-se na espuma, diminuindo os esporangiósoros disponíveis no 1º mL da suspensão que seria submetido às demais diluições. Pois sabe-se que em ecossistemas aquáticos lóticos, por exemplo, boa parte dos propágulos fúngicos tais como os conídios de hyphomycetes aquáticos Ingoldianos concentram-se na espuma dos corpos d'água (DIX & WEBSTER, 1995). Provavelmente, uma menor concentração do surfactante promova o mesmo efeito de espalhamento dos esporangiósoros sem, no entanto, gerar espuma em demasia.

Foi observado que depois de 12 horas de incubação, não havia colônias da linhagem perceptíveis sobre as películas de SMA que receberam as suspensões de esporangiósporos. Passadas 36 horas, houve a formação de sete pequenas colônias, sendo quatro colônias em duas das placas que receberam a diluição  $10^{-4}$ , duas colônias em duas placas da diluição  $10^{-5}$  e uma colônia numa placa da diluição  $10^{-6}$ . Após 48 horas de incubação, desenvolveram-se mais duas colônias na 3ª placa que recebeu a diluição  $10^{-4}$ . Nas placas restantes,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ , não houve formação de novas colônias.

Após as colônias retiradas das películas de SMA terem sido incubadas em placas de Petri com SMA por 5 dias, desenvolveram-se oito colônias que exibiram, em média, 70 a 75 mm de área e 5 a 8 mm de altura, verso esbranquiçado e reverso amarelo creme pálido, grande quantidade de clamidósporos e praticamente ausência de esporangiósporos. Mas, com o passar do tempo, a produção de esporangiósporos foi restabelecida, havendo também a presença esparsa de azigosporângios pouco desenvolvidos, caracterizados por coloração âmbar clara translúcida e espinhos mal formados. Após 30 dias, foi confirmada a presença de azigosporângios nas placas correspondentes a todas as diluições efetuadas ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ), exceto em duas placas da diluição  $10^{-4}$ . Porém, não foi evidenciada a presença de zigosporângios.

Em relação aos testes de temperatura, tem-se o seguinte: após cultivo por 5 dias a  $30^{\circ}\text{C}$ , formaram-se colônias com 82 mm de área e até 10 mm de altura, verso branco a bege pálido, de aspecto úmido, reverso bege pálido e esporulação normal. A  $20^{\circ}\text{C}$  por 5 dias desenvolveram-se colônias com 50 x 47,5 mm de área e até 4 mm de altura, verso branco, reverso levemente amarelado e esporulação quase inexistente. Quando cultivada durante 5 dias a  $36^{\circ}\text{C}$ , houve somente o desenvolvimento de micélio bege pálido e muito delgado, com até 4 mm de área. A mesmas colônias foram cultivadas mais 5 dias a  $25^{\circ}\text{C}$  e exibiram micélio esbranquiçado, úmido e pouco denso, verso e reverso bege pálido na região do inóculo, 77,5 x 61,5 mm de área, até 6 mm de altura e esporulação normal. Em todas as temperaturas testadas, novamente não houve a produção de azigosporângios nem de zigosporângios, dificultando a identificação da linhagem em nível específico.

Com o intuito de revigorar a capacidade de crescimento da linhagem, foi sugerida sua inoculação em fruto de banana, (Trufem\*). De modo asséptico e com a ajuda de um estilete pontiagudo, foram cortadas fatias transversais de um fruto de banana-prata (*Musa* spp.), sem incluir a casca. Em três placas de Petri esterilizadas, foram adicionadas duas

---

\* TRUFEM, S.F.B. (Universidade São Marcos) Comunicação Pessoal, 2005.

rodela do fruto lado a lado, de modo a tocarem-se, sendo que fragmentos de uma colônia da linhagem SPC 2033, preservada em tudo de ensaio inclinado, foram repicados sobre as regiões de contato das rodela de banana. As placas foram incubadas em câmara climática a 25°C até a visualização de micélio do fungo crescendo sobre as fatias do fruto.

Em nova tentativa de cultivo, a linhagem foi retirada de três diferentes situações: 1) de cultura em SMA após o ensaio de crescimento em fruto de banana, 2) de culturas preservadas em tubos inclinados e 3) de culturas preservadas há 22 meses pelo método de Castellani, sendo transferida para SMA e incubada a 20°C. Decorridos 13 dias de incubação, tanto na placa de Petri que recebeu o inóculo da situação 1 quanto naquela da situação 2, apareceram colônias com cerca de 90 mm de área e até 12 mm de altura, verso bege pálido (areia) pontilhado em castanho, reverso bege pálido, grande quantidade de esporângios e azigosporângios. A partir do inóculo da situação 3, após 30 dias de incubação, surgiu uma colônia com 85 x 80 mm de área e cerca de 2 mm de altura, verso bege pálido esbranquiçado, reverso bege pálido, esporulação quase inexistente, porém, contendo grande quantidade de azigosporângios. A temperatura de 20°C e o maior tempo de incubação (13 e 30 dias) pareceram ser mais adequados ao desenvolvimento de todas as estruturas do fungo em relação aos inóculos oriundos das três situações analisadas.

Conforme nova fase de análise microscópica da linhagem SPC 2033, foi constatada a completa ausência de zigospórangios em todas as colônias produzidas a partir das três situações testadas. Por outro lado, foi comprovada a presença maciça de azigosporângios, localizados no ápice de azigóforos freqüentemente ramificados e também de modo intercalar no micélio aéreo. Outras características como: esporangiósoros elipsóides, plano-convexos, bem como a conformidade em relação às medidas das demais estruturas colocaram a linhagem como pertencente à espécie *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal, de acordo com as descrições contidas nas publicações de BENJAMIN & MEHROTRA (1963) e de SCHIPPER (1976), que a definiram como uma espécie azigospórica obrigatória, o que foi confirmado no presente estudo pelos resultados obtidos no ensaio para a produção de culturas monospóricas. Os azigosporângios abrigam em seu interior os azigósoros, que são zigósoros formados partenogeneticamente (BENNY *et al.*, 2001).

Na descrição original da espécie, BENJAMIN & MEHROTRA (1963) relataram que o desenvolvimento de esporângios e azigosporângios é favorecido em baixas temperaturas (16-18°C) e que a 6°C o crescimento das colônias é lento (6-8 cm em um mês), mas há elevada produção de azigosporângios. Conforme já mencionado, a linhagem

SPC 2033 também apresentou melhor produção de zigospórios em temperatura mais baixa (20°C) e em maior tempo de incubação (30 dias). O presente relato constitui o primeiro registro de *Mucor bainieri* Mehrotra & Baijal para o Brasil.

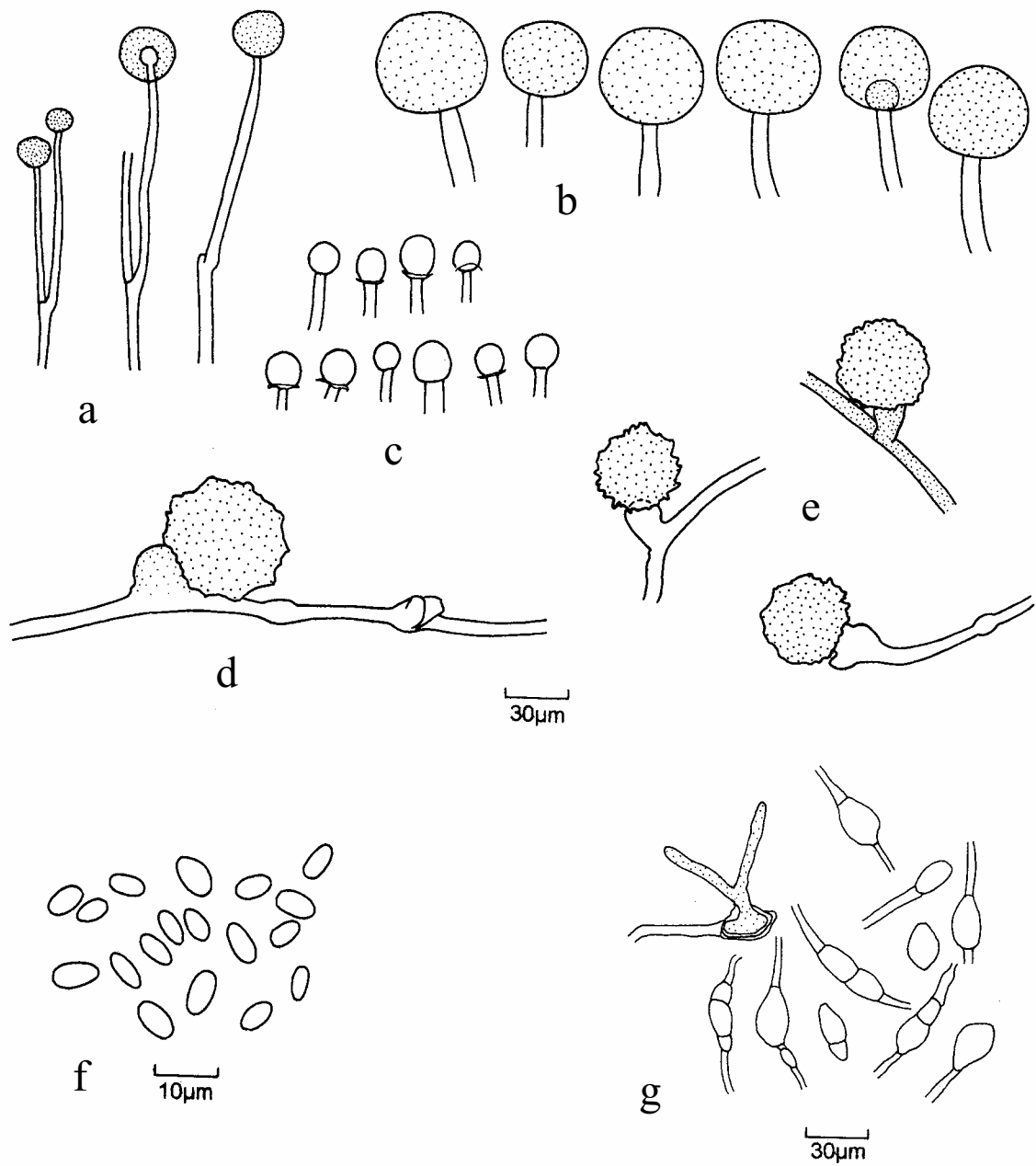


Figura 10-A. *Mucor bainieri* SPC 2033: a) esporangióforos ramificados; b) esporângios; c) columelas; d) e e) azigosporângios; f) esporangiósposos; g) clamidósposos.

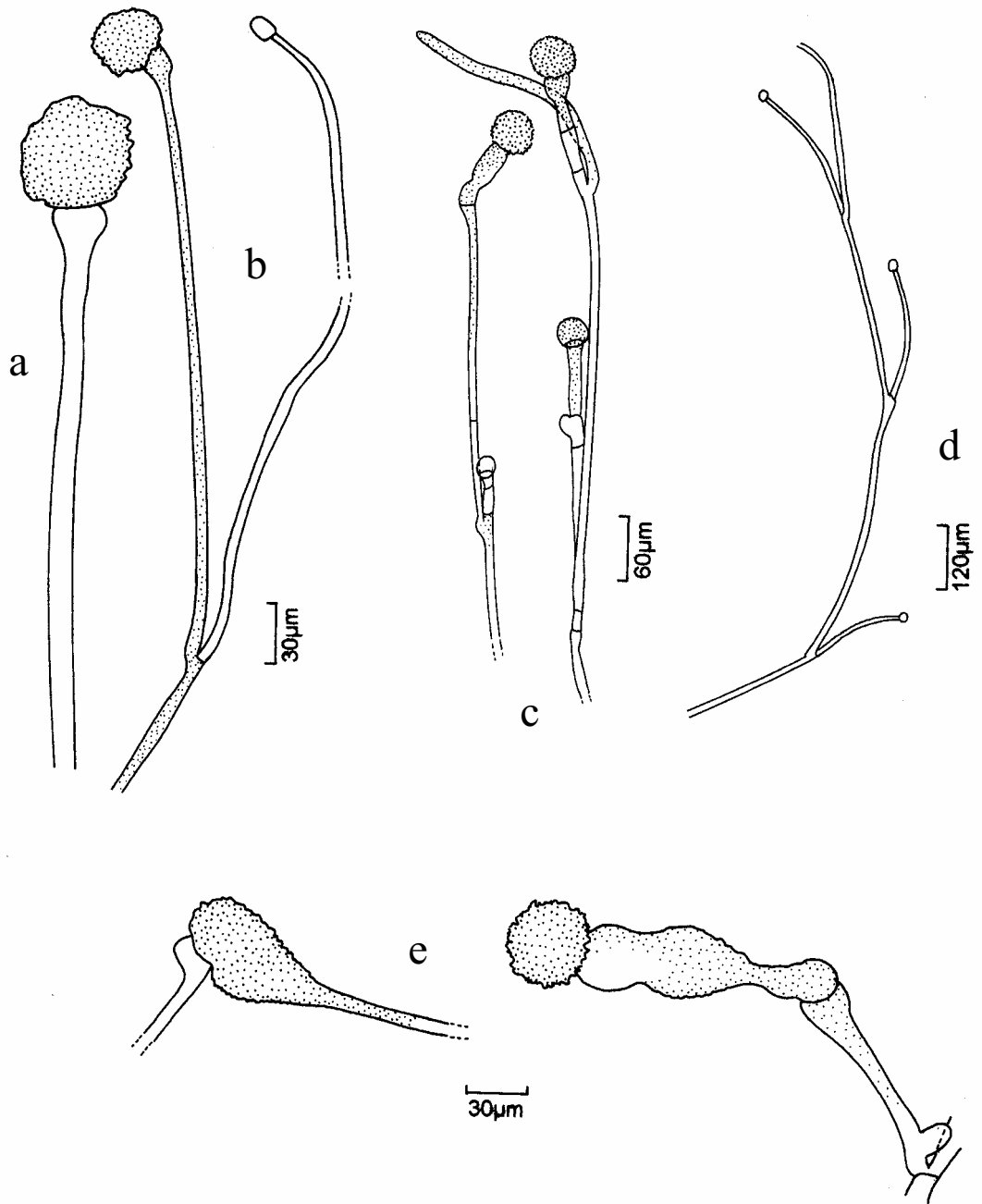


Figura 10-B. *Mucor bainieri* SPC 2033: a) azigóforo longo; b) azigóforo e esporangióforo no mesmo ramo; c) azigóforos ramificados; d) esporangióforos em ramificação simpodial; e) azigosporângios diferenciados.



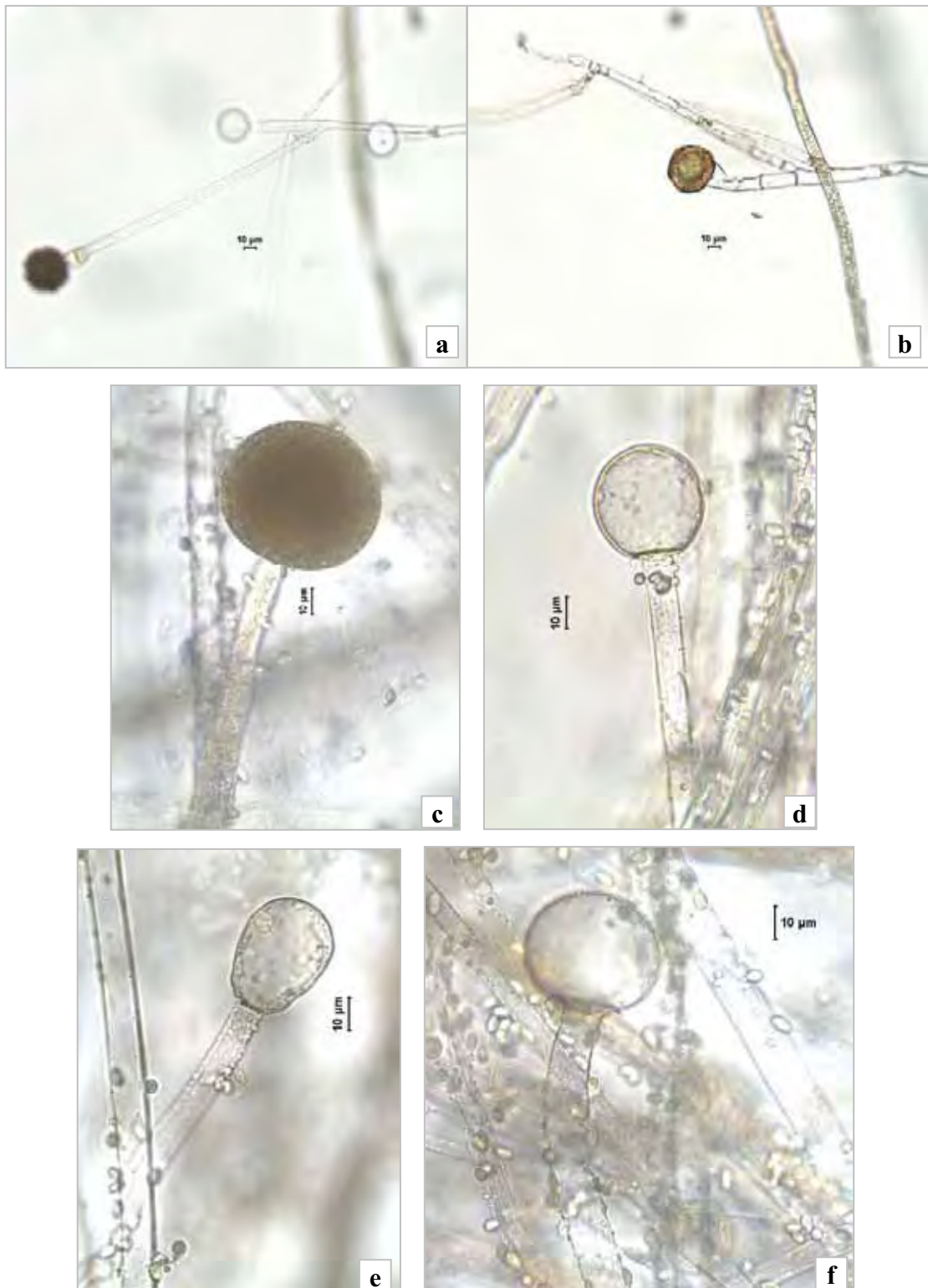


Figura 11-A. *Mucor bainieri* SPC 2033: a) e b) ramificação com esporangióforos e azigóforos; c) esporângio; d)-f) esporangióforos com columelas.

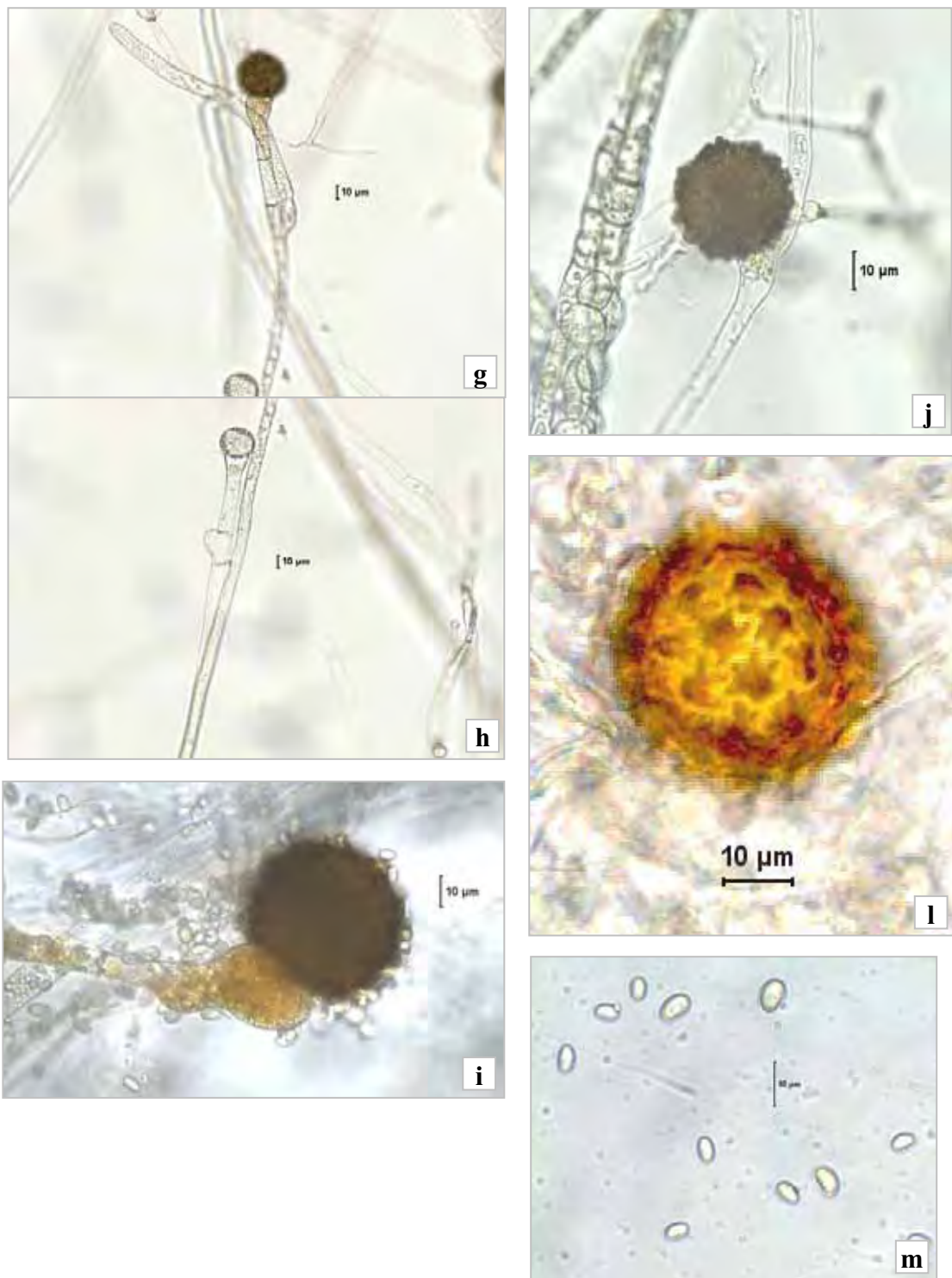


Figura 11-B. *Mucor bainieri* SPC 2033: g) e h) azigóforo ramificado; i) e j) azigosporângios; l) azigosporângio mostrando verrugas estelares; m) esporangiósoros.

*Mucor circinelloides* van Tieghem f. *circinelloides*, Studies in Mycology 12:5. 1976.

Registro da linhagem: SPC 2034, solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 5, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 12 e 13.

Colônia com 5 dias em SMA, verso bege pontilhado em castanho e reverso bege acinzentado, alaranjado na região do inóculo, verso e reverso idem com 25-30 dias, 90 mm de área e 6 mm de altura; esporangióforos ramificados simpodialmente, curtos ou longos, curvos a quase circinados (curtos) ou retos (longos),  $22,5-1.010 \mu\text{m}$  de comprimento,  $6,3-16,3 \mu\text{m}$  de largura basal e  $5-12,5 \mu\text{m}$  de largura apical; esporângios globosos levemente aplanados, com parede difluente ou persistente, castanhos esverdeados a amarelos dourados esverdeados,  $27,5-52,5 \times 27,5-57,5 \mu\text{m}$ ; columelas elipsóides, obvóides, ou globosas levemente aplanadas (menores), maioria com colarete, hialinas a levemente castanhas,  $10,5-43 \times 11,5-44 \mu\text{m}$ ; esporangiósporos arredondados, ovóides e elípticos, lisos, de conteúdo homogêneo, verdes-oliva a castanhos claros,  $4,3-12,3 \times 3,3-8,8 \mu\text{m}$ ; clamidósporos apicais, intercalares e catenulados, de parede espessa, aspecto granuloso e com conteúdo verde oliva a amarelo dourado,  $18-40,5 \times 13-32 \mu\text{m}$ ; micélio submerso às vezes apresentando regiões intercalares infladas delimitadas por septos, com cerca de 3 vezes a espessura das hifas comuns e repletas de conteúdo verde oliva; zigospórângios e azigospórângios não observados.

Nas lâminas preparadas a partir de colônias com 5 dias de cultivo a  $25^\circ\text{C}$  foi muito difícil encontrar esporângios intactos, pois nestas condições restaram somente os muito pequenos. Por isso, foram preparadas lâminas de colônias com três dias de crescimento a  $20$  e a  $25^\circ\text{C}$ , para a medição e a ilustração de esporângios e de esporangióforos.

Foram realizados testes de cruzamento entre diversas linhagens do grupo das chamadas pequenas espécies de *Mucor* que compartilhavam características morfofisiológicas em comum, chegando-se a algumas combinações taxonômicas novas baseadas tanto na morfologia quanto na capacidade de reprodução sexuada (produção de zigospórângios) entre as linhagens (SCHIPPER, 1976).

Como resultado deste estudo, surgiram os táxons *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*, *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. circinelloides* f. *griseo-cyanus* e *M.*

*circinelloides* f. *janssenii*, assim como *M. racemosus* f. *racemosus*, *M. racemosus* f. *sphaerosporus* e *M. racemosus* f. *chibinensis*, sendo que os táxons *M. ramosissimus*, *M. bainieri*, *M. zonatus*, *M. plumbeus* e *M. fuscus* permaneceram conservados, do ponto de vista nomenclatural, devido a sua boa delimitação em relação às demais espécies (SCHIPPER, 1976).

De acordo com SCHIPPER (1978), algumas linhagens de *Mucor circinelloides* podem ser muito semelhantes às de *Mucor indicus* Lendner. Porém, *M. indicus* não apresenta esporangióforos curtos abundantemente ramificados como os de *M. circinelloides*, possui columelas predominantemente globosas em contraste com as columelas obovóides de *M. circinelloides* e é capaz de crescer bem e esporular a 37°C.

Devido a divergências em conceitos taxonômicos que levaram a um erro nomenclatural, a nomenclatura que designa a espécie *Mucor rouxii* (Calmette) Wehmer têm sido erroneamente aplicada à espécie *Mucor indicus* Lendner. Calmette em 1892 descreveu a espécie *Amylomyces rouxii* Calmette, mas Wehmer em 1900, após tê-la examinado, colocou-a em situação de sinonímia classificando-a como *Mucor rouxii* (Calmette) Wehmer (SCHIPPER, 1978). Segundo SCHIPPER (1978) a linhagem tipo de *Amylomyces rouxii*, originalmente descrita por Calmette, foi perdida. Entretanto, ELLIS *et al.* (1976) elaboraram um amplo estudo morfológico e fisiológico de alguns fungos isolados de alimentos fermentados produzidos na Tailândia e indicaram a linhagem NRRL 5866 para constituir o neótipo da espécie, concluindo que *Amylomyces* Calmette é um gênero distinto dos demais gêneros inseridos na ordem Mucorales, embora apresente algumas características semelhantes com o gênero *Rhizopus* Ehrenberg.

Pelo exposto na literatura, ficou claro que: 1) houve a conservação do gênero *Amylomyces* Calmette e, conseqüentemente, da espécie *Amylomyces rouxii* Calmette (ELLIS *et al.*, 1976); 2) as linhagens identificadas como *Mucor rouxii* eram na verdade pertencentes a *Mucor indicus* Lendner, sendo que o táxon *Mucor rouxii* (Calmette) Wehmer foi considerado duvidoso e inadequado (SCHIPPER, 1973) e, além do mais, este táxon não consta em nenhum dos volumes da série de estudos dedicados ao gênero *Mucor* (SCHIPPER, 1973; 1975; 1976; 1978).

Foi recebida uma linhagem identificada como *Mucor rouxii* UCP-64, proveniente da Coleção de Culturas de Fungos da Universidade Católica de Pernambuco, que provavelmente poderia ser referida como *Mucor indicus* Lendner. Devido à habilidade de *M. indicus* crescer e esporular a 37°C e de crescer a 40°C (SCHIPPER, 1978), a linhagem

UCP-64 (utilizada como referência) e a linhagem SPC 2034 foram incubadas a 37 e a 40°C por 7 dias, sendo que no mesmo período UCP-64 foi também incubada a 25°C.

A linhagem SPC 2034 exibiu boa capacidade de crescimento a 37°C, colônia com verso laranja pálido esbranquiçado, reverso alaranjado, 80 mm de área, 6 mm de altura na região do inóculo e 3 mm no restante da colônia, algumas columelas aplanadas (semelhantes às de *Zygorrhynchus moelleri* SPC 2051) contendo grandes sobras da membrana esporangial na região basal, esporulação levemente reduzida.

A 37°C, linhagem UCP-64 desenvolveu colônia com verso e reverso amarelo manga, 52 x 37 mm de área, até 1 mm de altura e esporulação nula. Mas a 25°C pelo mesmo período, produziu colônia com o verso bege claro alaranjado densamente pontilhado em castanho escuro, devido à presença de esporângios, 95 mm de área e até 4 mm de altura, com esporulação abundante. Ao contrário do esperado, a linhagem UCP-64 não esporulou, enquanto que a linhagem SPC 2034 foi melhor tanto no quesito crescimento quanto em relação à esporulação.

A temperatura de 40°C foi completamente desfavorável para ambas, não ocorrendo o mínimo crescimento. Mas, UCP-64 foi capaz de crescer e esporular depois de novamente cultivada a 25°C por 7 dias, o que de novo não aconteceu com SPC 2034.

As características da linhagem SPC 2034 estão de acordo com a descrição de SCHIPPER (1976) para o táxon *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*, sendo que esta linhagem pode ser considerada tolerante à temperatura de 37°C porque teve o crescimento e a esporulação apenas levemente reduzidos, enquanto que era de se esperar crescimento e esporulação extremamente pobres (SCHIPPER, 1976).

Estudos anteriores detectaram a presença de *Mucor circinelloides* van Tieghem em diversos substratos, embora sem distinção entre as quatro formas ou variedades pré-estabelecidas por SCHIPPER (1976). Provavelmente, isto ocorreu devido ao fato de que muitas vezes há o isolamento de linhagens cujo perfil morfológico coloca-se numa posição intermediária entre os táxons pré-estabelecidos, dificultando a delimitação em nível varietal.

TRUFEM (1978) isolou *Mucor circinelloides* van Tieghem de amostras de solo coletadas nos municípios paulistas de Santa Isabel e São Lourenço da Serra; TRUFEM & VIRIATO (1985) obtiveram a espécie de amostras de fezes de mamíferos herbívoros do Parque Zoológico de São Paulo, PEFI; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1989) registraram sua ocorrência em folhas de *Ficus microcarpa*, submersas às margens do lago

das garças, no Instituto de Botânica, PEFI; ANTUNES *et al.* (1993) obtiveram-no de amostras de solo retiradas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP; RUEGGER *et al.* (2002) o isolaram de solo da Estação Ecológica Juréia-Itatins, SP.

Em estudos incluindo o nível varietal, *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* foi isolado de amostras de solo do PEFI por SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (1996), de fezes de mamíferos herbívoros do Parque Dois Irmãos e do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE (ALVES *et al.*, 2002b) e de solo de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP, (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006).

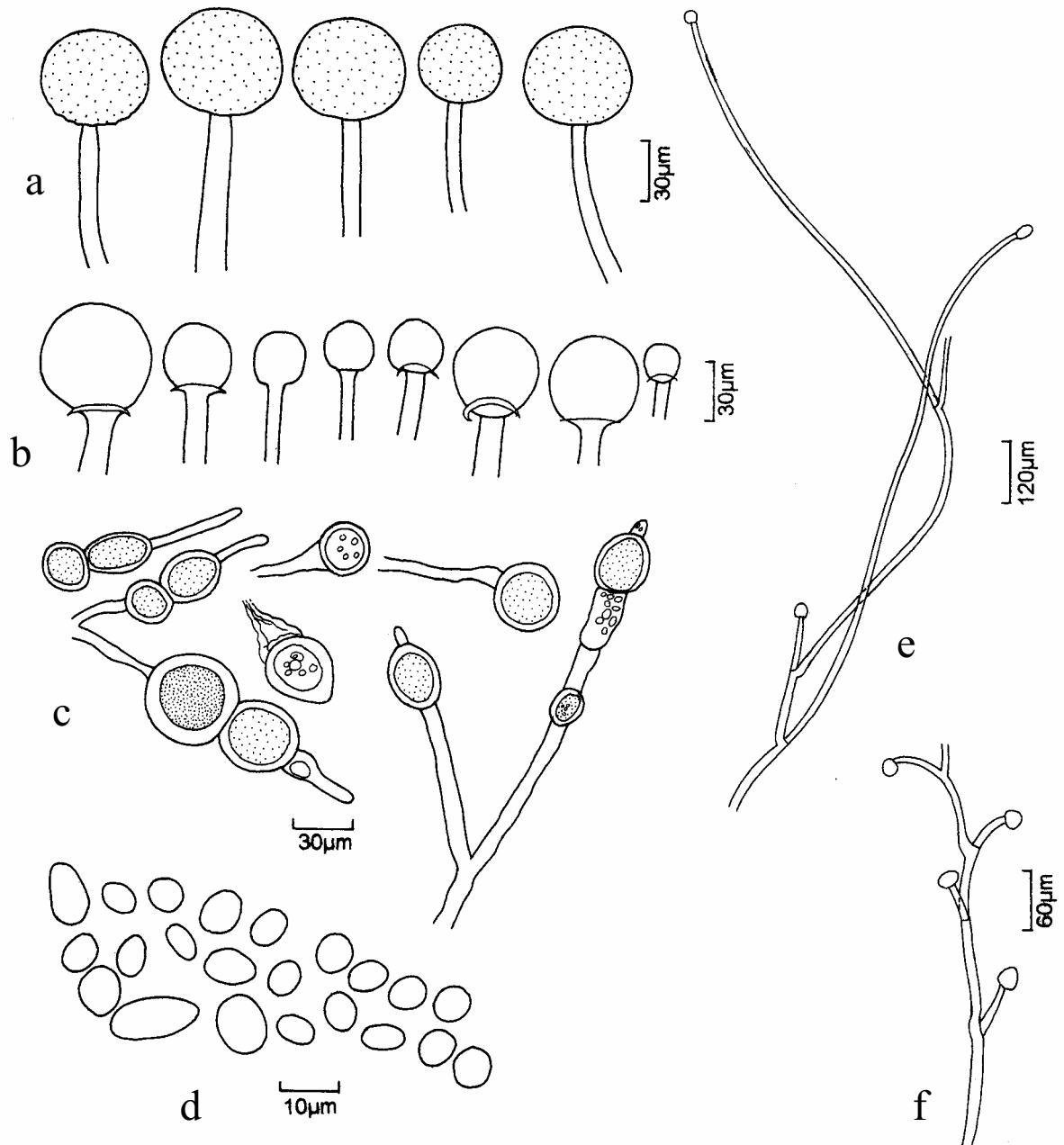


Figura 12. *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* SPC 2034: a) esporângios; b) columelas; c) clamidósporos; d) esporangiósoros; e) esporangióforos em ramificação simpodial; f) esporangióforos circinados.



Figura 13. *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* SPC 2034: a) ramificação com esporangióforos curvos; b) esporangióforo curto com esporângio; c) esporangióforo curto com columela; d) esporangióforo longo com columela; e) esporangiósporos.



*Mucor circinelloides* van Tieghem f. *lusitanicus* (Bruderlein) Schipper, *Studies in Mycology* 12:9. 1976.

Registro da linhagem: SPC 2035, solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 5, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 14 e 15.

Colônia com 6 dias em SMA, verso cinza de aspecto pulverulento ou castanho levemente esverdeado, com ou sem borda branca a bege, alaranjado na região do inóculo e reverso bege claro acinzentado, verso e reverso idem com 25-30 dias, 78 mm de área, 2 mm de altura na região do inóculo e 1 mm no restante da colônia, ocorrendo a formação de uma trama frouxa de esporangióforos acima da colônia com até 5 mm de altura; esporangióforos ramificados simpodialmente, curtos ou longos, levemente curvos, 9,2-1.550  $\mu\text{m}$  de comprimento, 4,5-17,5  $\mu\text{m}$  de largura basal e 3,5-12,5  $\mu\text{m}$  de largura apical; esporângios globosos aplanados, com parede persistente ou não, alguns sésseis, amarelos dourados, castanhos esverdeados a quase negros, 28,8-77,5 x 30-85  $\mu\text{m}$ ; columelas globosas levemente aplanadas, com grandes sobras da parede esporangial aderidas à parte basal ou totalmente lisas sem colarete, hialinas a levemente acinzentadas, com ou sem conteúdo granuloso disperso, 9,2-47,5 x 10,2-50  $\mu\text{m}$ ; esporangiósporos elípticos, ovais, ou menos freqüentemente em forma de gota a reniformes, de aspecto granuloso, verdes-oliva levemente manchados de castanho claro, 3,2-10,2 x 2,7-5,7  $\mu\text{m}$ ; clamidósporos apicais, de parede espessa, com conteúdo verde oliva preenchendo todo o interior, 10,2-30,5 x 9,2-25  $\mu\text{m}$ ; micélio submerso com conteúdo amarelo dourado esverdeado; zigospórângios e azigospórângios não observados.

Foram preparadas lâminas de colônias com três dias de crescimento a 20 e a 25°C para a medição e ilustração de esporângios e esporangióforos. Quando incubada na temperatura de 37°C por 7 dias, foi produzida colônia com verso e reverso amarelo manga, 68 x 48 mm de área, até 1 mm de altura e esporulação inexistente. Na temperatura de 40°C por 7 dias não houve desenvolvimento, mas houve crescimento e esporulação depois de nova incubação a 25°C pelo mesmo período.

Nos aspectos gerais, a linhagem SPC 2035 apresentou as principais características morfológicas concordantes com a descrição de SCHIPPER (1976) para o táxon *Mucor*

*circinelloides* f. *lusitanicus*, tais como: coloração das colônias, tipo de ramificação dos esporangióforos, coloração e tamanho dos esporângios, columelas globosas, tamanho e forma variável dos esporangiósporos. SCHIPPER (1976), relatou que algumas linhagens deste táxon podem apresentar extrema variação na forma dos esporangiósporos, podendo inclusive apresentar formas bizarras. Foi freqüente a presença de esporangiósporos de formas variáveis na linhagem SPC 2035.

*Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* foi isolado por ALVES *et al.* (2002b) de fezes de mamíferos herbívoros do Parque Dois Irmãos e do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

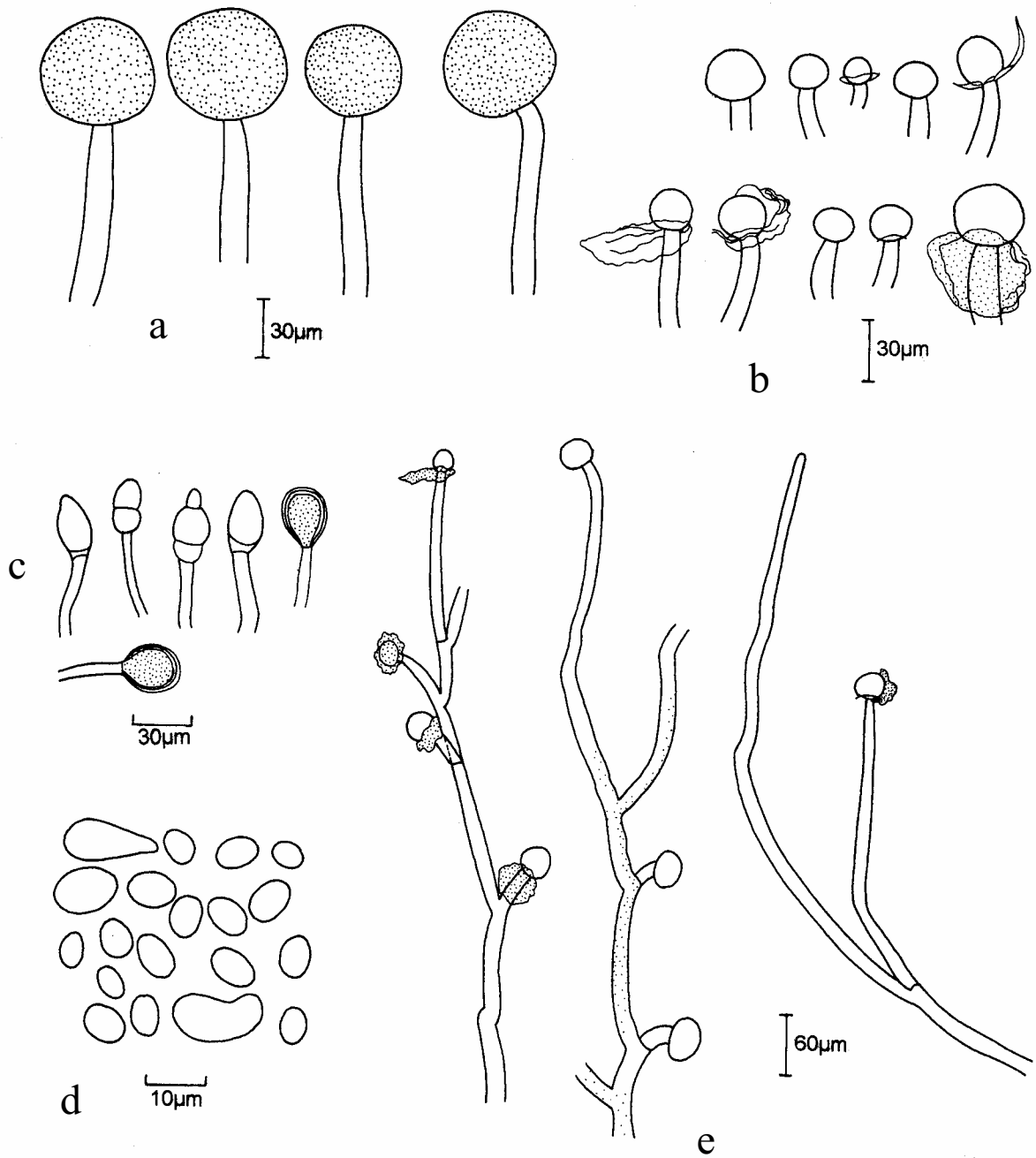


Figura 14. *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* SPC 2035: a) esporângios; b) columelas; c) clamidósporos; d) esporangiósoros; e) esporangióforos em ramificação simpodial.

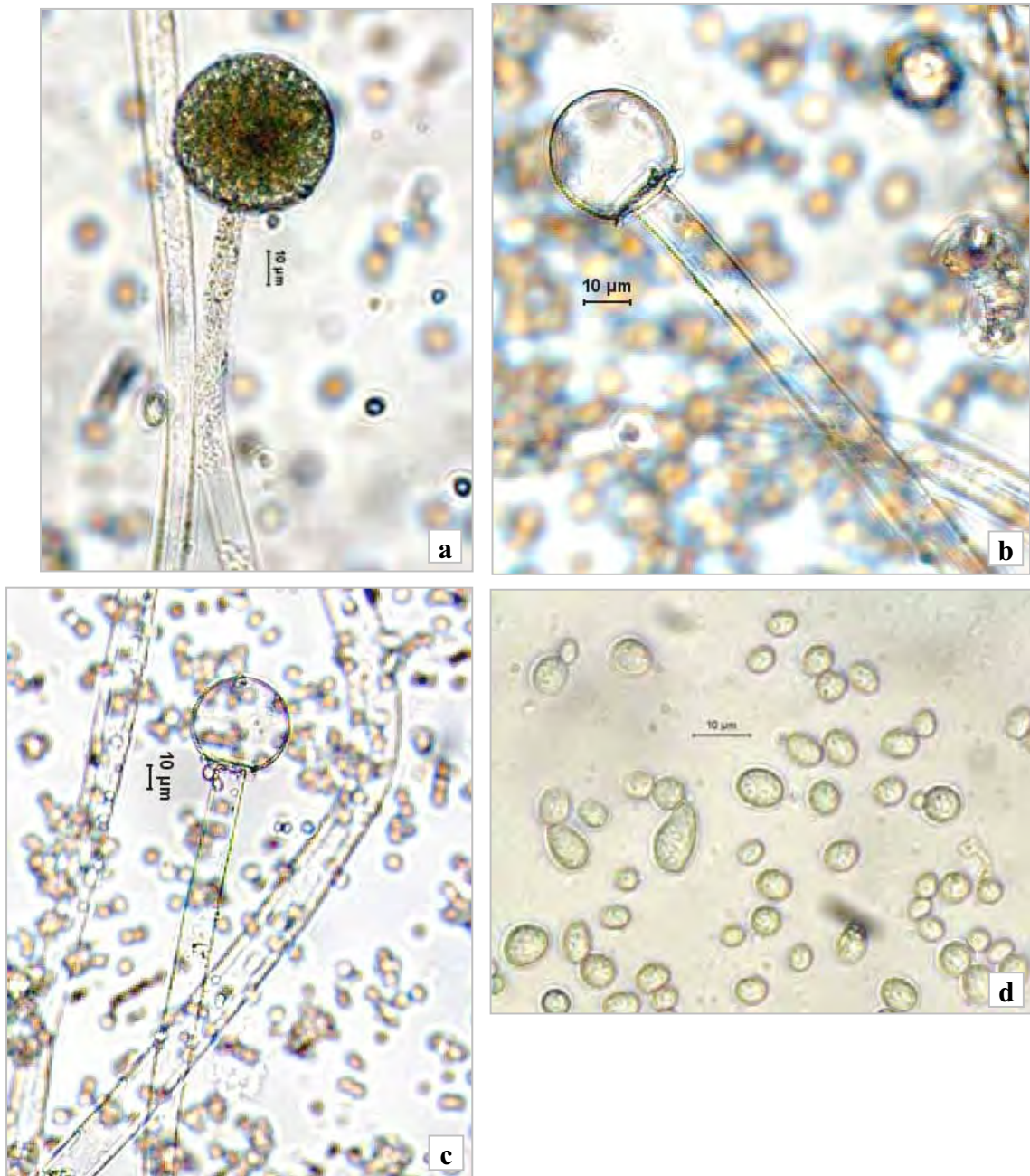


Figura 15. *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* SPC 2035: a) esporangióforo com esporângio; b) e c) esporangióforos longos com columelas; d) esporangiósoros.

*Mucor circinelloides* van Tieghem f. *janssenii* (Lendner) Schipper, *Studies in Mycology* 12:13. 1976.

Registro da linhagem: SPC 2036, solo da 2ª coleta (18/03/2003), local 5, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 16 e 17.

Colônia com 5 dias em SMA, verso cinza grafite pulverulento com borda bege claro ou branca, ou cinza alaranjado pulverulento sem borda (idem com 25-30 dias) e reverso bege claro levemente acinzentado ou alaranjado (idem com 25-30 dias), 60 x 55 mm de área e até 3 mm de altura; esporangióforos ramificados simpodialmente, curtos ou longos, levemente curvos a circinados (curtos) ou retos (longos), com afilamento no ápice (curtos) ou não (longos), septados ou não, maioria com 15-267,2  $\mu\text{m}$  de comprimento, mas podendo chegar a 820,8  $\mu\text{m}$ , 4,5-10  $\mu\text{m}$  de largura basal e 3-8,7  $\mu\text{m}$  de largura apical; esporângios globosos levemente aplanados, com parede difluente, castanhos claros, castanhos escuros a quase negros, 16,5-55,5 x 18-57  $\mu\text{m}$ ; columelas globosas levemente aplanadas a elipsóides, com colarete, com ou sem conteúdo granular, hialino-acinzentadas com ou sem brilho esverdeado, 11,2-35 x 16,5-34,5  $\mu\text{m}$ ; esporangiósporos globosos, ovóides a quase esféricos, lisos, de coloração castanha quando em grupo e castanha clara os individuais, 3-6,7 x 2,2-6  $\mu\text{m}$ ; clamidósporos apicais e intercalares, 9,7-23,2 x 8,2-16,5  $\mu\text{m}$ ; micélio submerso com conteúdo verde oliva, oídios presentes; zigospórângios e azigospórângios não observados.

O cultivo nas temperaturas de 20 e 30°C não foi inadequado ao desenvolvimento da linhagem, conforme indicado por SCHIPPER (1976). A 20°C por 5 dias, surgiram colônias com 66 x 62 mm de área e até 3 mm de altura, verso com uma região central cinza grafite de aspecto pulverulento e uma região periférica esbranquiçada, ou sem regiões distintas, sendo o micélio acinzentado de aspecto pulverulento, reverso bege na região do inóculo, bege pálido acinzentado no restante da colônia e esporulação normal. A 30°C por 5 dias, formaram-se colônias de verso acinzentado e reverso pálido acinzentado, 88 mm de área, até 3 mm de altura e esporulação normal.

O cultivo a 36°C foi extremamente limitante, de modo que após 5 dias de incubação houve apenas o desenvolvimento de pequenas colônias de micélio bege pálido e muito

delgado, até 7 mm de área e esporulação ausente. Porém, as mesmas colônias quase apresentaram a capacidade de crescimento normal depois de incubadas por igual período a 25°C, exibindo verso branco levemente acinzentado, reverso bege pálido na região do inóculo e esbranquiçado no restante, 57 x 54,5 mm de área e até 2 mm de altura, embora, com a capacidade de esporulação reduzida. Na temperatura de 37°C é esperado crescimento, mas com micélio anormal e esporulação ausente (SCHIPPER, 1976).

A linhagem SPC 2036 exibiu as características típicas de *Mucor circinelloides* f. *janssenii*, tais como colônias com micélio aéreo geralmente rente ao meio de cultivo, até 3 (6 mm), esporangióforos com até 10 µm de largura, curvos ou circinados e esporangiósoros globosos ou subglobosos, variando de 3 x 2,2 a 6,7 x 6 µm; SCHIPPER (1976) descreveu esporangiósoros com (3) 3,5-5,5 (6) µm de diâmetro.

Supõe-se que a primeira menção deste táxon para o Estado de São Paulo tenha ocorrido no estudo de TRUFEM (1978), citando-o como *Mucor griseo-cyanus* f. *janssenii* com base na classificação de SCHIPPER (1970), que após estudos complementares (SCHIPPER, 1976) criou a combinação nova: *Mucor circinelloides* f. *janssenii*. SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (1996) isolaram-no de amostras de solo do PEFI; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1997; 1998) obtiveram-no de amostras de água, solo e folhas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba; ALVES *et al.* (2002b) o encontraram em amostras de fezes de mamíferos herbívoros do Parque Dois Irmãos e do departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pernambuco; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (2006) o isolaram em amostras de solo e folheto de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP.

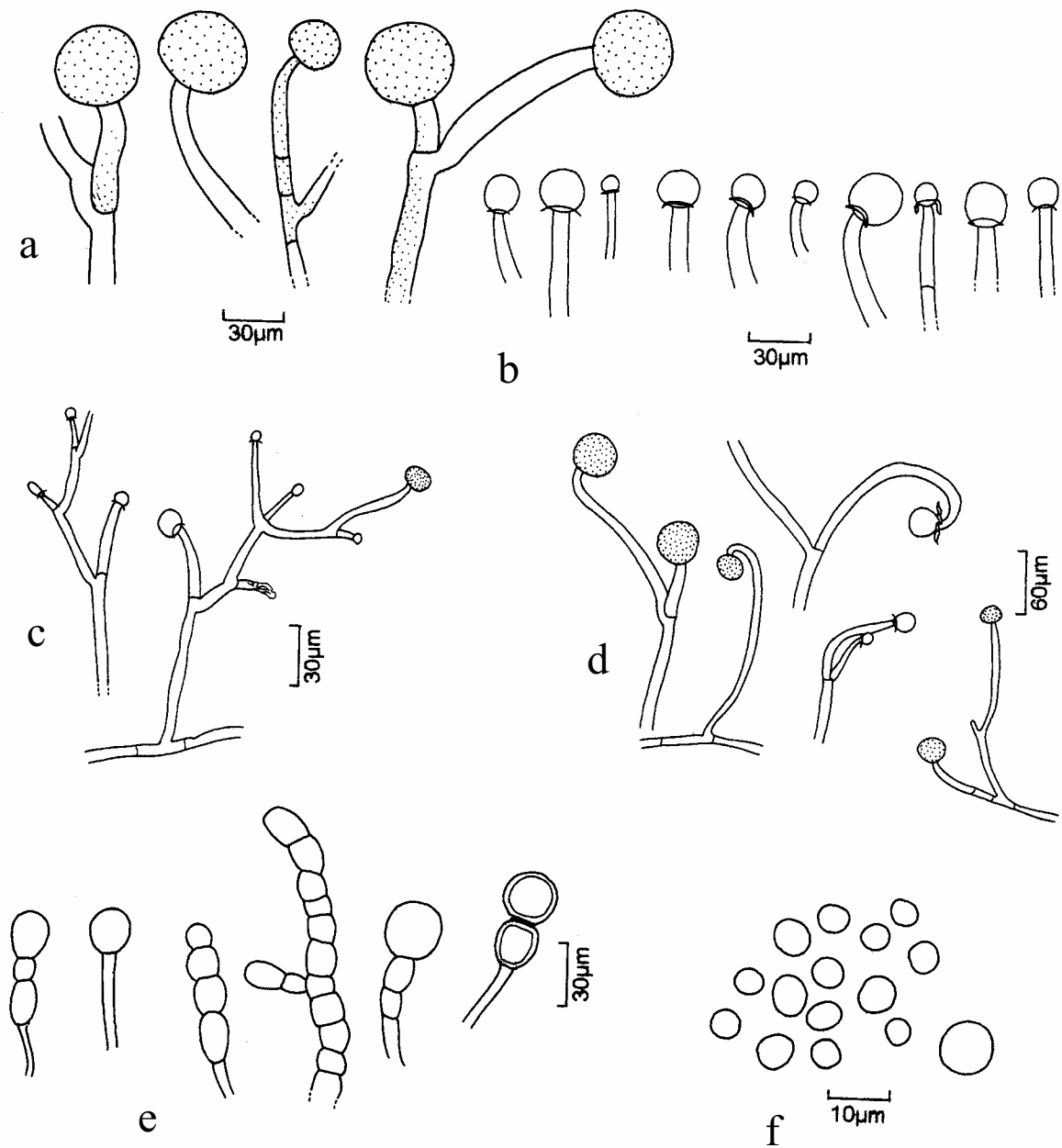


Figura 16. *Mucor circinelloides* f. *janssenii* SPC 2036: a) esporângios; b) columelas; c) e d) esporangióforos; e) clamidósporos; f) esporangiósoros.



Figura 17. *Mucor circinelloides* f. *janssenii* SPC 2036: a) ramificações com esporangióforos curvos e circinados; b) e c) esporangióforos com esporângios; d) esporangiósoros; e) e f) esporangióforos com columelas.



*Mucor hiemalis* Wehmer f. *hiemalis*, Studies in Mycology 4:26. 1973.

Registro das linhagens: SPC 2037, solo da 3ª coleta (28/05/2003), local 2, em MA sem metais (controle); SPC 2038, solo da 3ª coleta, local 2, em MA com  $Zn(NO_3)_2$  (200 mg L<sup>-1</sup>); SPC 2039, solo da 3ª coleta, local 5, em MA com  $Pb(NO_3)_2$  (100 mg L<sup>-1</sup>); SPC 2040, solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 1, em MA com  $Pb(NO_3)_2$  (100 mg L<sup>-1</sup>); SPC 2041, solo da 4ª coleta, local 3, em MA com  $Pb(NO_3)_2$  (100 mg L<sup>-1</sup>). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 18 e 19.

Colônia com 5-7 dias em SMA, verso bege claro pontilhado em cinza, de aspecto pulverulento, ou laranja pálido levemente esbranquiçado (25-30 dias), reverso bege claro a alaranjado, com ou sem coloração laranja intenso (pêssego) na região do inóculo, bege alaranjado a laranja intenso (pêssego) com 25-30 dias, 90 mm de área e 5-14 mm de altura; esporangióforos ramificados simpodialmente, às vezes tendo os ramos principais levemente curvos em relação aos esporangióforos retos que surgem lateralmente, com ou sem septo adicional logo acima do septo da ramificação, com ou sem conteúdo granular laranja, 34,2-2.640 μm de comprimento, 4-18,7 μm de largura basal e 2,3-16,2 μm de largura apical; esporângios globosos levemente aplanados, alguns com paredes altamente difluentes aos 5 dias, amarelos dourados, castanhos avermelhados (âmbar) a castanhos esverdeados ou escuros, 28,8-89 x 30-87,5 μm; columelas elipsóides com ou sem base truncada, piriformes, ou globosas levemente aplanadas, com ou sem colarete, hialino-esverdeadas a levemente acinzentadas, com ou sem conteúdo granuloso, 7,2-56 x 7,5-45,5 μm; esporangiósporos elípticos, lisos, plano-convexos, de conteúdo homogêneo ou granuloso, verdes claros, com ou sem gotículas de tom verde escuro, 3-10,9 x 1,8-6,8 μm; clamidósporos isolados, apicais, catenulados e intercalares, presentes ou ausentes no micélio aéreo, com ou sem conteúdo granular verde oliva, 6,2-30 x 5-24,4 μm; micélio submerso com conteúdo verde oliva a amarelo esverdeado ou dourado, com ou sem ramificações laterais delgadas semelhantes a rizóides, com ou sem células leveduriformes (oídios); zigospórangios e azigospórangios não observados.

No micélio aéreo da linhagem SPC 2039, foram observadas algumas vezes hifas em processo de degeneração que tinham o interior preenchido por estruturas cilíndricas catenuladas semelhantes a artrósporos, com conteúdo de aspecto vacuolar. Devido à

grande dificuldade de obtenção de esporângios intactos desta linhagem a partir de culturas com 5 dias de incubação a 25°C, foram preparadas lâminas de colônias com 3 dias de crescimento a 20 e a 25°C para a medição e ilustração dos esporângios.

Foi realizado um amplo estudo taxonômico entre linhagens de *Mucor hiemalis* Wehmer e diversas outras espécies de *Mucor* consideradas proximamente relacionadas a esta espécie, abordando os aspectos morfológicos (coloração, tamanho e forma das estruturas), fisiológicos (meios de cultivo e temperaturas diferentes) e reprodutivos (intercruzamento entre as linhagens), com o objetivo de se produzir uma classificação taxonômica não apenas baseada na morfologia, mas, que estivesse amparada pelo relacionamento filogenético entre as espécies, caracterizado pela completa formação de zigospórangios (SCHIPPER, 1973).

Como resultado deste estudo, chegou-se à conclusão de que a grande maioria das linhagens analisadas pertenciam à espécie *M. hiemalis*, sendo criados os táxons *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*, *Mucor hiemalis* f. *silvaticus*, *Mucor hiemalis* f. *corticulus* e *Mucor hiemalis* f. *luteus*, cada um dos quais sendo relacionado a uma linhagem tipo ou neótipo. Além disso, a relação de proximidade entre *Mucor hiemalis* Wehmer e *Mucor genevensis* Lendner foi estabelecida, devido à grande similaridade morfológica que estas espécies apresentam entre si, mas com o grande diferencial de *M. genevensis* produzir obrigatoriamente zigospórangios homotáticos (SCHIPPER, 1973).

Nenhuma das linhagens estudadas: SPC 2037, SPC 2038, SPC 2039, SPC 2040 e SPC 2041, foi capaz de se desenvolver após cultivo a 37°C por sete dias, caso contrário, seria um indício inicial de pertencerem à espécie *Mucor indicus* Lendner, que é morfológicamente semelhante a *Mucor hiemalis* Wehmer (SCHIPPER, 1978).

*Mucor hiemalis* Wehmer com suas quatro formas aceitas até momento, é considerada uma espécie de grande variabilidade morfológica, de maneira que a distinção entre as formas é basicamente feita através do tamanho e forma dos esporangiósoros. A linhagem neótipo de *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (CBS 201.65) apresentou esporangiósoros elípticos, plano-convexos, contendo granulação esparsa e tamanho variável de 5,7-8,7 x 2,7-5,4 µm (SCHIPPER, 1973). As características exibidas pelas cinco linhagens descritas acima estão de acordo com a descrição de SCHIPPER (1973) para o táxon *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*, embora algumas tenham apresentado tamanho de esporangiósoros levemente superiores.

*Mucor hiemalis* Wehmer, provavelmente a forma *hiemalis*, foi isolado inúmeras vezes de amostras de solo de diversos municípios paulistas (TRUFEM, 1978; 1981a) e de fezes de mamíferos herbívoros do Parque Zoológico de São Paulo (TRUFEM, 1984; TRUFEM & VIRIATO, 1985), podendo ser considerado como a espécie mais comum do gênero em solos paulistas; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1989) o isolaram de folhas submersas de *Ficus microcarpa* no PEFI; ANTUNES *et al.* (1993) e SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1998) obtiveram-no de amostras de solo e de água, solo e folhas, respectivamente, da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba.

*Mucor hiemalis* f. *hiemalis* foi isolado de amostras de solo no PEFI (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 1996), de amostras de solo, água e folhas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ, 1997), de solo da Ilha dos *Eucaliptus* na Represa do Guarapiranga (SANTOS *et al.*, 1998), de solo da Estação Ecológica Juréia-Itatins (RUEGGER *et al.*, 2002), de fezes de mamíferos herbívoros (ALVES *et al.*, 2002b) e de solo e folheto de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006).

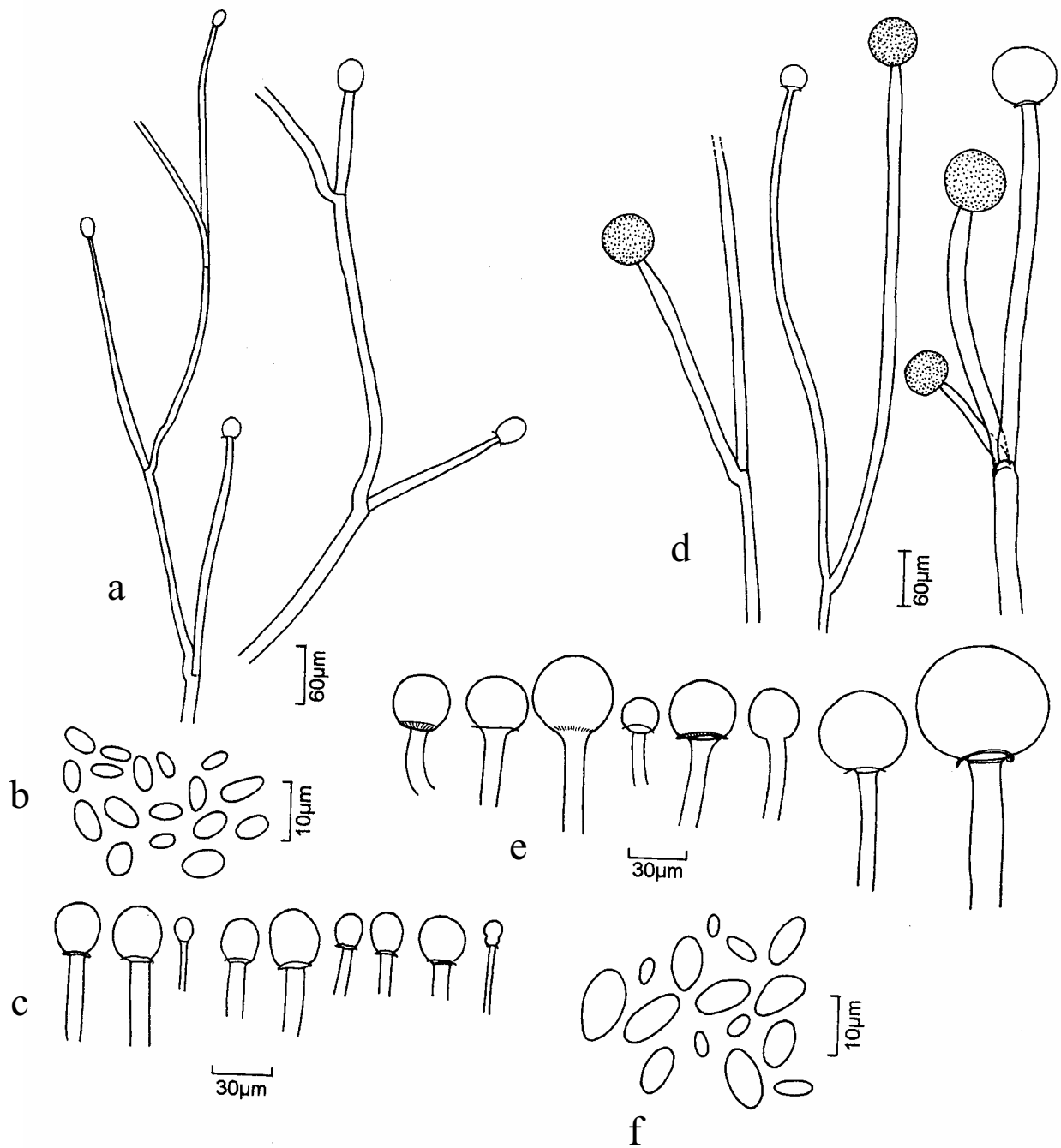


Figura 18. *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. SPC 2037: a) esporangióforos; b) esporangiósposos; c) columelas. SPC 2038: d) esporangióforos; e) columelas; f) esporangiósposos.



Figura 19. *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. SPC 2038: a) esporangióforo com esporângio; b) e c) esporangióforos com columelas; d) esporangiósoros.

*Mucor hiemalis* Wehmer f. *luteus* (Linnemann) Schipper, *Studies in Mycology* 4:33. 1973.

Registro das linhagens: SPC 2042, solo da 3ª coleta (28/05/2003), local 1, em MA com  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); SPC 2043, SPC 2044 e SPC 2045, solo da 3ª coleta, local 1, em MA com  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ); SPC 2046, solo da 3ª coleta, local 1, em MA com  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ); SPC 2047, solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 1, em MA com  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 20 e 21.

Colônia com 5-7 dias em SMA, com ou sem forte cheiro de fermento de pão, verso bege claro alaranjado ou laranja fosco devido à presença de micélio esbranquiçado (idem com 25-30 dias), ou contendo uma região central, com cerca de 50 mm de área e até 14 mm de altura, de micélio algodinoso laranja-acinzentado pontilhado em cinza-grafite e uma região periférica alaranjada de 8 mm de altura com ou sem setores de micélio mais denso e esbranquiçado, reverso laranja a laranja intenso (pêssego), idem com 25-30 dias ou amarelo manga, até 90 mm de área e até 14 mm de altura; esporangióforos ramificados simpodialmente, septados ou não, às vezes levemente curvos, 25-5.750  $\mu\text{m}$  de comprimento, 5,6-18,4 (22,5)  $\mu\text{m}$  de largura basal e 3,5-13,8 (20)  $\mu\text{m}$  de largura apical; esporângios globosos levemente aplanados, com paredes altamente difluentes, de coloração âmbar a castanha acinzentada ou esverdeada, 23,7-80 x 22,5-85  $\mu\text{m}$ ; columelas globosas levemente aplanadas, esféricas ou elipsóides, com ou sem colarete, com ou sem conteúdo granuloso, hialino-esverdeadas (menores) a levemente acinzentadas (maiores), 12,5-66,3 x 11,3-67,5  $\mu\text{m}$ ; esporangiósporos elípticos estreitos, às vezes plano-convexos, alguns levemente curvos, lisos, com ou sem conteúdo granulosa, verdes claros, 3,2-13,6 x 1,7-6,4  $\mu\text{m}$ ; clamidósporos catenulados, isolados, apicais ou intercalares, presentes ou ausentes no micélio aéreo, 7,2-30 x 6,2-21,7  $\mu\text{m}$ ; micélio submerso com conteúdo verde oliva ou amarelo dourado, às vezes terminando em ramificações delgadas sem células leveduriformes (oídios); zigospórângios e azigospórângios não observados.

Com 5 dias de crescimento a 25°C, houve quase completa ausência de esporângios intactos das linhagens SPC 2046 e SPC 2047. As medidas e ilustrações dos esporângios foram obtidas de colônias com 3 dias de crescimento a 20°C. As linhagens SPC 2042, SPC 2043, SPC 2044, SPC 2045, SPC 2046 e SPC 2047 não foram capazes de crescer na

temperatura de 37°C por 7 dias. A linhagem SPC 2044 apresentou colônia com verso e reverso amarelado, 30 x 26 mm de área, até 1 mm de altura e esporulação nula.

De maneira geral, as características exibidas por estas seis linhagens conferem com a descrição da linhagem tipo de *Mucor hiemalis* f. *luteus*, CBS 243.35, que possui esporangiósporos variando de elípticos estreitos a aproximadamente fusiformes medindo 3,3-9,5 x 1,4-4 µm e com a linhagem CBS 567.70 A, cujos esporangiósporos mediram 1,8-13,8 x 0,9-5,4 µm (SCHIPPER, 1973).

*Mucor hiemalis* f. *luteus* foi previamente isolado de amostras de solo do PEFI (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 1996), de fezes de mamíferos herbívoros (ALVES *et al.*, 2002b) e de solo e folheto de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.*, 2006).

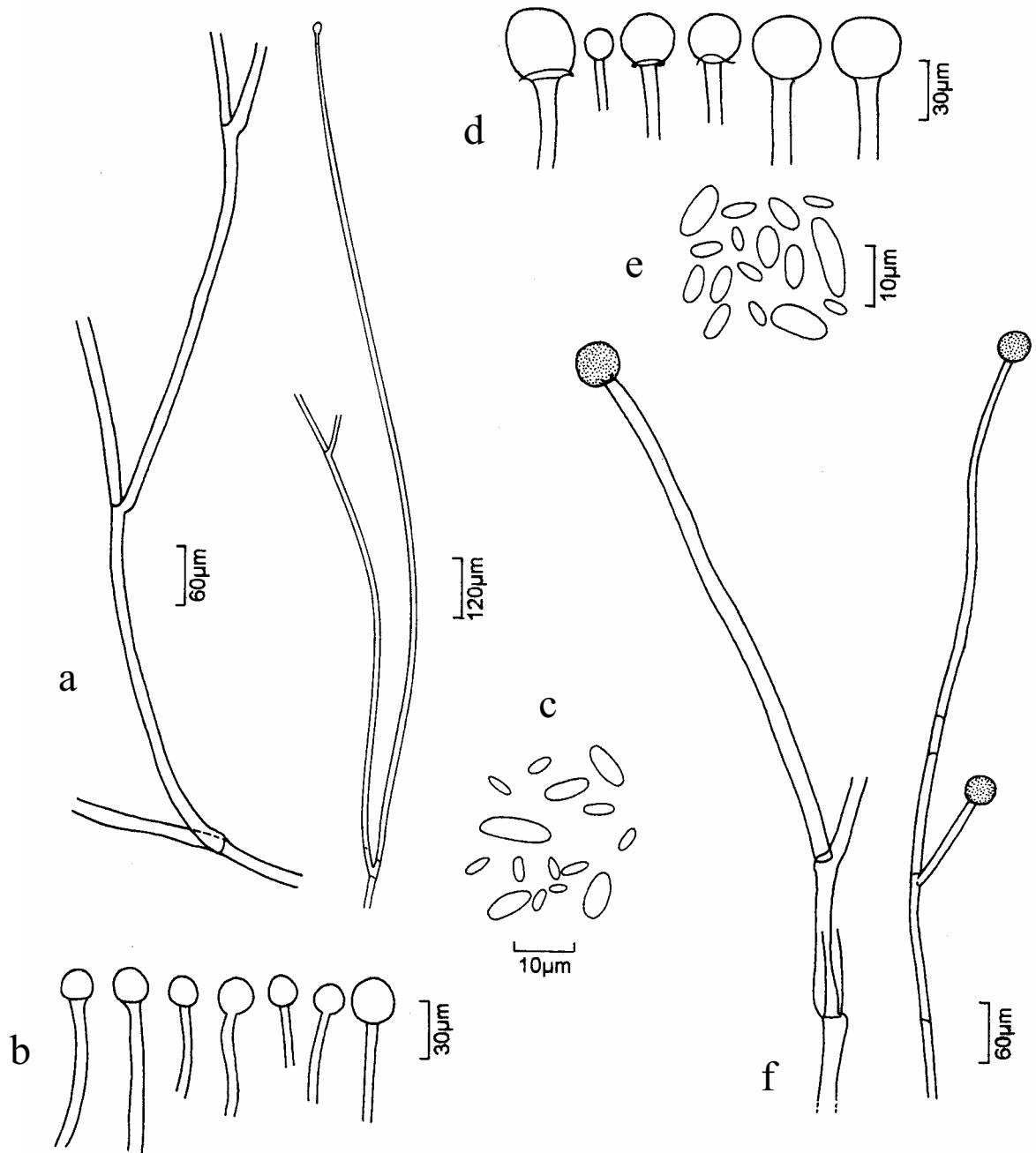


Figura 20. *Mucor hiemalis* f. *luteus*. SPC 2044: a) esporangióforos; b) columelas; c) esporangiosporos. SPC 2045: d) columelas; e) esporangiosporos; f) esporangióforos.



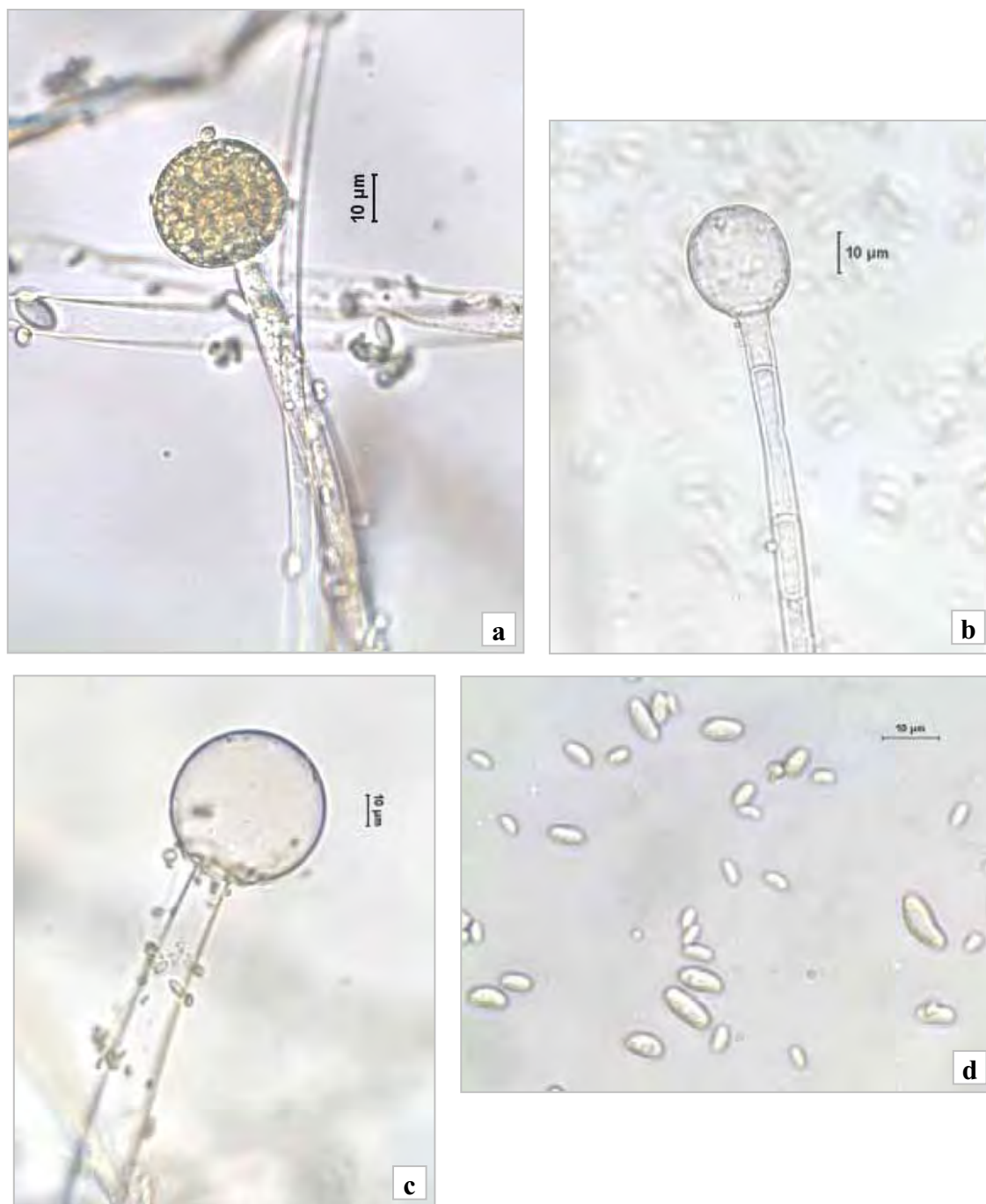


Figura 21. *Mucor hiemalis* f. *luteus* SPC 2042: a) esporangióforo com esporângio; b) e c) esporangióforos com columelas; d) esporangiósoros.

*Mucor racemosus* Fresenius f. *racemosus*, Studies in Mycology 12:20. 1976.

Registro da linhagem: SPC 2048, de solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 1, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 22 e 23.

Colônia com 7 dias em SMA apresentando micélio pouco denso, verso cinza claro esverdeado, pulverulento, pontilhado em cinza grafite e reverso cinza alaranjado, verso e reverso idem com 25-30 dias, 90 mm de área e 5 mm de altura, algumas colônias apresentaram setores com micélio alaranjado, mais espesso e mais elevado (7 mm); esporangióforos ramificados simpodialmente, curtos ou longos, septados ou não, 35-1.020  $\mu\text{m}$  de comprimento, 7,5-13,8  $\mu\text{m}$  de largura basal e 6,3-11,3  $\mu\text{m}$  de largura apical; esporângios globosos aplanados, com parede difluente ou persistente, castanhos claros (âmbar), castanhos escuros a quase negros, 27,5-90 x 30-95  $\mu\text{m}$ ; columelas elipsóides ou globosas aplanadas, maioria com colarete, verdes hialinas a acinzentadas, 15-51,2 x 15-42,5  $\mu\text{m}$ ; esporangiósporos elípticos largos, verdes claros a levemente castanhos, 4,5-10,9 x 3,6-7,7  $\mu\text{m}$ ; clamidósporos isolados, catenulados e apicais, 6,2-25 x 7,5-18,7  $\mu\text{m}$ ; micélio submerso com conteúdo verde oliva e ramificações terminando em células leveduriformes (oídios); zigospórangios e azigospórangios não observados.

No aspecto geral, certas características de *Mucor racemosus* Fresen. tais como altura das colônias, ramificações e largura dos esporangióforos, coloração dos esporângios, columelas elipsóides a globosas, esporangiósporos elípticos e ausência de crescimento a 37°C, assemelham-se às de *Mucor hiemalis* Wehmer, como pode ser visto comparando-se as descrições de SCHIPPER (1973; 1976). Porém, *M. racemosus* tipicamente apresenta colônias em tons de cinza, esporangióforos longos e curtos, os maiores esporângios com cerca de 90  $\mu\text{m}$ , columelas com cerca de 55 x 37  $\mu\text{m}$  e clamidósporos presentes nos esporangióforos e nas columelas (SCHIPPER, 1976).

A linhagem SPC 2048 não cresceu depois de incubada a 37°C por 7 dias, mas cresceu e esporulou quando foi novamente incubada a 25°C por mais 7 dias. As características das estruturas observadas estão de acordo com descrição de SCHIPPER (1976) para *Mucor racemosus* f. *racemosus*, exceto pelo fato que a linhagem não

apresentou clamidósporos nos esporangióforos nem nas columelas. Contudo, esta característica pode ser tardia ou mesmo rara em algumas linhagens (SCHIPPER, 1970).

ANTUNES *et al.* (1993) isolaram *M. racemosus* de solo da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. Considerando o nível varietal, *Mucor racemosus* f. *racemosus* foi isolado de amostras de solo provenientes de diversos municípios paulistas (TRUFEM, 1978); SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (1996) o isolaram de amostras de solo e VIRIATO (2003) o obteve de amostras de fezes de mamíferos herbívoros, ambos no PEFI; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (2006) isolaram-no de solo e de folheto de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP.

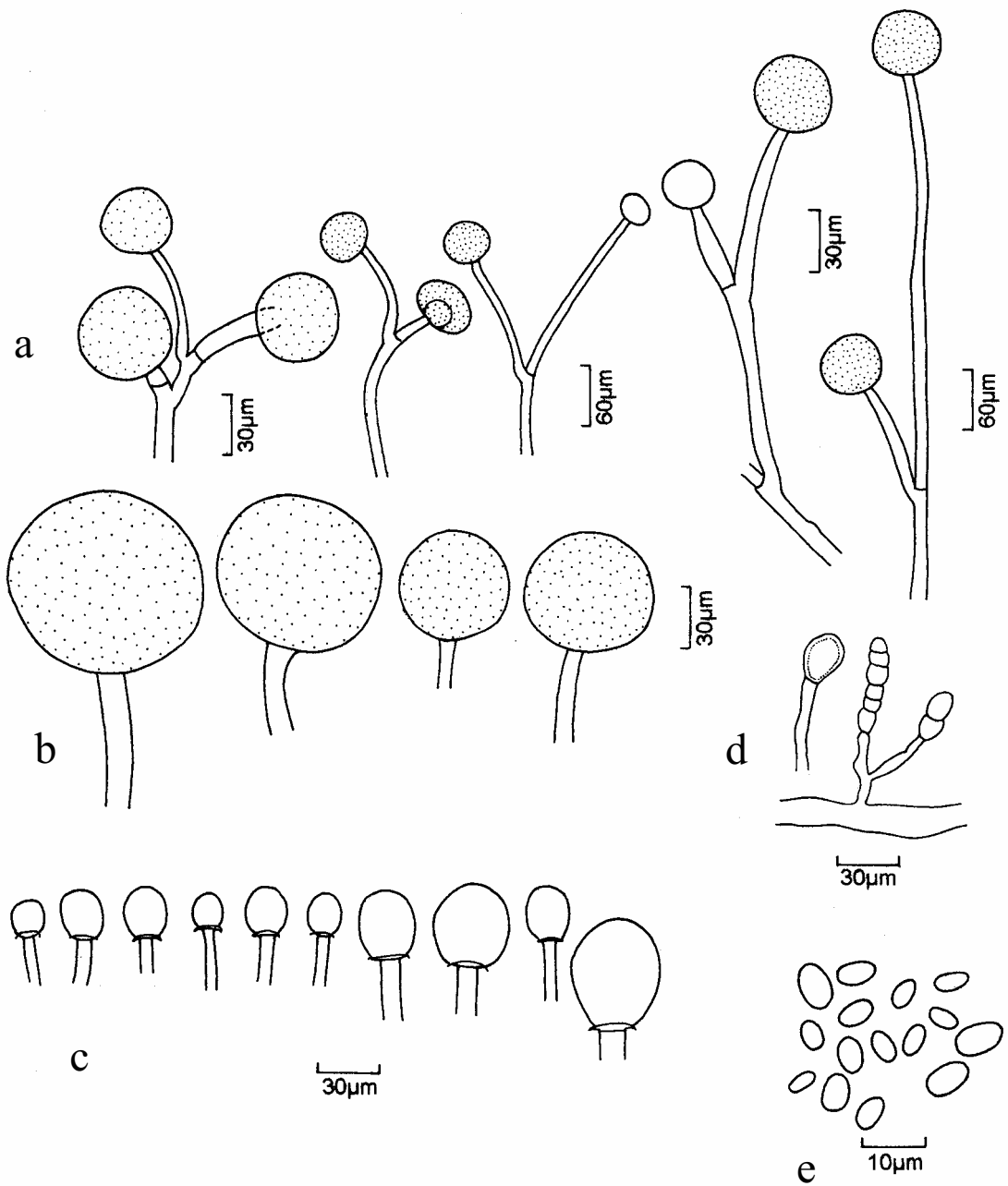


Figura 22. *Mucor racemosus* f. *racemosus* SPC 2048: a) esporangióforos; b) esporângios; c) columelas; d) clamidósporos; e) esporangiósporos.

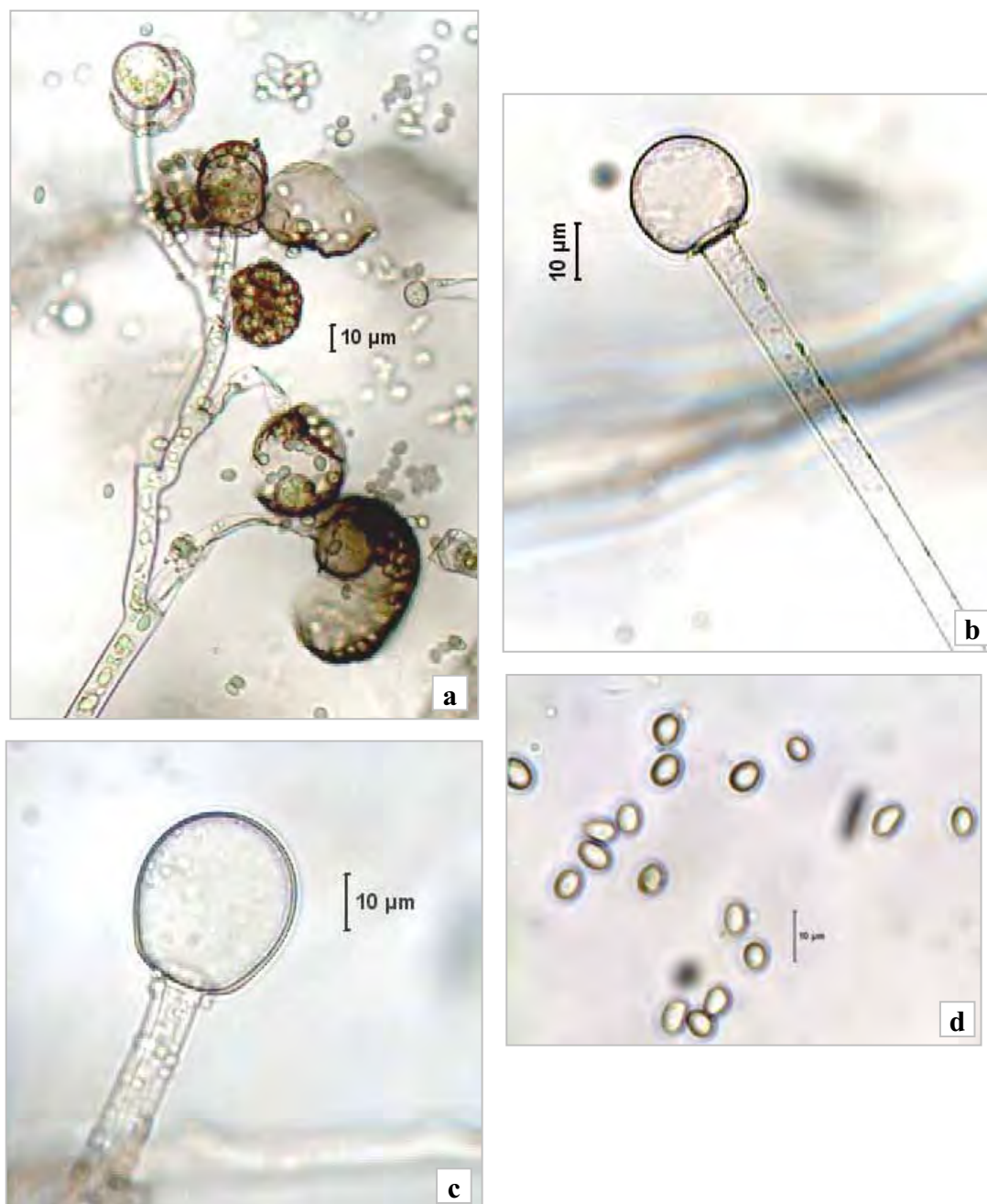


Figura 23. *Mucor racemosus* f. *racemosus* SPC 2048: a) ramificações simpodiais curtas; b) e c) esporangióforos longos com columelas; d) esporangiósoros.

#### 5.2.4. Gênero *Rhizopus* Ehrenberg

O gênero *Rhizopus* Ehrenberg foi criado em 1820 (SCHIPPER, 1984), pertence à família Absidiaceae (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996) e caracteriza-se por colônias de crescimento rápido; micélio mais ou menos hialino; presença de estolões; esporangióforos opostos aos rizóides, isolados ou em grupos, não ramificados, ocasionalmente divididos no topo; esporângios multiesporados, com columela e apófise presentes, esverdeados a amarronzados; esporangiósporos globosos, subglobosos, elipsóides e angulares; zigospórangios formados no micélio aéreo, com espinhos e verrugas, em células suspensórias opostas, isogâmicas não ornamentadas (SCHIPPER, 1984; DOMSCH *et al.*, 1993). A espécie tipo é *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. (SCHIPPER, 1984).

Os mais recentes trabalhos de revisão sobre o gênero *Rhizopus* são os de SCHIPPER (1984) e de SCHIPPER & STALPERS (1984), mas foram publicados novos táxons avulsos (WEITZMAN *et al.*, 1996; ZHENG & CHEN, 1998).

*Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs, Verh. K. Akad. Wet., Sect. 2, 4:16.1895.

Registro das linhagens: SPC 2049 e SPC 2050, solo da 4ª coleta (30/06/2003), local 1, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (200 mg L<sup>-1</sup>). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 24 e 25.

Colônia com 7 dias em SMA, verso branco levemente acinzentado e intensamente pontilhado com grandes esporângios negros, 90 mm de área e 15 mm de altura, reverso branco acinzentado, às vezes levemente amarelado; esporangióforos surgindo em estolões na parte ligada ao substrato por rizóides, alguns surgindo de modo quase verticilado na superfície de vesículas que se formam no ápice de largas hifas, outros surgindo de ramificações dicotômicas, marrons avermelhados tornando-se verdes hialinos na região próxima ao substrato, alguns inteiramente verdes hialinos, 370-1.600 µm de comprimento, 7,5-20 µm de largura basal e 15-30 µm de largura apical; esporângios globosos, apofisados, cinzas oliváceos quando jovens e de cinzas a negros quando maduros, com parede persistente lisa, 50-160 x 60-165 µm; columelas elipsóides de base truncada a globosas, sem colarete ou com grandes sobras de parede esporangial aderidas à base,

castanhas avermelhadas ou hialino esverdeadas, 27,5-120 x 37,5-120  $\mu\text{m}$ ; esporangiósporos de parede espessa, com estrias pouco evidentes, verdes claros levemente castanhos (individuais), cinzas esverdeados em grupo, alguns aderidos em duplas, 5,5-12 x 4-9  $\mu\text{m}$ ; clamidósporos ausentes; micélio submerso contendo rizóides; zigosporângios e azigosporângios não observados.

Com base em aspectos morfológicos, biométricos e na temperatura de incubação das culturas, o gênero *Rhizopus* Ehrenberg pode ser classificado no grupo *R. microsporus*, no grupo *R. stolonifer* e na espécie *R. oryzae* (SCHIPPER, 1984).

Em relação às temperaturas de incubação para a linhagem SPC 2049 foi observado o seguinte. Após sete dias a 45°C desenvolvendo-se pequenas colônias que atingiram em média 30 x 35 mm de área, no máximo 1 mm de altura, verso bege claro, com micélio aéreo quase inexistente de aspecto pulverulento contendo hifas extremamente delgadas e curtas, ausência total de esporulação, reverso bege claro e micélio submerso pouquíssimo desenvolvido, quando visto em microscópio óptico diretamente da colônia. As mesmas colônias foram incubadas por igual período a 25°C, apresentando crescimento de micélio aéreo e esporulação praticamente idênticos à condição normal. A 36°C por 7 dias, desenvolveram-se colônias com 90 mm de área, 8 mm de altura, verso branco com micélio pouco denso, reverso levemente amarelado, esporângios com desenvolvimento retardado, em pequeno número em relação ao observado quando a linhagem cresceu a 25°C, ausência de esporangiósporos livres, indicando que o processo de esporulação foi prejudicado. As mesmas colônias foram incubadas a 25°C, e quase restabeleceram o crescimento e a esporulação à condição mencionada na descrição da linhagem, embora os esporângios produzidos tenham sido visivelmente menores.

Após 7 dias de crescimento da linhagem SPC 2050 a 45°C, o crescimento das colônias atingiu em média 20 x 26 mm de área e no máximo 1 mm de altura, sendo que os demais aspectos foram compatíveis aos da linhagem de SPC 2049. As mesmas colônias quando incubadas a 25°C restabeleceram a capacidade de crescimento e esporulação quase idênticas às normais. A 36°C desenvolveram-se colônias semelhantes às da linhagem de SPC 2049 na mesma condição de temperatura, havendo completo restabelecimento da condição normal após nova incubação a 25°C.

De acordo com SCHIPPER (1984), *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligts equivale a *Rhizopus arrhizus* Fischer, à antiga denominação *Mucor arrhizus* (Fischer)

Hagem e a outros 28 sinônimos, sendo assim a espécie com o maior número de sinônimas do gênero. Isto se deve ao fato de que grande parte das espécies de *Rhizopus* descritas foi isolada de grande variedade de processos fermentativos de cereais, utilizados tradicionalmente no preparo de alimentos e bebidas por povos asiáticos desde tempos antigos (INUI *et al.*, 1965). O cultivo sob condições tão diferentes acabou produzindo variações morfológicas e/ou fisiológicas nas linhagens, de modo que o isolamento e a análise de tais linhagens encorajou muitos taxonomistas a proporem novas espécies e variedades (INUI *et al.*, 1965). Entretanto, após amplo estudo comparativo de diversos táxons sob condições controladas e a realização de testes de cruzamento, chegou-se à conclusão que a maioria das espécies propostas não podiam ser separadas de *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs (SCHIPPER, 1984).

Há diversos relatos de estudos anteriores em que *R. oryzae* foi encontrado no Brasil. TRUFEM (1978) obteve-o de amostras de solo de diversos municípios paulistas, identificando-o como *R. arrhizus*, conforme a classificação taxonômica aceita na época; e em continuação aos estudos foram isoladas novas linhagens de *R. arrhizus* e *R. oryzae* (TRUFEM, 1981b); PORTO *et al.* (1986) isolaram *R. oryzae* de um paciente diabético e acometido por tuberculose reativada, que havia sido internado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, identificando-o como o agente causal da zigomicose sistêmica com comprometimento rinocerebral que afetou o paciente levando-o ao óbito; SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1997; 1998) isolaram-no de amostras de água, solo e folhas da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba; SANTOS *et al.* (1998) isolaram-no de amostras de solo da Ilha dos Eucaliptos na Represa do Guarapiranga; RIBEIRO *et al.* (2003) obtiveram-no de amostras de fubá e de farinha de milho utilizados na alimentação humana e comercializados em Recife, PE; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (2006) isolaram-no de solo de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP.



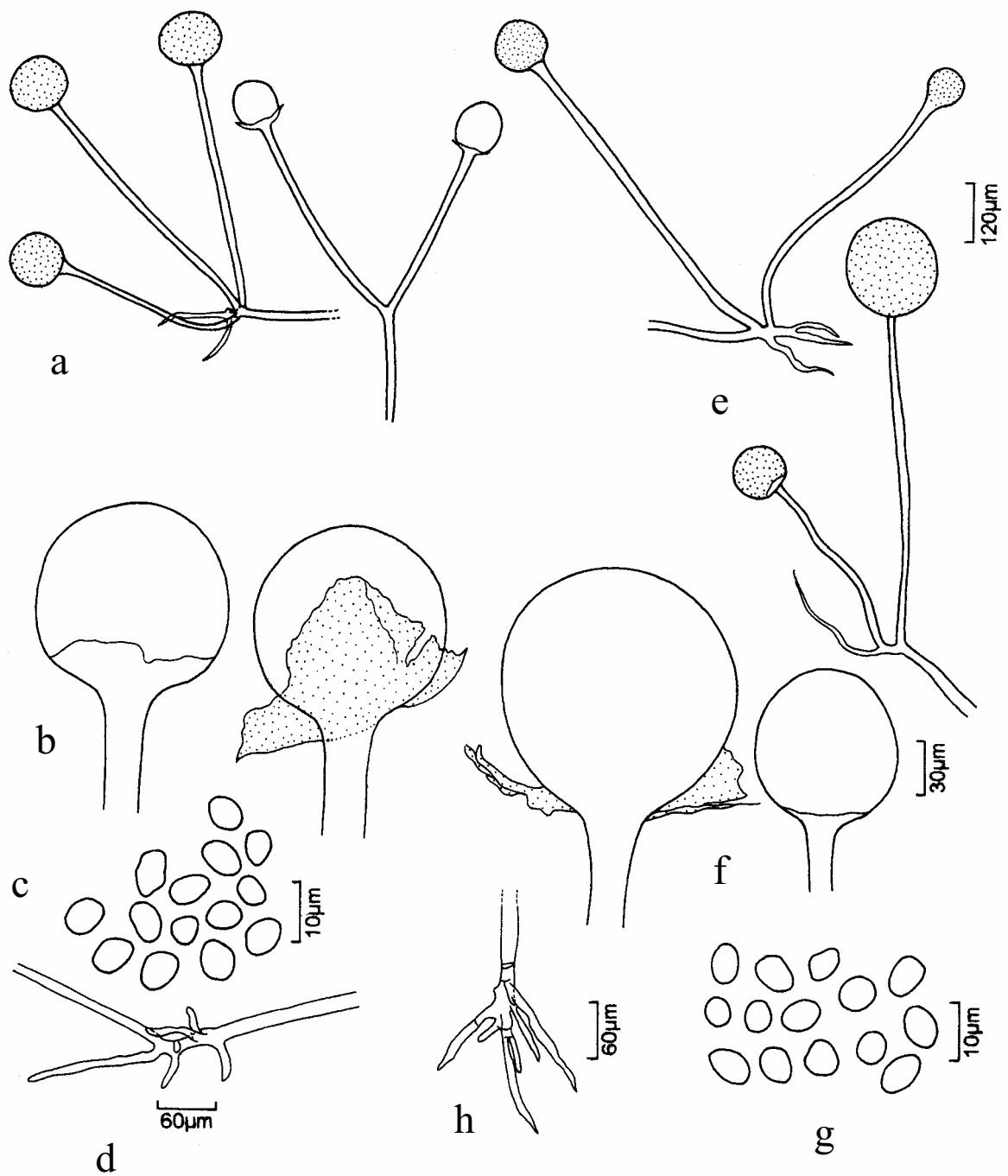


Figura 24. *Rhizopus oryzae*. SPC 2049: a) esporangióforos; b) columelas; c) esporangiósporos; d) rizóide. SPC 2050: e) esporangióforos; f) columelas; g) esporangiósporos; h) rizóide.



Figura 25. *Rhizopus oryzae* SPC 2049: a) ramificação com esporangióforos e rizóide; b) esporangióforos com esporângios; c) esporangiósporos; d) e e) esporangióforos com columelas.

### 5.2.5. Gênero *Zygorrhynchus* Vuillemin

Segundo DOMSCH *et al.* (1993), a ortografia deste gênero é escrita com duas letras “r” no lugar da grafia comumente encontrada: *Zygorhynchus*.

O gênero *Zygorrhynchus* Vuillemin pertence à família Mucoraceae, foi criado em 1903 e tem como características principais: colônias brancas a cinza-escuras, cotonosas; esporangióforos ramificados irregularmente, contendo zigospórângios e esporângios; esporângios multiesporados, de parede difluente ou persistente, sem apófise e com columela; esporangiósoros pequenos, de aspecto liso ou com textura leve, hialinos ou esverdeados; espécies homotálicas; zigospórângios negros e ornamentados; células suspensórias desiguais, uma grande e inflada e outra pequena e separada desta por um septo (HESSELTINE *et al.*, 1959; DOMSCH *et al.*, 1993). A espécie tipo é *Zygorrhynchus heterogamus* (Vuillemin) Vuillemin (DOMSCH *et al.*, 1993).

Os mais importantes estudos taxonômicos sobre *Zygorrhynchus* são as revisões de HESSELTINE *et al.* (1959) e de SCHIPPER (1986).

*Zygorrhynchus moelleri* Vuillemin, Bulletin de la Societé Mycologique de France 19:117. 1903.

Registro da linhagem: SPC 2051, solo da 2ª coleta (18/03/2003), local 2, em MA com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (100 mg L<sup>-1</sup>). Coletor: J.I. de Souza.

Figuras: 26 e 27.

Colônia com 5 dias em SMA, verso branco-acinzentado densamente pontilhado em preto, variando do cinza claro areia ao cinza grafite com 25-30 dias, micélio de aspecto seco, 90 mm de área, 9 mm de altura, 12 mm de altura com 25-30 dias, reverso bege claro suavemente esverdeado; esporangióforos em ramificações simpodiais levemente curvas, alguns extremamente curtos dando o aspecto séssil aos esporângios, 31,2-250 µm de comprimento, 3,7-12,5 µm de largura basal e 2,5-12,5 µm de largura apical; esporângios globosos, de parede persistente lisa, castanhos claros brilhantes (âmbar), 15-47,5 x 15-46,2 µm; columelas aplanadas, verdes hialinas a castanhas claras, 9-30 x 19,5-44,2 µm; esporangiósoros elípticos, alguns curvos, com aspecto de grãos de feijão, verdes claros,

geralmente com gotículas de tom verde-oliva nas extremidades, 3,7-6,7 (11,2) x 2,2-3,7  $\mu\text{m}$ ; clamidósporos raramente encontrados; micélio submerso com conteúdo verde oliva refringente; zigospórangios em grande quantidade, globosos a levemente aplanados, castanhos claros (âmbar) quando jovens, castanhos escuros avermelhados a negros quando maduros, 30-45,2 x 31,6 x 47,2  $\mu\text{m}$ , com espinhos de 5-7 (10)  $\mu\text{m}$ ; células suspensórias desiguais, uma delgada, alongada e reta e a outra inflada e encurvada na direção da primeira; homotático; azigospórangios não observados.

A linhagem SPC 2051 exibiu as principais características do táxon *Zygorrhynchus moelleri* Vuillemin, tais como: columelas tipicamente aplanadas, esporangiósporos cilíndrico-elipsóides geralmente com uma gotícula em cada extremidade, zigospórangios homotáticos com células suspensórias desiguais, concordando perfeitamente com a descrição apresentada por HESSELTINE *et al.* (1959) e complementada por SCHIPPER (1986).

HESSELTINE *et al.* (1959) isolaram *Z. moelleri* de amostras de solo provenientes de diversos países, inclusive do Brasil, considerando-o como espécie cosmopolita e a mais comum do gênero; TRUFEM (1978) isolou-o de amostras de solo de municípios paulistas; ANTUNES *et al.* (1993) e SCHOENLEIN-CRUSIUS & MILANEZ (1997; 1998) obtiveram-no de amostras de solo e de água, solo e folhas, respectivamente, da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba; SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al.* (2006) isolaram-no de solo de regiões afetadas por poluição aérea industrial em Cubatão, SP.

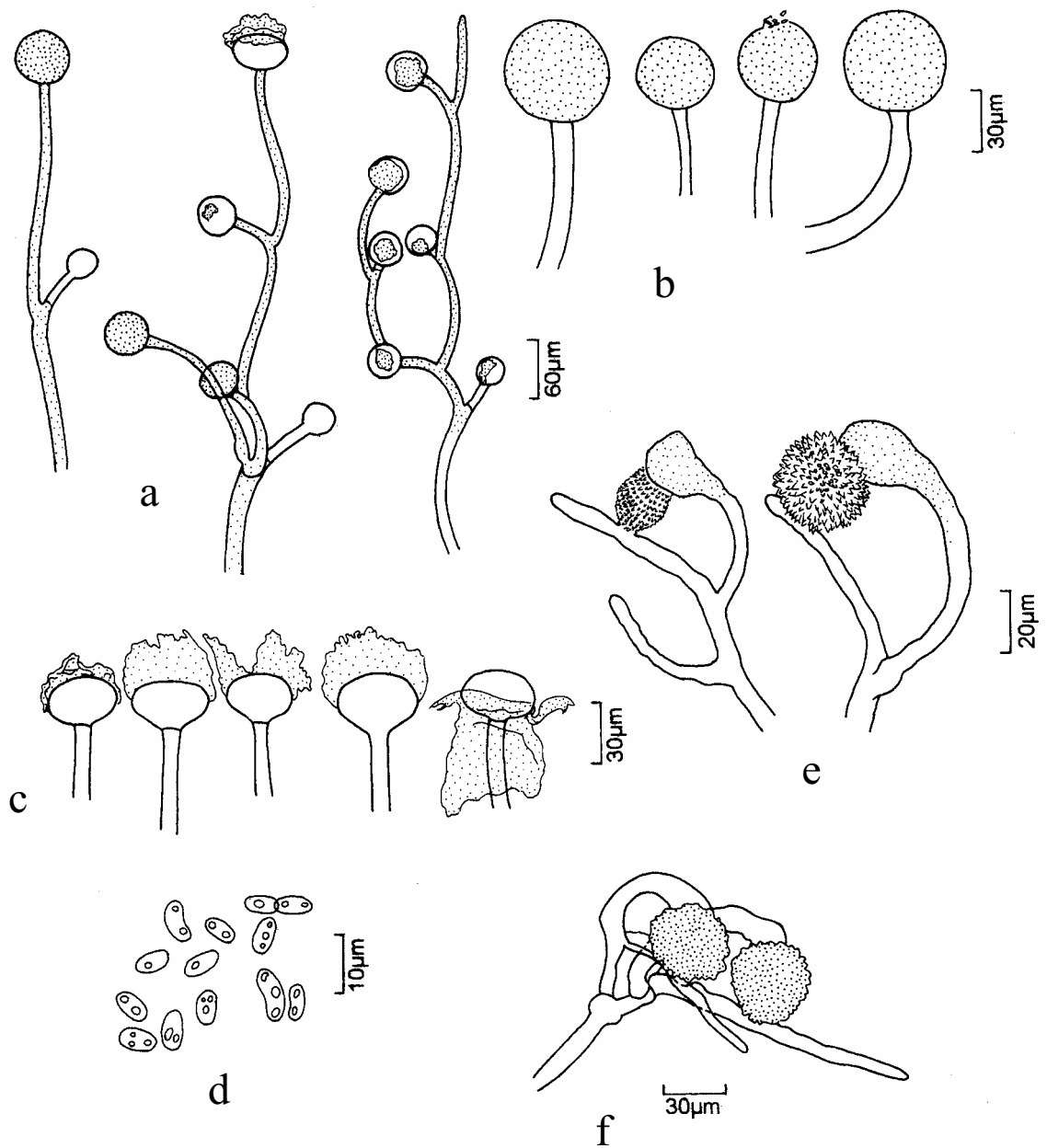


Figura 26. *Zygorrhynchus moelleri* SPC 2051: a) esporangióforos; b) esporângios; c) columelas; d) esporangiósoros; e) e f) zigospórângios heterogâmicos.



Figura 27. *Zygorrhynchus moelleri* SPC 2051: a) esporangióforo longo com esporângio; b) esporangióforo com columela; c) esporangiósporos; d) zigospórangios; e) zigospórângio.

Em relação à identificação taxonômica da maioria das linhagens de Mucorales obtidas neste estudo, ocorreram dificuldades para a obtenção de esporângios intactos em preparações de material fúngico sobre lâminas, tornando árdua a tarefa de medi-los e ilustrá-los. De modo geral, a grande maioria dos esporângios maduros rompe-se ao simples contato com a água ou mesmo com o ar, especialmente os de algumas linhagens de *Mucor*, restando poucos ou somente os muito jovens, que não podem ser tomados como referência para a realização de medições adequadas. Por serem filamentos extremamente delgados e delicados, os esporangióforos também apresentaram certos problemas, tornando-se muitas vezes um emaranhado indistinguível depois das lâminas estarem prontas.

Foram necessários cultivos constantes das linhagens, alterações nas condições de cultivo, tais como a temperatura e tempo de incubação, além da elaboração de diversas lâminas, a fim de obter esporângios e esporangióforos mais representativos. Para amenizar estes problemas, SCHIPPER (1975) sugeriu que as culturas fossem desenvolvidas em cristalizadores para garantir o desenvolvimento intacto de esporangióforos e esporângios, os quais podem ser observados e medidos diretamente nas colônias com o auxílio de um estereomicroscópio. No tocante às demais estruturas de interesse taxonômico, de modo geral não apresentaram grandes obstáculos à complementação das características necessárias para compor as fichas de identificação das linhagens, permanecendo relativamente intactas após as preparações de lâminas.

### 5.3. Curvas de Crescimento e Produção de Biomassa

De acordo com os resultados da análise de variância (apêndice 1), no que se refere à produção de biomassa, todos os tratamentos analisados: linhagens, dias, pH<sub>i</sub> e linhagens x dias, revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Portanto rejeita-se a hipótese da nulidade, a produção de biomassa é igual entre as linhagens, em prol da hipótese alternativa, da diferença na produção de biomassa. A figura 28-A mostra a produção de biomassa das linhagens. As primeiras três linhagens foram previamente isoladas em MA adicionado de  $Zn(NO_3)_2$  e exibiram, em média, produção de biomassa superior às três últimas, que foram isoladas em MA acrescido de  $Pb(NO_3)_2$ . Os critérios para a escolha das duas linhagens para os ensaios de bioadsorção foram os seguintes:

- Uma das linhagens deveria ter sido isolada com MA adicionado de  $Zn(NO_3)_2$  e a outra com MA adicionado de  $Pb(NO_3)_2$ ;
- Maior capacidade de produção de biomassa em menor tempo.

*Mucor hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 foi isolado em MA adicionado de  $Zn(NO_3)_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e se destacou dentre as demais linhagens quanto à produção de biomassa, sendo assim escolhido para os ensaios subsequentes de bioadsorção. A segunda linhagem selecionada para os testes de bioadsorção foi *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040, isolado em MA adicionado de  $Pb(NO_3)_2$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), cuja produção de biomassa não diferiu estatisticamente da produção atingida por *M. bainieri* SPC 2033. Entretanto, na ocasião de escolha a linhagem SPC 2033 não havia sido identificada ao nível de espécie e por isso foi descartada das etapas seguintes.



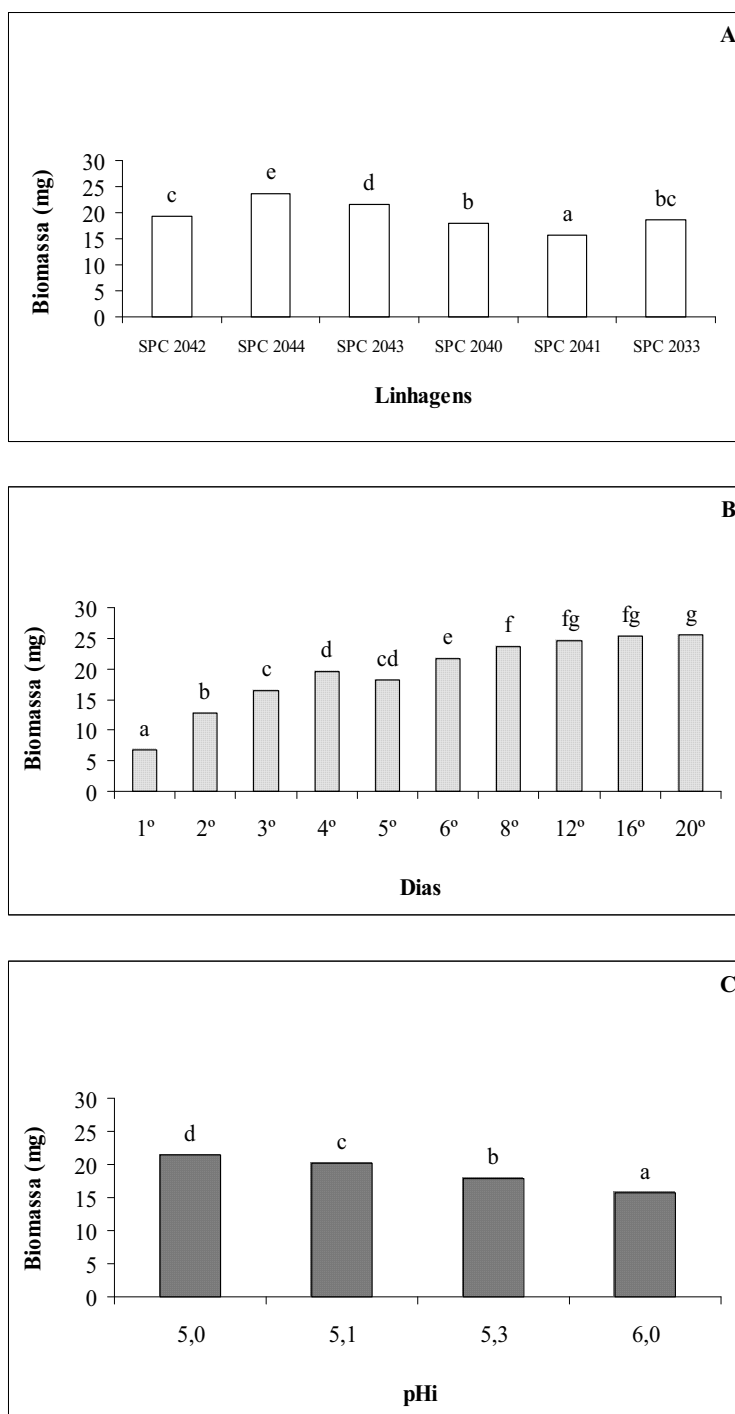


Figura 28. Produção de biomassa de *M. hiemalis* (SPC 2040, 2041, 2042, 2043 e 2044) e *M. bainieri* (SPC 2033) em 150 mL de MA líquido (2%), em função de: A) linhagens; B) dias; C) pHi 5 (SPC 2042 e SPC 2044), 5,1 (SPC 2043 e SPC 2033), 5,3 (SPC 2040) e 6 (SPC 2041). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Analisando-se de modo geral, o pico de produção média de biomassa de todas as linhagens foi atingido no 12º dia (figura 28-B), alcançando-se o mesmo efeito de produção de biomassa em comparação ao 16º e 20º dias.

Como não era o escopo estudar a influência de diferentes valores de pH sobre a produção de biomassa, o pH inicial do MA líquido não foi corrigido para um valor pré-determinado, de maneira que a oscilação natural de pH do meio de cultivo em que os fungos cresceram foi a seguinte: 5,0 para *M. hiemalis* SPC 2042 e SPC 2044; 5,1 para *M. hiemalis* SPC 2043 e *M. bainieri* SPC 2033; 5,3 para *M. hiemalis* SPC 2040 e 6,0 *M. hiemalis* SPC 2041. Contudo, foi observado que houve diferenças significativas na produção de biomassa de algumas linhagens em relação aos valores de pH.

De acordo com a figura 28-C, verifica-se que os mais baixos valores de pH<sub>i</sub> foram relacionados aos mais elevados índices de produção de biomassa, havendo a tendência de queda na produção de biomassa com o aumento do pH. A seqüência decrescente de produção de biomassa em função de aumento do pH<sub>i</sub> foi: *M. hiemalis* SPC 2042 e SPC 2044 (pH 5,0) > *M. hiemalis* SPC 2043 e *M. bainieri* SPC 2033 (pH 5,1) > *M. hiemalis* SPC 2040 (pH 5,3) > *M. hiemalis* SPC 2041 (pH 6,0).

Em estudo anterior, a linhagem de *M. hiemalis* SPC 1810, isolada da represa do Guarapiranga e mantida no acervo da Coleção de Culturas de Fungos do Instituto de Botânica, foi cultivada em MA líquido com pH inicial 5,4 (natural) ou em pH 2,0, 4,1 e 5,8 (corrigidos) e incubada de modo estático sob a temperatura de 22,5°C por período igual ao das linhagens estudadas aqui. Foram observados valores finais de pH 5,0, 2,0, 4,8 e 5,0, respectivamente, indicando que o crescimento de linhagens desta espécie pode melhor ocorrer em pH próximo de 5 (SILVA, 2002).

A concentração do íon hidrogênio pode afetar o crescimento fúngico indiretamente através de seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela ação nas superfícies celulares e é provável que se os requerimentos de nutrientes forem supridos, a maioria dos fungos pode se desenvolver bem em condições de pH entre 4 e 7, embora alguns fungos produtores de ácidos orgânicos tolerem condições de pH consideradas extremamente baixas (CARLILE & WATKINSON, 1996). A diferença observada na produção de biomassa poderia também ser atribuída à característica natural de crescimento de cada linhagem, não sendo necessariamente influenciada por uma pequena variação de pH do meio de cultivo entre 5,00 e 6,00. Em variações de pH mais acentuadas é de se

esperar que o crescimento fúngico seja favorecido ou prejudicado de maneira mais marcante, de acordo com as características fisiológicas de cada linhagem.

As curvas de crescimento das linhagens e de pHf do MA em função do tempo de incubação, são apresentadas nas figuras 29-A a 29-F. Conforme a análise estatística (apêndice 1), o pico de produção de biomassa para *M. hiemalis* SPC 2044 e SPC 2040 pode ser atribuído ao 12º e ao 8º dia, respectivamente (figuras 29-B e 29-D), não havendo diferenças significativas em relação aos dias seguintes.

Teoricamente, o crescimento de fungos filamentosos pode ser dividido em três fases: 1) fase lag, em que não ocorre crescimento aparente; 2) fase exponencial, na qual há rápido crescimento; e 3) fase de declínio, durante a qual não há crescimento, ocorrendo declínio em relação ao peso seco devido à autólise celular (MOORE-LANDECKER, 1996). De maneira geral, a coincidência da fase exponencial de crescimento das linhagens ocorreu até o 5º dia, enquanto que o início da fase estacionária pode ser atribuído do 12º dia em diante (figuras 29-A a 29-F).

O período de incubação de *M. hiemalis* e de *M. bainieri*, baseado no estudo de SILVA (2002), mostrou-se satisfatório ao desenvolvimento das linhagens, possibilitando a elaboração de curvas de crescimento sem necessidade de correções ou grandes adaptações. Todavia, foi notado que a temperatura de 28°C inicialmente utilizada por questões práticas, não foi muito favorável à produção de biomassa, levando-se em consideração que 24 mg de biomassa em 150 mL de MA líquido (160 mg L<sup>-1</sup>) foi, em média, a máxima produção de biomassa das linhagens no 12º dia (figura 28-B). A temperatura de 25°C é considerada adequada ao bom desenvolvimento de boa parte dos zigomicetos da ordem Mucorales (O'DONNELL, 1979). Por esta razão, os ensaios seqüentes para produção de biomassa com *M. hiemalis* SPC 2040 e SPC 2044 foram conduzidos em temperatura ambiente (22 a 25°C) e encerrados no 5º dia, para estarem em pleno período de crescimento exponencial das linhagens, porém antes do período relativo ao pico de produção de biomassa.

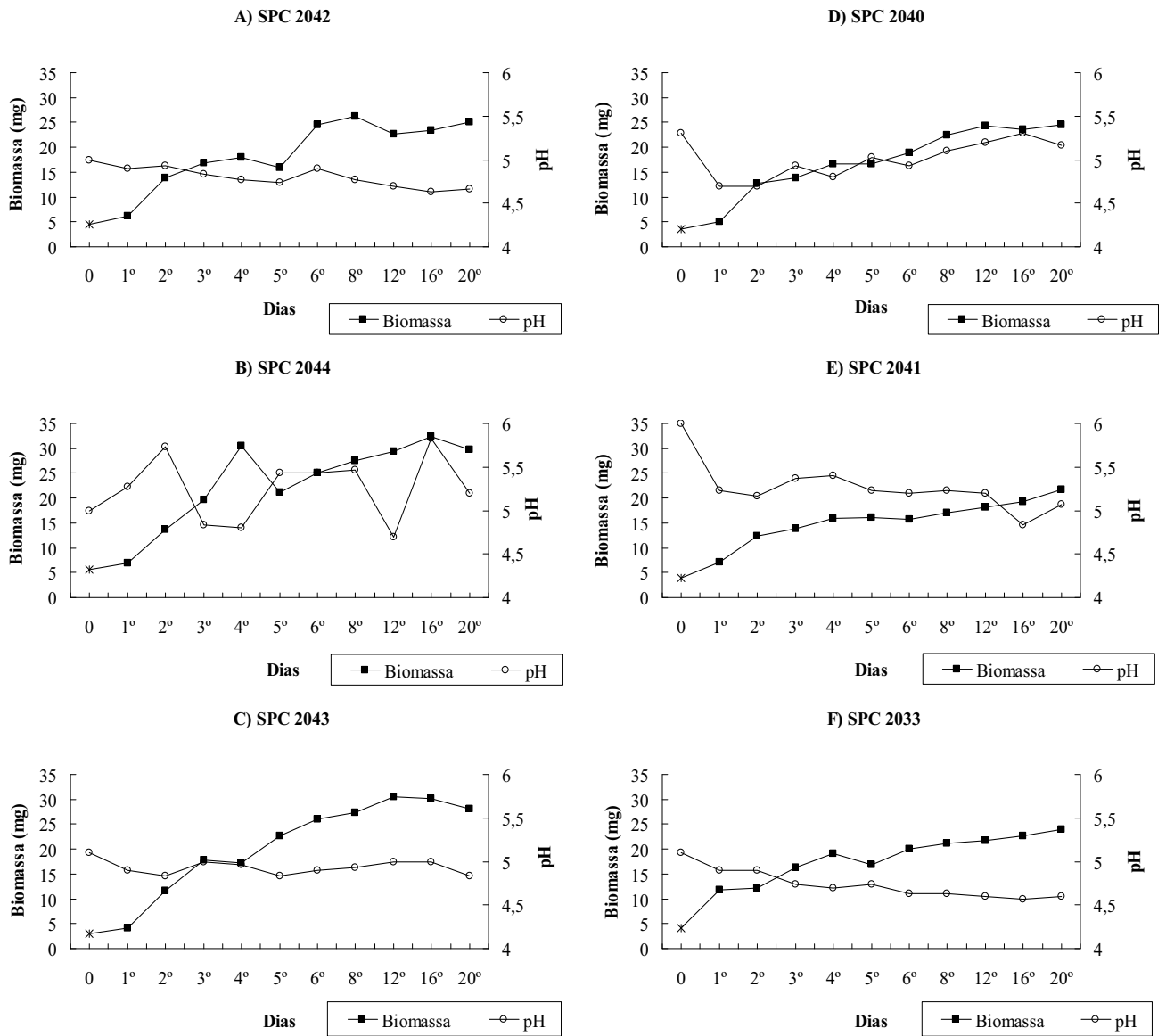


Figura 29. Curvas de crescimento e de pHf do MA líquido referentes às linhagens de *M. hiemalis*: A) SPC 2042, B) SPC 2044, C) SPC 2043, D) SPC 2040 e E) SPC 2041; e *M. bainieri*: F) SPC 2033.

Quanto aos valores de pH<sub>f</sub> do meio de cultivo, não houve diferenças significativas comparando-se todas as linhagens em relação a cada um dos 20 dias de experimentação. Conforme a figura 30, a tendência geral do pH<sub>f</sub> do MA líquido foi de queda, havendo diferenças significativas em relação ao pH<sub>i</sub>. *M. hiemalis* SPC 2044 elevou o pH do MA de 5,00 para 5,27, sendo este o mais elevado valor de pH<sub>f</sub> observado. Em comparação, o valor de pH<sub>f</sub> mais baixo foi 4,70 para *M. bainieri* SPC 2033, cujo pH<sub>i</sub> foi de 5,10.

Na análise do pH<sub>f</sub> registrado nos dias de crescimento, em relação a cada uma das linhagens, somente *M. hiemalis* SPC 2044 apresentou diferenças significativas (figura 29-B), de modo que a curva de pH<sub>f</sub> obtida alternou entre aumentos e decréscimos seguidos.

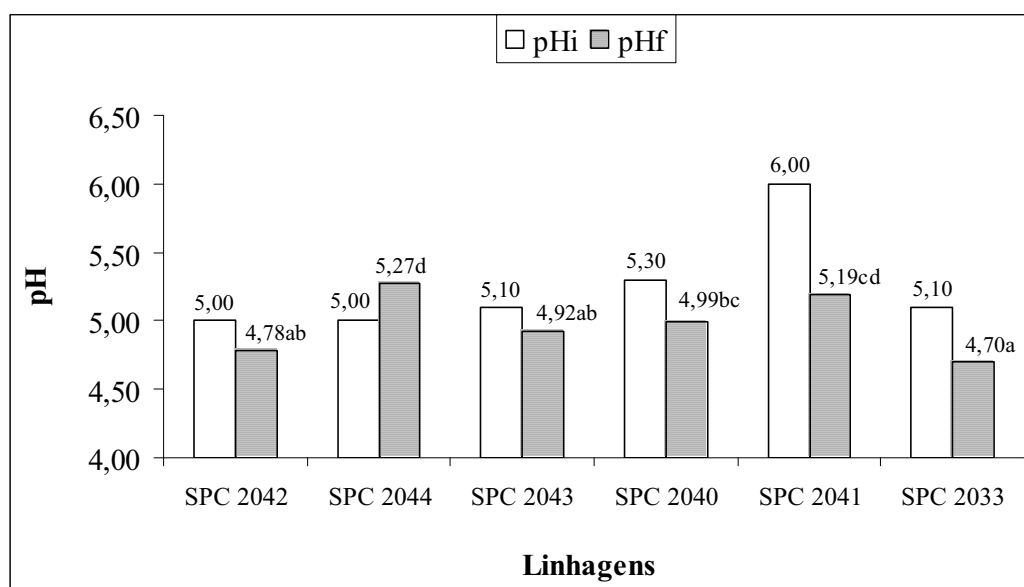


Figura 30. Valores de pHf do MA líquido em relação ao pHi e às linhagens de *M. hiemalis* (SPC 2040, 2041, 2042, 2043 e 2044) e *M. bainieri* (SPC 2033). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Ensaio de Bioissorção de Pb e Zn

De maneira geral, quanto à adsorção de Pb, todos os tratamentos investigados, materiais adsorventes,  $C_i$  e materiais adsorventes  $\times C_i$ , apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos resultados das variáveis  $C_f$ ,  $q$ ,  $q_M$  e  $q\%$  (apêndice 2).

A porcentagem de remoção como forma de representar resultados de ensaios sobre bioissorção de metais por biomassa fúngica tem sido empregada em diversos estudos (MENEZES *et al.*, 1998; de SOUZA, 2001; YAN & VIRARAGHAVAN, 2001; FRANCO *et al.*, 2004; EL-MORSY, 2004). No presente estudo, o índice  $q\%$  foi obtido levando-se em consideração a equação  $[(C_i - C_f).100].C_i^{-1}$ , que pode ser utilizada para calcular a porcentagem remoção. Porém, como esta equação não considera a quantidade de biomassa ( $g L^{-1}$ ) utilizada nos ensaios, diferentemente do que acontece no cálculo do índice  $q$  (equação 1), este componente foi adicionado para produzir a equação 3:  $\{[(C_i - C_f).100].C_i^{-1}\}.B^{-1}$ , que deste modo reflete em termos percentuais a quantidade de metal adsorvida à biomassa.

A adsorção de Pb pelas biomassas de *M. hiemalis* SPC 2044 e SPC 2040 foi diferente da encontrada para o CA, rejeitando-se portanto, a hipótese da nulidade da análise de variância. A capacidade de adsorção de Pb pelo CA foi superior à capacidade apresentada pelas biomassas em todos os três níveis de  $C_i$  examinados. Nas análises efetuadas, foi comparada a capacidade de adsorção de metais pelos três materiais para cada um dos três níveis de concentrações iniciais e, complementarmente, foram comparadas as concentrações iniciais em relação à adsorção de metais para cada material de modo separado.

Quanto à comparação dos materiais adsorventes em cada nível de  $C_i$ , houve diferenças significativas em relação aos valores de todas as variáveis analisadas ( $C_f$ ,  $q$ ,  $q_M$  e  $q\%$ ). Na comparação entre as concentrações iniciais em que os adsorventes foram submetidos, não houve diferenças significativas para o CA em relação ao  $C_f$  e ao  $q\%$ . Isto se deve ao fato de que os valores destes dois índices estão diretamente relacionados, ou seja, a concentração final zero implica no máximo valor de  $q\%$ . Também não houve diferenças significativas entre os valores do índice  $q\%$  em relação à biomassa de *M. hiemalis* SPC 2044.

De acordo com a tabela 4, a adsorção de Pb pelo carvão ativado nos três níveis de Ci atingiu os valores máximos dos índices analisados, de maneira que no 3º nível de Ci (35,66 mg L<sup>-1</sup>) foram obtidos os mais elevados valores de adsorção: Cf = 0,00, q = 17,83 mg g<sup>-1</sup>, qM = 0,09 mM g<sup>-1</sup> e q% = 50,00. As biomassas de *M. hiemalis* SPC 2044 e SPC 2040 exibiram valores de biossorção de Pb similares entre si no 3º nível de Ci, os quais foram significativamente superiores em relação aos valores observados nos dois níveis de Ci inferiores. Os valores obtidos foram os seguintes: Cf = 9,04 mg L<sup>-1</sup>, q = 13,31 mg g<sup>-1</sup>, qM = 0,06 mM g<sup>-1</sup> e q% = 37,33 para a linhagem SPC 2044 e Cf = 8,05 mg L<sup>-1</sup>, q = 13,80 mg g<sup>-1</sup>, qM = 0,07 mM g<sup>-1</sup> e q% = 38,71 para a linhagem SPC 2040. Em relação ao 2º nível de Ci houve diferenças significativas entre as linhagens, mas os valores dos índices foram geralmente inferiores aos obtidos no 3º nível de Ci.



Tabela 4. Adsorção de Pb por biomassas de *M. hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 e *M. hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040 e o carvão ativado (CA), utilizando-se 0,1 g dos adsorventes (peso seco), soluções aquosas (50 mL) de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  com pH 4 e 14 h de contato. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), as letras minúsculas comparam os adsorventes em cada nível de  $C_i$  e as maiúsculas os níveis de  $C_i$  para cada material adsorvente utilizado.

Adsorventes	Pb				
	$C_i$ $\text{mg L}^{-1}$ ( $\text{mM L}^{-1}$ )	$C_f$ $\text{mg L}^{-1}$	q $\text{mg g}^{-1}$	qM $\text{mM g}^{-1}$	q%
CA	13,06 (0,06)	0,00aA	6,53bA	0,03bA	50,00bA
SPC 2044	13,06 (0,06)	3,31bA	4,87aA	0,02aA	37,32aA
SPC 2040	13,06 (0,06)	3,77bA	4,65aA	0,02aA	35,58aA
CA	26,65 (0,13)	0,00aA	13,33cB	0,06bB	50,00cA
SPC 2044	26,65 (0,13)	5,62bB	10,52bB	0,05aB	39,46bA
SPC 2040	26,65 (0,13)	8,78cB	8,94aB	0,04aB	33,53aA
CA	35,66 (0,17)	0,00aA	17,83bC	0,09bC	50,00bA
SPC 2044	35,66 (0,17)	9,04bC	13,31aC	0,06aC	37,33aA
SPC 2040	35,66 (0,17)	8,05bB	13,80aC	0,07aC	38,71aB

Em um estudo sobre a biossorção de Pb pela biomassa de *Mucor rouxii* DSM 1191 (provavelmente *M. indicus*, ver comentários da linhagem SPC 2034 pág. 91), sob condições experimentais semelhantes às do presente estudo [ $C_i = 1,66 \text{ mM}$  ( $343,95 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH 4, concentração de biomassa de 50 - 100 mg para 50 - 100 mL de solução metálica e agitação a 100 rpm por 24 h na temperatura de  $25^\circ\text{C}$ ], foi obtido o índice biossortivo de  $315 \mu\text{M g}^{-1}$  ( $0,315 \text{ mM g}^{-1}$ ;  $65,27 \text{ mg g}^{-1}$ ) com a biomassa integral e de  $403 \mu\text{M g}^{-1}$  ( $0,403 \text{ mM g}^{-1}$ ;  $83,50 \text{ mg g}^{-1}$ ) com a parede celular do fungo tratada por 4 h com 4 M de NaOH a  $121^\circ\text{C}$  (BAIK *et al.*, 2002).

A concentração inicial utilizada por BAIK *et al.* (2002) foi cerca de 10 vezes superior ao maior nível de  $C_i$  estudado aqui e pode ter sido um dos principais fatores responsáveis pelos maiores índices de biossorção de Pb obtidos com a biomassa integral de *M. rouxii*, pois muitos estudos indicam que o aumento nas concentrações iniciais pode corresponder à elevação na capacidade de biossorção de metais (AL-ASHEH & DUVNLAK, 1995; SAĚ & KUTSAL, 1995; FRANCO *et al.*, 2004). Por outro lado, o tratamento químico da biomassa com NaOH em temperatura elevada pode ampliar notadamente a capacidade de biossorção de Pb, devido à liberação de proteínas, a exposição de novos sítios de adsorção, além da desacetilação da quitina para produzir o quitosano (BAIK *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2004).

YAN & VIRARAGHAVAN (2001) trabalharam com a biomassa de *Mucor rouxii* ATCC 24905, que foi tratada com 0,2 N de NaOH por 30 minutos, autoclavada a  $121^\circ\text{C}$  por 30 minutos, seca, triturada, imobilizada em uma coluna plástica de 1,27 cm de diâmetro x 40 cm de altura e submetida ao contato com soluções de diversos metais. No caso do Pb, a máxima biossorção foi de  $6,09 \text{ mg g}^{-1}$  a partir de uma solução com  $C_i$  próxima de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Através de cálculos com a isoterma de Langmuir em relação ao índice  $q_{\text{max}}$ , capacidade máxima de adsorção ou saturação, LO *et al.* (1999) avaliaram que a biomassa de *M. rouxii* pode ser capaz de remover até 769 mg de Pb por grama de biomassa, superando todas as expectativas e relatos encontrados para biossorção de metais por biomassa fúngica. No entanto, estes dados devem ser considerados com muita cautela devido à sua natureza estimativa.

Segundo PILLICHSHAMMER *et al.* (1995), a biomassa de *Mucor hiemalis* apresentou especial afinidade para a biossorção de cromo na forma iônica  $\text{Cr}^{3+}$ , chegando à retenção de  $21,4 \text{ mg g}^{-1}$  em pH 5.5. Neste mesmo estudo, foi observada a seguinte ordem

seletiva de captação de íons metálicos:  $\text{Cr}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Al}^{3+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mo}^{5+} > \text{Cd}^{2+} > \text{CrO}_4^{2-} > \text{VO}^{3-}$ .

A biomassa de *Rhizopus arrhizus* (*R. oryzae*) tratada com formaldeído a 1% e utilizada para a biossorção de Pb de uma solução com  $\text{Ci} = 22,80 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou o índice  $q = 18,40 \text{ mg g}^{-1}$  (SAĞ *et al.*, 1995). Mas quando submetida ao contato com uma solução que misturava Pb ( $\text{Ci} = 20,80 \text{ mg L}^{-1}$ ) e Cu ( $\text{Ci} = 100,40 \text{ mg L}^{-1}$ ), a capacidade de biossorção de Pb diminuiu para  $7,50 \text{ mg g}^{-1}$  enquanto que a biossorção de Cu foi de  $5,94 \text{ mg g}^{-1}$  (SAĞ *et al.*, 2000).

A biossorção de Pb pela biomassa de *Cunninghamella echinulata* tratada com 0,1 M de NaOH a  $120^\circ\text{C}$  por 6 h em pH 4 foi de  $42,5 \text{ mg g}^{-1}$  (EL-MORSY, 2004). O polissacarídeo quitosano extraído da parede celular de *Cunninghamella elegans* removeu 52% do Pb de uma solução com  $\text{Ci} = 2 \text{ mM}$  (FRANCO *et al.*, 2004).

De acordo com a maioria dos relatos descritos acima sobre a capacidade de adsorção de Pb pela biomassa de fungos pertencentes à ordem Mucorales, principalmente os referentes ao gênero *Mucor* (BAIK *et al.*, 2002; YAN & VIRARAGHAVAN, 2001; PILLICHSHAMMER *et al.*, 1995), os resultados obtidos aqui para a biomassa de *M. hiemalis* SPC 2044 e SPC 2040 podem ser considerados dentro dos padrões esperados, principalmente porque não houve tratamento prévio da biomassa com reagentes químicos podendo aumentar sua capacidade de biossorção de metais.

Quanto à adsorção de Zn, a exemplo do que ocorreu em relação ao Pb, todos os tratamentos analisados apresentaram diferenças significativas nos valores das variáveis estudadas ( $p < 0,05$ ). A capacidade de adsorção de Zn pelo CA foi superior à apresentada pelas biomassas de *M. hiemalis* SPC 2044 e SPC 2040 em todos os níveis de  $\text{Ci}$ , rejeitando-se também neste caso a hipótese da igualdade da análise de variância (apêndice 2).

O CA utilizado apresenta-se na forma de um pó extremamente fino, característica física que certamente lhe confere elevada superfície de contato, que poderia em parte explicar a supremacia sobre as biomassas das linhagens quanto à adsorção de Pb e Zn. Além disso, as partículas de carvão ativado são constituídas internamente por uma estrutura porosa composta de macroporos ramificados em microporos (LEITÃO & RODRIGUES, 1995), que teoricamente expandiria ainda mais a superfície de contato disponível.

Por outro lado, a estrutura de parede celular de fungos filamentosos é composta basicamente por polissacarídeos tais como  $\beta$ -glucano,  $\alpha$ -glucano, quitina e glicoproteínas, além de lipídios, melaninas, polímeros de D-galactosamina e poliuronídeos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996), é considerada o local de prevalência de potenciais sítios de adsorção de metais, tais como os grupos químicos acetamido, amido, fosfato, amino, amina, sulfidril, carboxila e hidroxila e apresenta espaços capilares que formam uma rede de grande capacidade de interação com íons de metais por mecanismos de troca iônica, adsorção, complexação, precipitação e cristalização (GADD, 1993; VOLESKY & HOLAN, 1995).

No 3º nível de  $C_i$  ( $15,33 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi obtida a melhor combinação nos valores dos índices de adsorção de Zn pelo CA (tabela 5), ocorrendo os seguintes valores:  $C_f = 1,12 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $q = 7,11 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $q_M = 0,11 \text{ mM g}^{-1}$  e  $q\% = 46,34$ . A biossorção de Zn por biomassa de *M. hiemalis* SPC 2044 foi melhor no 2º nível de  $C_i$  ( $10,75 \text{ mg L}^{-1}$ ), sendo que foram obtidos os seguintes valores:  $C_f = 5,71 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $q = 2,52 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $q_M = 0,04 \text{ mM g}^{-1}$  e  $q\% = 23,46$ . Estes valores foram levemente inferiores aos obtidos no 3º nível de  $C_i$ , mas de modo geral, não houve diferenças significativas entre eles. Em relação à biomassa de *M. hiemalis* SPC 2040, os melhores índices de biossorção foram observados no 3º nível de  $C_i$ , sendo os seguintes:  $C_f = 4,83 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $q = 5,25 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $q_M = 0,08 \text{ mM g}^{-1}$  e  $q\% = 34,25$ .

Tabela 5. Adsorção de Zn por biomassas de *M. hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 e *M. hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040 e o carvão ativado (CA), utilizando-se 0,1 g dos adsorventes (peso seco), soluções aquosas (50 mL) de  $Zn(NO_3)_2$  com pH 4 e 14 h de contato. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), as letras minúsculas comparam os adsorventes em cada nível de Ci e as maiúsculas os níveis de Ci para cada material adsorvente utilizado.

Adsorventes	Zn				
	Ci	Cf	q	qM	q%
	mg L <sup>-1</sup> (mM L <sup>-1</sup> )	mg L <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>	mM g <sup>-1</sup>	
CA	5,34 (0,08)	0,16aA	2,59cA	0,04cA	48,52cB
SPC 2044	5,34 (0,08)	2,43cA	1,46aA	0,02aA	27,26aC
SPC 2040	5,34 (0,08)	1,24bA	2,05bA	0,03bA	38,38bB
CA	10,75 (0,16)	1,08aAB	4,84cB	0,07bB	45,00cA
SPC 2044	10,75 (0,16)	5,71cB	2,52aB	0,04aB	23,46aB
SPC 2040	10,75 (0,16)	2,19bB	4,28bB	0,07bB	39,82bB
CA	15,33 (0,23)	1,12aB	7,11cC	0,11cC	46,34cAB
SPC 2044	15,33 (0,23)	9,60cC	2,87aB	0,04aB	18,71aA
SPC 2040	15,33 (0,23)	4,83bC	5,25bC	0,08bC	34,25bA

Segundo BAIK *et al.* (2002), a capacidade de biossorção de Zn pela biomassa íntegra de *Mucor rouxii* a partir de uma solução com  $C_i = 1,66 \text{ mM}$  ( $\cong 108,55 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi de  $150 \text{ } \mu\text{M g}^{-1}$  ( $0,150 \text{ mM g}^{-1}$ ;  $\cong 9,81 \text{ mg g}^{-1}$ ) e de  $532 \text{ } \mu\text{M g}^{-1}$  ( $0,532 \text{ mM g}^{-1}$ ;  $\cong 34,79 \text{ mg g}^{-1}$ ) com a parede celular do fungo tratada por 4 h com 4 M de NaOH a  $121^\circ\text{C}$ . A capacidade de biossorção de Zn pela biomassa de *Mucor rouxii*, tratada com 0,2 N de NaOH por 30 minutos, autoclavada a  $121^\circ\text{C}$  por 30 minutos, seca, triturada e imobilizada em uma coluna plástica, foi de  $5,64 \text{ mg g}^{-1}$  a partir de uma solução com  $C_i \cong 10 \text{ mg L}^{-1}$  (YAN & VIRARAGHAVAN, 2001).

Numa solução contendo Pb ( $C_i = 21,35 \text{ mg L}^{-1}$ ) e Zn ( $C_i = 29,79 \text{ mg L}^{-1}$ ) a biossorção de Zn pela biomassa de *R. arrhizus* foi de  $2,24 \text{ mg g}^{-1}$  em pH 5 (SAĞ *et al.*, 2000). Em outro estudo, a remoção de Zn pela biomassa de *R. arrhizus* em diferentes valores de pH (4, 5 e 6) foi de 0,92, 1,83 e  $2,22 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente (MORLEY & GADD, 1995). A biossorção de Zn pela biomassa de *Cunninghamella echinulata* tratada com 0,1 M de NaOH a  $120^\circ\text{C}$  por 6 h foi de  $17,5 \text{ mg g}^{-1}$  em pH 5 (EL-MORSY, 2004). Com base nos relatos observados, os valores de biossorção de Zn obtidos no presente estudo podem ser considerados compatíveis aos encontrados na literatura para a biomassa integral em estado *in natura*.

Do ponto de vista taxonômico, as linhagens *Mucor hiemalis* Wehmer f. *hiemalis* SPC 2040 e *Mucor hiemalis* Wehmer f. *luteus* SPC 2044 apresentam entre si poucas diferenças, que se expressam em algumas variações morfológicas, conforme as informações obtidas no estudo de SCHIPPER (1973). Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre a biomassa de ambas linhagens em relação à adsorção de Pb e de Zn. A biomassa da linhagem SPC 2044 apresentou leve superioridade, diferença significativa pelo teste de Tukey, quanto à capacidade de adsorção de Pb no 2º nível de  $C_i$  ( $26,65 \text{ mg L}^{-1}$ ). Em contrapartida, a biomassa da linhagem SPC 2040 removeu quase o dobro da quantidade de Zn do que a biomassa da linhagem SPC 2044 em praticamente todos os níveis de  $C_i$  examinados. Este comportamento pode indicar a existência de diferentes pontos de fixação de metais, principalmente relacionados ao Zn, na estrutura de parede das linhagens, que podem estar relacionados a diferenças fisiológicas no padrão de assimilação de fontes de carbono (GOMES *et al.*, 2002).

É provável que a ocorrência de diferentes pontos de fixação de metais na parede de *M. hiemalis* Wehmer f. *hiemalis* SPC 2040 possa ter influenciado o aspecto global da biossorção e facilitado à ocorrência simultânea de diferentes mecanismos de acúmulo de

metais, tais como adsorção, troca-iônica e quelação (VOLESKY & HOLAN, 1995), que poderiam ter operado conjuntamente na trama estrutural da biomassa e elevado sua capacidade de bioadsorção de Zn.

Diferenças na capacidade de remoção de metais por linhagens de mesma espécie fúngica têm sido relatadas por outros autores. GOMES *et al.* (2002) constataram que a capacidade máxima ( $q_{\max}$ ) de adsorção de Ag pela linhagem tipo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (CBS 316) foi de 3,41 mg g<sup>-1</sup>, muito inferior à capacidade exibida por outras quatro linhagens do acervo da Coleção de Culturas da UFMG, que variou entre 10,06 e 22,20 mg g<sup>-1</sup>. As biomassas liofilizadas e pulverizadas de duas linhagens de *Mucor rouxii*, uma sensível e outra tolerante ao Cu, adsorveram em média 20,64 e 23,14 mg g<sup>-1</sup> do metal, respectivamente (GARDEA-TORRESDEY, *et al.*, 1996).

As condições experimentais em que os ensaios de bioadsorção são conduzidos claramente influenciam a capacidade de retenção de metais pelos adsorventes (GADD, 1993; LEDIN, 2000). O pH 4 das soluções de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> utilizadas aqui foi favorável aos dois metais estudados, evitando-se o risco de precipitações, que poderiam prejudicar tanto o processo de bioadsorção quanto as análises químicas. A adsorção de Pb, Fe e Cu por quitina e quitosano extraídos da parede celular de *Cunninghamella elegans*, por exemplo, foi mais efetiva em pH 4 (FRANCO *et al.*, 2004). Por outro lado, a concentração de biomassa 2 g L<sup>-1</sup> utilizada no presente estudo pode ser considerada elevada se comparada a estudos em que foram empregadas concentrações de até 1 g L<sup>-1</sup> (BAIK *et al.*, 2002; EL-MORSY, 2004) e dentro da média usual quando comparada a outros estudos nos quais as concentrações de biomassa chegaram até 3 g L<sup>-1</sup> (SOLARI *et al.*, 1996), até 6 g L<sup>-1</sup> (KUREK *et al.*, 1982), ou a 1% (m v<sup>-1</sup>) (FRANCO *et al.*, 2004).

Embora a capacidade de adsorção de Pb e Zn pelas biomassas de *Mucor hiemalis* Wehmer tenha sido inferior àquela apresentada pelo carvão ativado, há que se ressaltar a grande possibilidade de aumento da capacidade adsorção de metais através de tratamentos químicos, como por exemplo, o da fervura em NaOH. Alguns tratamentos químicos podem elevar sobremaneira a capacidade inicial de adsorção de metais apresentada pela biomassa microbiana, através da liberação de sítios de adsorção antes indisponíveis e da promoção do que poderia ser chamado de “ativação da biomassa”, que por si só, naturalmente apresenta sítios ativos disponíveis e passíveis de interação eletrostática (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997) e de troca-iônica (LO *et al.*, 1999). Desta maneira, podem-se obter

melhores resultados de bioabsorção de metais por biomassa fúngica ou de outros microrganismos, que sejam viáveis do ponto de vista de aplicação prática.



## 6. CONCLUSÕES

- De maneira geral, a metodologia utilizada para o isolamento, o cultivo, a preservação e a identificação das linhagens de Mucorales mostrou-se satisfatória, à medida que permitiu a obtenção de culturas axênicas, a manutenção da viabilidade e a identificação dos táxons. Embora as linhagens de Mucorales estudadas aqui tenham sido isoladas de solos reconhecidamente sujeitos a diversos tipos de distúrbios, especialmente a deposição de metais pesados e outros elementos químicos, seus aspectos fenotípicos de valor taxonômico não apresentaram grandes discrepâncias. Ocorreram apenas variações advindas da ampla plasticidade morfológica inerente aos fungos, sendo possível a utilização de chaves e descrições disponíveis na literatura.
- Os táxons obtidos pertencem aos gêneros *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Zygorrhynchus*, sendo representantes comuns de Mucorales que normalmente ocorrem em solos do Estado de São Paulo e de outras regiões do país.
- No aspecto geral, os teores dos elementos químicos analisados nas amostras de solo do pólo cerâmico de Sta. Gertrudes até 10 cm de profundidade não as caracterizaram como severamente contaminadas, estando abaixo do Valor de Referência de Qualidade. No entanto, foram detectados teores acima dos Valores de Intervenção de Pb em diversas amostras de solo dos locais 3 e 4 e, mais que duas vezes acima da concentração natural esperada para o B em uma das amostras do local 3. Conclui-se que a contaminação do solo com metais pesados e outros elementos químicos afetou negativamente a diversidade de fungos da região estudada em Sta. Gertrudes, SP.

- Considera-se que os Mucorales tiveram o crescimento favorecido nos meios de cultivo quando houve adição de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ou de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  nas concentrações de 100 ou de 200  $\text{mg L}^{-1}$ , o que não aconteceu nos meios sem metais, com 500 ou 1.000  $\text{mg L}^{-1}$ . Possivelmente, este fato está relacionado ao efeito da toxidez do Pb aos outros microrganismos competidores e ao estímulo promovido pelo Zn ao crescimento de todos os microrganismos.
- Por ser uma das espécies de zigomicetos de grande distribuição no solo, *Mucor hiemalis* Wehmer pode ser considerada espécie chave no diagnóstico de solos impactados por metais, tendo em vista o seu predomínio no presente estudo.
- Embora tenham sido utilizadas sob a forma natural, sem prévios tratamentos, as biomassas de *M. hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040 e *M. hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 apresentaram potencial para a biossorção de metais em solução aquosa.
- Houve diferenças significativas entre as biomassas de *M. hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040 e de *M. hiemalis* f. *luteus* SPC 2044 em relação à quantidade de metais adsorvidos. A capacidade de adsorção de Pb foi equivalente entre as biomassas das duas linhagens, mas em relação à adsorção de Zn, a biomassa de *M. hiemalis* f. *hiemalis* SPC 2040 foi cerca de 50% superior. Isto pode indicar diferenças em relação à disponibilidade de sítios de ligação e/ou mecanismos de retenção de metais na parede das linhagens.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- AGÊNCIA FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). **Guerra biológica contra pragas**. São Paulo: Fapesp, 2003. Disponível em: <[http://www.agencia.fapesp.br/boletim\\_dentro.php?data%5Bid\\_materia\\_boletim%5D=969](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?data%5Bid_materia_boletim%5D=969)> Acesso em: 29 jun. 2006.
- AL-ASHEH, S.; DUVNJAK, Z. Adsorption of copper and chromium by *Aspergillus carbonarius*. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 638-642, 1995.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Zygomycota: Class Zygomycetes. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 127-171.
- ALVES, M.H. **Diversidade e avaliação do potencial biotecnológico quanto à produção de enzimas em isolados de *Mucor* spp. obtidos de fezes de herbívoros, Recife, PE**. 2002. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- ALVES, M.H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F.; MILANEZ, A.I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 325-330, 2002a.

---

\* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Grupo de Trabalho Normalização Documentária da UNESP. **Normalização documentária para a produção científica da UNESP**: normas para apresentação de referências segundo a NBR 6023:2002 da ABNT. São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalizacao.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2003.

- ALVES, M.H.; TRUFEM, S.F.B.; MILANEZ, A.I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 2, p. 147-160, 2002b.
- AMMAR, M.S.; AZAB, M.S.; ELEWA, A.A.; SALEH, A.A.S. A new application of biochemical treatment of industrial wastewater of an oil-company. In: WATER 2000 AFRICA NORTH - INTERNATIONAL CONFERENCE FOR WATER, SANITATION AND ENVIRONMENTAL PROTECTION SECTORS, 2, 2000, Cairo. **Proceedings...** Cairo: International Conference Centre, 2000. p. 133-144.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. Dormancy, germination, growth, sporulation, and dispersal. In: ESSER, K.; LEMKE, P.A. (Ed.). **The mycota. Environmental and microbial relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 4, p. 3-13.
- ANTUNES, M.F.R.; NINOMIYA, A.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. Efeitos da queimada sobre a micota de solo de Mata Atlântica, na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, SP. **Hoehnea**, v. 20, n. 1/2, p. 1-8, 1993.
- APHA (American Public Health Association). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: American Public Health Association, 1995. part 4500.
- ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; AMÂNCIO, A.V.; CORREA, R.M.L.; GUERCIO, M.A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.
- AVERY, S.V.; TOBIN, J.M. Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3883-3889, 1992.
- AZAB, M.S. Biosorption of cadmium(II) and copper(II) by fungal pellets and fungal-waste biomass. **Al-Azhar Bulletin of Science**, v. 5, n. 2, p. 775-787, 1994.
- AZAB, M.S.; EL-SHORA, H.M.; MOHAMMED, H.A-H. Biosorption of cyanide from industrial waste water. **Al-Azhar Bulletin of Science**, v. 6, n. 1, p. 311-323, 1995.
- AZAB, M.S.; PETERSON, P.J.; YOUNG, T.W.K. Uptake of cadmium by fungal biomass. **Microbios**, v. 62, n. 250, p. 23-28, 1990.
- BAIJAL, U.; MEHROTRA, BS. 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 mould mycelia and parts thereof. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 167-170, 2002.
- BARBOSA, J.R. **Estudo da interação adsorptiva entre os corantes direct red 23 e reactive procion red HE 7B e células de *Saccharomyces cerevisiae***. 1995. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- BARCELLOS, F.G. **Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudokoningii***. 2002. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BARRON, G.L. Soil fungi. In: BOOTH, C. (Ed.). **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press, 1971. v. 4, p. 405-427.
- BATISTA A.C.; VITAL, A.F. Notas sobre *Syncephalastrum racemosum* Cohn e sua constatação em Pernambuco. **Instituto de Micologia, Universidade do Recife, Publicação nº 7**, p. 54-57, 1955.
- BATISTA, A.C. *Pilobolus crystallinus* (Wigg) Tode. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de Pernambuco**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 1948.
- BENJAMIN, R.K.; MEHROTRA, B.S. Obligate azygospore formation in two species of *Mucor* (Mucorales). **Aliso**, v. 5, n. 3, p. 235-245, 1963.
- BENNY, G.L.; HUMBER, R.A.; MORTON, J.B. Zygomycota: Zygomycetes. In: ESSER, K.; LEMKE, P.A. (Ed.). **The Mycota. Systematics and Evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v. 7 (A), p. 113-146.
- BLACKWELL, K.J.; SINGLETON, I.; TOBIN, J.M. Metal cation uptake by yeast: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 579-84, 1995.
- BLAKEMAN, J.P. Fungal interaction on plant surfaces. In: CARROLL, G.C.; WICKLOW, D.T. (Ed.). **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 853-867.
- BLOEMEN, M.L.; MARKERT, B.; LIETH, H. The distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in topsoils of Osnabrück in relation to land use. **The Science of the Total Environment**, v. 166, p. 137-148, 1995.

- BOLTON Jr., H.; GORBY, Y.A. An overview of the bioremediation of inorganic contaminants. In: HINCHEE, R.E., MEANS, J.L., BURRIS, D.R. (Ed.). **Bioremediation of Inorganics**. Columbus: Battelle Press, 1995. p. 1-16.
- BONACIN SILVA, A.L. **Caracterização ambiental e estudo do comportamento do chumbo, zinco e boro em área degradada por indústrias cerâmicas – região dos lagos de Santa Gertrudes, SP**. 2001. 229 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia)- Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- BOTHA, A.; KOCK, J.L.F. **Biological treatment and cultivation of microorganisms**. Patent Storm LLC, 1995. Sasol Industries Limited, US Patent 5429942. Disponível em: <<http://www.patentstorm.us/patents/5429942-fulltext.html>> Acesso em :28 mai. 2006.
- BRANDÃO, E. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 1-15.
- BURFORD, E. P.; KIERANS, M.; GADD, G.M. Geomycology: fungi in mineral substrata. **Mycologist**, v. 17, n. 3, p. 98-107, 2003.
- BUSTARD, M.; McMULLAN, G.; McHALE, A.P. Biosorption of textile dyes by biomass derived from *Khuyveromyces marxianus* IMB3. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 427-430, 1998.
- CAKMAK, I.; KALAYCI, M.; EKIZ, H.; BRAUN, H.J.; KILINÇ, Y.; YILMAZ, A. Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: a NATO-science for stability project. **Field Crops Research**, v. 60, p. 175-188, 1999.
- CAMARGO, A.T. **Estudo de otimização do processo de bioissorção de corantes azóicos reativos por leveduras do gênero *Candida***. 1996. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.
- CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: \_\_\_\_\_; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 33-39.
- CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **The Fungi**. London: Academic Press, 1996. 482 p.

- CAVALCANTI, M.S. **Fungos isolados da água e do solo das margens dos Açúdes do Prata e do Meio, na Reserva Florestal de Dois Irmãos, Recife-PE.** 2000. 316 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental). **Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas.** Decisão de diretoria nº 195-2005-E. São Paulo: Cetesb, 2005. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo\\_geral.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo_geral.asp)> Acesso em: 27 jan. 2006.
- CHEN, G.Q.; ZHENG, R.Y. A new thermophilic variety of *Absidia idahoensis* from China. **Mycotaxon**, 69, p. 173-179, 1998.
- CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. **Mycologia**, v. 81, n. 1, p. 1-19, 1989.
- COOK, N; HENDERSHOT, W.H. The problem of establishing ecologically based soil quality criteria: the case of lead. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 76, n. 3, p. 335-342, 1996.
- CORDEIRO NETO, F. **Fungos indutores de fitoalexinas em rubiáceas nativas e caracterização parcial do agente indutor obtido de *Mucor ramosissimus*.** 1992. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1992.
- CORSO, C.R., MARCANTI, I., YAMAOKA, E.M.T. Applicability of the equations of Freundlich and Langmuir to the adsorption of the azo dye procion scarlet on paramorphic colonies of *Neurospora crassa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 20, p. 623-626, 1987.
- CORUMBATAÍ NEWS. **Projeto Corumbataí Cerâmicas.** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 1999a. 4f.
- CORUMBATAÍ NEWS. **Projeto Corumbataí Cerâmicas.** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 1999b. 4f.
- CORUMBATAÍ NEWS. **Projeto Corumbataí Cerâmicas.** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 1999c. 4f.
- CORUMBATAÍ NEWS. **Projeto Corumbataí Cerâmicas.** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 2000. 4f.
- COSTA, A.C.A.; TELES, E.M.F.; LEITE, S.G.F. Accumulation of cadmium from moderately concentrated cadmium solutions by *Chlorella* and *Scenedesmus* strains. **Revista de Microbiologia**, v. 25, n. 1, p. 42-45, 1994.

- COSTLEY, S.C.; WALLIS, F.M. Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor. **Water Research**, v. 35, n. 15, p. 3715-3723, 2001.
- da COSTA, A.C.A.; de MESQUITA, L.M.S.; TORNOVSKY, J. Batch and continuous heavy metals biosorption by a brown seaweed from a zinc-producing plant. **Minerals Engineering**, v. 9, n. 8, p. 811-824, 1996.
- DANTAS, B. A situação atual do gênero *Choanephora* (Mucorales). In: REUNIÃO NACIONAL DE BOTÂNICA, 4, 1953, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Botânica do Brasil, 1953b. p. 333-350.
- DANTAS, B. Sobre *Choanephora conjuncta* no Brasil. In: REUNIÃO NACIONAL DE BOTÂNICA, 4, 1953, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Botânica do Brasil, 1953a. p. 177-185.
- DAVIS, T.A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R.H.S.F. *Sarghassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4270-4278, 2000.
- de SOUZA, J.I. **Avaliação da tolerância e capacidade biossortiva de alguns metais pesados por fungos zoospóricos filamentosos**. 2001. 191 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- DEY, S.; RAO, P.R.N.; BHATTACHARYYA, B.C.; BANDYOPADHYAY, M. Sorption of heavy metals by four basidiomycetous fungi. **Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 273-277, 1995.
- DIGHTON, J. Fungal interactions with humans. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Fungi in ecosystems processes**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 305-390.
- DIX, N.J.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology**. London: Chapman & Hall, 1995. 549p.
- DOMINGUES, M.M. **Levantamento da micota terrestre e determinação de alguns parâmetros abióticos do solo da região da Represa do Guarapiranga, no município de São Paulo, SP**. 1998. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Depto. de Biologia, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 1998.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**. Eching: IHW-Verlag, 1993. v. 1, 859p.



- ELLIS, J.J.; HESSELTINE, C.W. Species of *Absidia* with ovoid sporangiospores. II. **Sabouraudia**, v. 5, n. 1, p. 59-77, 1966.
- ELLIS, J.J.; HESSELTINE, C.W. The genus *Absidia*: globose-spored species. **Mycologia**, v. 57, n. 2, p. 222-235, 1965.
- ELLIS, J.J.; RHODES, L.J.; HESSELTINE, C.W. The genus *Amylomyces*. **Mycologia**, v. 68, p. 131-143, 1976.
- EL-MORSY, E.S.M. *Cunninghamella echinulata* a new biosorbent of metal ions from polluted water in Egypt. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1183-1189, 2004.
- FERREIRA, D.F. 2000. **Manual do sistema Sisvar (4.3) para análises estatísticas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, 66 p.
- FIALHO, R.C.; CASTRO, M.; BERGMANN, J. **Parecer técnico nº 06/02/EQSE**. São Paulo: Cetesb, 10 jun. 2002.
- FOMINA, M.; BURFORD, E.P.; GADD, G.M. Toxic metals and fungal communities. In: DIGHTON, J., WHITE, J.F., OUDEMANS, P. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. p. 733-758.
- FOMINA, M.; RITZ, K.; GADD, G.M. Negative chemotropism to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 207-211, 2000.
- FÖRSTNER, U.; CALMANO, W. Characterisation of dredged materials. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 11, p. 149-157, 1998.
- FRANCO, L.O.; MAIA, R.C.C.; PORTO, A.L.F.; MESSIAS, A.S.; 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.
- FRANKLAND, J.C. Ecological methods of observing and quantifying soil fungi. **Transactions Mycological Society of Japan**, v. 31, p. 89-101, 1990.
- GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v. 124, p. 25-60, 1993.
- GADD, G.M.; RAMSAY, L.; CRAWFORD, J.W.; RITZ, K. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 311-316, 2001.

- GARCIA Jr., O. Microorganismos e metais. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa, 1997. p. 11-41.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L.; CANO-AGUILERA, I.; WEBB, R.; TIEMANN, K.J.; GUTIÉRREZ-CORONA, F. Copper adsorption by inactivated cells of *Mucor rouxii*: effect of esterification of carboxyl groups. **Journal of Hazardous Materials**, v. 48, p. 171-180, 1996.
- GARON, D.; SAGE, L.; SEIGLE-MURANDI, F. Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorene degradation in soil slurry. **Biodegradation**, v. 15, p. 1-8, 2004.
- GAUGER, W.L. Further studies on sexuality in azygosporic strains of *Mucor hiemalis*. **Transactions of British Mycological Society**, v. 64, n. 1, p. 113-118, 1975.
- GOMES, N.C.M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N.G.; BUCHNER, A.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3758-3766, 2003.
- GOMES, N.C.M.; LINARDI, V.R. Removal of gold, silver and copper by living and nonliving fungi from leach liquor obtained from the gold mining industry. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 218-222, 1996.
- GOMES, N.C.M.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; SAVVAIDIS, I. Metal bioremediation by microorganisms. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 85-92, 1998.
- GOMES, N.C.M.; ROSA, C.A.; PIMENTEL, P.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. Uptake of free and complexed silver ions by different strains of *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 62-66, 2002.
- GRANDI, R.A.P.; ATTILI, D.S. Fungos microscópicos. In: MARQUES, O.A.V., DULEBA, W. (Ed.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente Físico, Flora e Fauna**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 133-138.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8<sup>th</sup> Ed. Wallingford: CAB International, 1995. 616 p.
- HESELTINE, C. W. The section *Genevensis* of the genus *Mucor*. **Mycologia**, v. 46, p. 358-366, 1954.

- HESELTIME, C. W.; BENJAMIN, C.R.; MEHROTRA, B.S. The genus *Zygorhynchus*. **Mycologia**, v. 51, p. 173-194, 1959.
- HESELTIME, C. W.; MAHONEY, M.K.; PETERSON, S.W. A new species of *Absidia* from alkali bee brood chamber. **Mycologia**, v. 82, n. 4, p. 523-526, 1990.
- HESELTIME, C.W. A millenium of fungi, food, and fermentation. **Mycologia**, v. 57, n. 2, p. 149-197, 1965.
- HESELTIME, C.W.; ANDERSON, R.F. Microbiological production of carotenoids. I. Zygosporangia and carotene produced by intraspecific and interspecific crosses of *Choanephoraceae* in liquid media. **Mycologia**, v. 49, n. 4, p. 449-452, 1957.
- HESELTIME, C.W.; ELLIS, J.J. Mucorales. In: AINSWORTH, G.C., SPARROW, F.K., SUSSMAN, A.S. (Ed.). **The fungi: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1973. v. 4-B, p. 187-217.
- HESELTIME, C.W.; ELLIS, J.J. Notes on Mucorales, especially *Absidia*. **Mycologia**, v. 53, n. 4, p. 406-426, 1961.
- HESELTIME, C.W.; ELLIS, J.J. Species of *Absidia* with ovoid sporangiospores. I. **Mycologia**, v. 58, n. 5, p. 761-785, 1966.
- HESELTIME, C.W.; ELLIS, J.J. The genus *Absidia*: *Gongronella* and cylindrical-spored species of *Absidia*. **Mycologia**, v. 56, n. 4, p. 568-601, 1964.
- HIDRO AMBIENTE. **Avaliação ambiental das lagoas situadas na região do pólo cerâmico de Santa Gertrudes: relatório final**. São Paulo: Hidro Ambiente Projetos, Consultoria e Serviços Ltda, 2000. 40 p.
- HOLAN, Z.R.; VOLESKY, B. Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 133-146, 1995.
- HUANG, C.; HUANG, C.P. Application of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* for Cu(II) removal. **Water Research**, v. 30, n. 9, p. 1985-1990, 1996.
- INUI, T.; TAKEDA, Y.; IIZUKA, H. Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 11, p. 1-121, 1965.

- JORDÃO, C.P.; BRUNE, W.; SIQUEIRA, M.O.; PEREIRA, J.L.; CECON, P.R. Heavy metal concentrations in soils and river sediments from an industrial area in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 3-I, p. 361-369, 1999.
- 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.
- KIISKINEN, L.L.; RÄTTÖ, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 640-646, 2004.
- KIRK, P.M. (815) Proposal to conserve *Mucor* Fresenius over *Mucor* Micheli ex. L. **Taxon**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 1986.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C. & STALPERS, J.A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9<sup>th</sup> ed. Wallingford: CAB International, 2001. 655 p.
- KOLTIN, Y.; GINZBERG, I.; FINKLER, A. Fungal “killer” toxins as potential agents for biocontrol. In: CHET, I. (Ed.). **Biotechnology in Plant Disease Control**. New York: Wiley-Liss, 1993. p. 257-274.
- KUREK, E.; CZABAN, J.; BOLLAG, J.M. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1011-1015, 1982.
- KUSHNER, D.J. Effects of speciation of toxic metals on their biological activity. **Water Pollution Research Journal of Canada**, v. 28, n. 1, p. 111-128, 1993.
- LAVADO, R.S.; PORCELLI, C.A.; ALVAREZ, R. Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by different tillage systems in the Argentine Pampas. **Soil & Tillage Research**, v. 62, p. 55-60, 2001.
- LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. **Earth-Science Reviews**, v. 51, p. 1-31, 2000.
- LEITÃO, A.; RODRIGUES, A. The simulation of solid-liquid adsorption in activated carbon columns using estimates of intraparticle kinetic parameters obtained from continuous stirred tank reactor experiments. **The Chemical Engineering Journal**, v. 58, p. 239-244, 1995.

- LEITE, S.G.F.; PINTO, G.A.S.; COSTA, A.C.A. The effect of alginic matrix on cadmium uptake by an immobilized green microalgae. **Revista de Microbiologia**, v. 24, n. 3, p. 179-181, 1993.
- LEMOS, M.M.G.; DIAS, C.L. **Parecer técnico nº 34/01/EQSS**. São Paulo: Cetesb, 28 nov. 2001.
- LENKE, P.A. Speciation Phenomena. In: ESSER, K.; LEMKE, P.A. (Ed.). **The Mycota. Systematics and Evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v. 7 (B), p. 219-227.
- LIRA, N.P. **Espécies de *Absidia* do solo do Maranhão: aspectos ecológicos**. Instituto de Micologia, Publicação nº 657. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1971. 6 p.
- LO, W.; CHUA, H.; LAM, K.H.; BI, S.P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2723-2736, 1999.
- LÜBBEHÜSEN, T.L.; NIELSEN, L.; McINTYRE, M. Characterization of *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1152-1160, 2003.
- LUNN, J.A.; SHIPTON, W.A. Re-evaluation of taxonomic criteria in *Cunninghamella*. **Transactions of British Mycological Society**, v. 81, n. 2, 3003-3012, 1983.
- MAGALHÃES, G.C. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras na areia de algumas praias do litoral paulista, SP**. 1998. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, 1998.
- MAIA, L.C. **Sucessão de Fungos em Folheto de Floresta Tropical Úmida**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Editora Universitária, 1983. 198 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Metodologia para análises de elementos em material vegetal. In: \_\_\_\_\_. (Ed.) **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Potafos, Piracicaba, 1997. p. 231-307.
- MAMEDE, M.C.H.; CORDEIRO, I.; ROSSI, L.; MELO, M.M.R.F.; OLIVEIRA, R.J. Mata Atlântica. In: MARQUES, O.A.V., DULEBA, W. (Ed.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente Físico, Flora e Fauna**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 115-132.
- MARCANTI, I. **Aplicabilidade das isotermas de Freundlich e Langmuir na interação adsorptiva entre *Aspergillus niger* IZ-9 paramorfogênico e corantes azóicos básicos**,

- ácidos, diretos e reativos: influência do pH e temperatura.** 1988. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1988.
- MARKERT, B. Presence and significance of naturally occurring chemical elements of periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems. **Vegetatio**, v. 103, p. 1-30, 1992.
- MARQUES, M.R. **Interação entre uma endopoligalacturonase de *Mucor ramosissimus* e a pectina da parede celular de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) na indução de respostas de defesa em plantas.** 1998. 149 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Paulo, . São Paulo, 1998.
- MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R.; MACHADO, K.M.G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 415-421, 2000.
- MATIS, K.A.; ZOUBOULIS, A.I.; HANCOCK, I.C. Waste microbial biomass for cadmium ion removal: application of flotation for downstream separation. **Bioresource Technology**, v. 49, p. 253-259, 1994.
- MENEZES, L.B.C.; BRAZ, V.N.; CORDEIRO, C.A.M. Chromium uptake from aqueous effluents by immobilised baker's yeast. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 251-253, 1998.
- merosporangiadadas. *Rickia*, v. 12, p. 147-154, 1985b.
- MESQUITA, L.M.S.; GONÇALVES, M.M.M.; LEITE, S.G.F. Influence of the maintenance method on the cadmium biosorption capacity of *Micrococcus luteus*. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 40-43, 1998.
- MIERSCH, J.; TSCHIMEDBALSHIR, M.; BÄRLOCHER, F.; GRAMS, Y.; PIERAU, B.; SCHIERHORN, A.; KRAUSS, G.J. Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. **Mycological Research**, v. 105, n. 7, p. 883-889, 2001.
- MILANEZ, A.I. A atuação dos fungos nos ecossistemas. In: SIMPÓSIO - A MICOLOGIA E A BIOTECNOLOGIA NO BRASIL, CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 9, 1992, Ilha Solteira, SP. **Anais...** São Paulo: SBSP, 1995. p. 67-72.

- MIRANDA, M.L.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. Diversidade de fungos zoospóricos de solo contaminado por metais pesados do pólo cerâmico do município de Santa Gertrudes, Estado de São Paulo, SP. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE BOTÂNICA, 12, 2005, São Paulo. **Resumos (cd-rom)...** São Paulo: Instituto de Botânica, 2005. p. 102.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall. 1996. 574 p.
- MORLEY, G.F.; GADD, G.M. Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. **Mycological Research**, v. 99, n. 12, p. 1429-1438, 1995.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P.; WHEELER, W.W. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. **Mycotaxon**, v. 48, p. 491-528, 1993.
- MURALEEDHARAN, T.R.; IYENGAR, L.; VENKOBACHAR, C. Screening of tropical wood-rotting mushrooms for copper biosorption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3507-3508, 1995.
- NIEBOER, E.; FLETCHER, G.G. Determinants of reactivity in metal toxicology. In: CHANG, L.W. (Ed.). **Toxicology of Metals**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 113-132.
- NING, Z.; KENNEDY, K.J.; FERNANDES, L. Biosorption of 2,4-dichlorophenol by live and chemically inactivated anaerobic granules. **Water Research**, v. 30, n. 9, p. 2039-2044, 1996.
- NORDGREN, A.; BÅÅTH, E.; SÖDERSTRÖM, B. Microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1829-1837, 1983.
- NORDGREN, A.; BÅÅTH, E.; SÖDERSTRÖM, B. Soil microfungi in an area polluted by heavy metals. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 448-455, 1985.
- O'DONNELL, K.L. **Zygomycetes in Culture**. Athens: Department of Botany, University of Georgia, 1979. 257 p.

- OLIVEIRA, J.B.; JACOMINE, P.K.T.; CAMARGO, M.N. **Classes gerais de solos do Brasil: guia auxiliar para seu reconhecimento**. Jaboticabal: Funep, 1992. 201 p.
- OLIVEIRA, J.E.; ANGELIS, D.F.; CORSO, C.R.; KIYAN, C. Investigation on the adsorption equilibria of the acid azo dye amaranth (C.I. 16.185) from aqueous solutions on *Saccharomyces uvarum* IZ 1904 cells. **Naturalia**, n. 8, p. 211-217, 1983.
- OSMAN, M.S.; BANDYOPADHYAY, M. Cadmium removal from water environment by a fungus *Volvariella volvacea*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 249-254, 1996.
- PALMIERI, M.C.; GARCIA Jr., O.; MELNIKOV, P. Neodymium biosorption from acidic solutions in batch system. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 441-444, 2000.
- PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524 p.
- PILLICHSHAMMER, M.; PÜMPEL, T.; PÖDER, R.; ELLER, K.; KLIMA, J.; SCHINNER, F. Biosorption of chromium to fungi. **Biometals**, v. 8, p. 111-117, 1995. (Abstract). SpringerLink, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com>> Acesso em 12 jun. 2006.
- PINTO, I.M.A. **As micotas filamentosas do solo e da água do rio Una do Prelado, Estação Ecológica Juréia-itatins, SP**. 1999. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.
- PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. **Fungos zoospóricos dos vales dos rios Moji e Pilões, região de Cubatão, SP**. 1999. 300 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.
- PORTO, E.; LACAZ, C.S.; SILVA, L.M.; PETTINATI, A.H.; MELO, N.T.; HEINS-VACCARI, E.M. Zigomicose sistêmica (mucormicose) provocada por *Rhizopus oryzae*: registro de um caso em paciente diabético. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 2, p. 97-102, 1986.
- PRAKASH, R.; SARBHOY, A.K. *Mucor thermophilus* spec. nov. and other Mucorales from India. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 148, p. 531-534, 1993.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA GERTRUDES. **Administração 2005-2008. A Cidade**. Santa Gertrudes: Prefeitura Municipal de Santa Gertrudes, 2006. <<http://www.santagertrudes.sp.gov.br>> . Acesso em 17 jan. 2006.



- PÜMPEL, T.; PERNFUß, B.; PIGHER, B.; DIELS, L.; SCHINNER, F. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulation microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 213-217, 1995.
- RIBEIRO, S.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.
- RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; PASTORE, G.M. Isolamento de fungos produtores de ácido  $\gamma$ -linolênico de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 23, n. 1, p. 49-58, 2002.
- RULKENS, W.H.; TICHY, R.; GROTENHUIS, J.T.C. Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 27-35, 1998.
- SAĞ, Y.; KAYA, A.; KUTSAL, T. Lead, copper and zinc biosorption from bicomponent systems modelled by empirical Freundlich isotherm. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 338-341, 2000.
- SAĞ, Y.; KUTSAL, T. Copper(II) and nickel(II) adsorption by *Rhizopus arrhizus* in batch stirred reactor in series. **The Chemical Engineering Journal**, v. 58, p. 265-273, 1995.
- SAĞ, Y.; ÖZER, D.; KUTSAL, T. A comparative study of biosorption of lead (II) ions to *Z. ramigera* and *R. arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 169-174, 1995.
- SANTOS, V.B.; WELLBAUM, C.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. Fungos filamentosos do solo da Ilha dos Eucaliptos na Represa do Guarapiranga em São Paulo, SP. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 1, p. 101-110, 1998.
- SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 803-809, 2004.
- SCHIPPER, M. A. A. On *Mucor mucedo*, *Mucor flavus* and related species. **Studies in Mycology**, v. 10, p. 1-33, 1975.
- SCHIPPER, M. A. A. Two species of *Mucor* with oval and spherical-spored strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, n. 4, p. 475-488, 1970.
- SCHIPPER, M. A. A.; HINTIKKA, V. *Zygorrhynchus psychrophilus* sp. n. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 35, p. 29-32, 1969.

- SCHIPPER, M. A. A.; SAMSON, R.A. Miscellaneous notes on Mucoraceae. **Mycotaxon**, v. 50, p. 475-491, 1994.
- SCHIPPER, M.A.A. A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in Mycology**, v. 25, p. 1-19, 1984.
- SCHIPPER, M.A.A. A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species. **Studies in Mycology**, v. 4, p. 1-40, 1973.
- SCHIPPER, M.A.A. Notes on Mucorales – observations on *Absidia*. **Persoonia**, v. 14, n. 2, p. 133-148, 1990.
- SCHIPPER, M.A.A. Notes on *Zygorrhynchus* species. **Persoonia**, v. 13, n. 1, p. 97-105, 1986.
- SCHIPPER, M.A.A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Studies in Mycology**, v. 17, p. 1-52, 1978.
- SCHIPPER, M.A.A. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. **Studies in Mycology**, v. 12, p. 1-40, 1976.
- SCHIPPER, M.A.A.; STALPERS, J.A. A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rhizopus microsporus*-group. **Studies in Mycology**, v. 25, p. 20-34, 1984.
- SCHNEIDER, I.A.H.; RUBIO, J. Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 13, p. 2213-2217, 1999.
- SCHNEIDER, I.A.H.; RUBIO, J.; SMITH, R.W. Biosorption of metals onto plant biomass: exchange adsorption or surface precipitation? **International Journal of Mineral Processing**, v. 62, p. 111-120, 2001.
- SCHNEIDER, I.A.H.; SMITH, R.W.; RUBIO, J. Effect of mining chemicals on biosorption of Cu(II) by the non-living biomass of the macrophyte *Potamogeton lucens*. **Minerals Engineering**, v. 12, n. 3, p. 255-260, 1999.
- SCHOENLEIN, N.C.; CORSO, C.R.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; OLIVEIRA, L.H.S.; SOUZA, J.I. Diversidade de fungos filamentosos no solo do pólo cerâmico do município de Santa Gertrudes, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. **Resumos (cd-rom)...** São Paulo: SBM, 2005. p. 273 (caderno impresso).

- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. **Sucessão fúngica em folhas de *Alchornea triplinervia* (Spreng.) M. Arg. em ambientes aquático e terrestre, na Mata Atlântica, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP.** 1993. 373 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I. Fungos microscópicos da Mata Atlântica de Paranapiacaba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 1, p. 73-79, 1998.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I. Mucorales (Zygomycotina) da Mata Atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. **Acta Botanica Brasilica**, v. 11, n. 1, p. 95-101, 1997.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I. Sucessão fúngica em folhas de *Ficus microcarpa* L.F. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 95-101, 1989.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I.; TRUFEM, S.F.B.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; GRANDI, R.A.P.; SANTOS, M.L.; GIUSTRA, K.C. Microscopic fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 244-252, 2006.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; OKINO, L.K. I Catálogo da Coleção de Culturas de Fungos. São Paulo: Instituto de Botânica, 1994. 37 p.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; TAUKE, S.M. Fungal succession on *Ocotea pulchella* (Nees) Mez. leaves in decomposition on “cerrado” soil treated with vinasse. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 2, p. 179-183, 1991.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; TRUFEM, S.F.B.; MALATINSKY, S.M.M., NINOMIYA, A.; ANTUNES, M.F.R. Mucorales (Zygomycotina) from soil affected by excrement of birds in the “Parque Estadual das Fontes do Ipiranga”, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, n. 1, p. 7-10, 1996.
- SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE. **Mapeamento da vulnerabilidade e risco de poluição das águas subterrâneas no Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto Geológico / Cetesb, 1997. v. 1, 129 p.

- SILVA, L.R. **Tolerância e remoção de cádmio e cobre por *Aspergillus niger* van Tieghem e *Mucor hiemalis* Wehmer da Represa do Guarapiranga, em São Paulo, SP.** 2002. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.
- SKLADANY, G.J.; METTING Jr., F.B. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING Jr., F.B. (Ed.). **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management.** New York: Marcel Dekker, 1993. p. 483-513.
- SOLARI, P.; ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A.; STALIDIS, G.A. Removal of toxic metals by biosorption onto nonliving sewage sludge. **Separation Science and Technology**, v. 31, n. 8, p. 1075-1092, 1996.
- SOUZA, M.M.V.M.; LEITE, S.G.F. Biossorção de metais pesados. In: REUNIÃO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO MEIO AMBIENTE, 1, 1997, CAMPINAS. **Anais...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1997. p. 261-266.
- STRANDBERG, G.W.; SHUMATE II, S.E.; PARROTT Jr., J.R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 237-245, 1981.
- STROO, H.F.; KLEIN, T.M.; ALEXANDER, M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1107-1111, 1986.
- TAUK-TORNISIELO, S.M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D.S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 72-82, 2005.
- TOBIN, J.M.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 821-824, 1984.
- TOBIN, J.M.; ROUX, J.C. *Mucor* biosorbent for chromium removal from tanning effluent. **Water Research**, v. 32, n. 5, p. 1407-1416, 1998.

- TOBIN, J.M.; WHITE, C.; GADD, G.M. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 126-130, 1994.
- TRAINA, S.J.; LAPERCHE, V. Contaminant bioavailability in soils, sediments, and aquatic environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 3365-3371, 1999.
- TRINDADE, R.C. **Adsorção dos azo corantes crisoidina CI 11270 e amaranço CI 16185 por células de leveduras do gênero *Rhodotorula*; Influência de alguns componentes celulares e temperatura**. 1987. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1987.
- TRUFEM, S.F.B. Diversidade no reino Fungi: Zygomycota. In: JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. (Org.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX. São Paulo: FAPESP, 1999. Cap. 4, p. 33-42.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales (Zygomycetes) do Estado de São Paulo. São Paulo: 1978. 187p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) – Escola Paulista de Medicina.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 1. Gênero *Mucor* Micheli. **Rickia**, v. 9, p. 81-91, 1981a.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 2. Gêneros *Absidia* van Tieghem, *Gongronella* Ribaldi e *Rhizopus* Ehrenberg. **Rickia**, v. 9, p. 99-106, 1981b.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 3. Gêneros *Circinella* van Tieghem & Le Monnier e *Cunninghamella* Matruchot. **Rickia**, v. 9, p. 113-120, 1981c.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 4. Espécies coprófilas. **Rickia**, v. 11, p. 53-64, 1984.
- TRUFEM, S.F.B. Taxonomia de zigomicetos. In: BONONI, V.L.R. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1998a. p. 18-49.
- TRUFEM, S.F.B. Utilização de zigomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V.L.R. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de**

- Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas.** São Paulo: Instituto de Botânica, 1998b. p. 50-67.
- TRUFEM, S.F.B.; MALATINSZKY, S.M.M. Fungos micorrízicos arbusculares de Melastomataceae e outras plantas nativas resistentes e sensíveis à poluição na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 22, n. 1/2, p. 77-89, 1995.
- TRUFEM, S.F.B.; VIRIATO, A. Mucorales do Estado de São Paulo. 6. Mucoraceae coprófilas. **Rickia**, v. 12, p. 113-123, 1985.
- TSUI, K.M.; FRYAR, S.C.; HODGKISS, I.J.; HYDE, K.D.; POONYTH, A.D.; TAYLOR, J.E. The effect of human disturbance on fungal diversity in the tropics. **Fungal Diversity**, v. 1, n. 1, p. 19-26, 1998.
- UPADHYAY, H.P. *Helicostylum* and *Thamnostylum* (Mucorales). **Mycologia**, v. 65, p. 733-751, 1973.
- UPADHYAY, H.P. Soil fungi from north-east and north Brazil. VII. The genus *Gongronella*. **Nova Hedwigia**, v. 17, p. 65-73, 1969.
- UPADHYAY, H.P. Soil fungi from north-east and north Brazil. VIII. **Persoonia**, v. 6, n. 1, p. 111-117, 1970.
- UPADHYAY, H.P. Soil fungi from north-east Brazil. III. Phycomycetes. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 31, n. 1, p. 49-62, 1967.
- VALDMAN, E.; ERIJMAN, L.; PESSOA, F.L.P.; LEITE, S.G.F. Continuous biosorption of Cu and Zn by immobilized waste biomass *Sarghassum* sp. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 869-873, 2001.
- VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 44, p. 301-316, 1997.
- VICTORIA, R.L.; PICCOLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 105-119.
- VIEIRA, S. **Estatística experimental**. São Paulo: Editora Atlas, 1999. 185 p.
- VIRIATO, A. **Mucorales (Zygomycota) coprófilos e de solo: diversidade e aspectos ecológicos**. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) Universidade de Franca, Franca, 2003.

- VIRIATO, A.; TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 5. *Pilobolaceae*. **Rickia**, v. 12, p. 77-88, 1985a.
- VIRIATO, A.; TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 7. Espécies merosporangiadas. **Rickia**, v. 12, p. 147-154, 1985b.
- VOLESKY, B. 2004. **Equilibrium biosorption performance**. Sorption and biosorption - new book 2004: chapter 6. p. 103-116. Montreal: McGill University, 2004. Disponível em: <<http://www.biosorption.mcgill.ca/publication/index.htm>>. Acesso em: 09 out. 2005.
- VOLESKY, B.; HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 235-250, 1995.
- WAINWRIGHT, M. Fungi in environmental biotechnology. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **An Introduction to Fungal Biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1992. p. 81-101.
- WAINWRIGHT, M.; GADD, G.M. Fungi and industrial pollutants. In: ESSER, K.; LEMKE, P.A. (Ed.). **The mycota. Environmental and microbial relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 4, p. 85-97.
- WARCUP, J.H. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. **Nature**, v. 166, n. 4.211, p. 117-118, 1950.
- WATANABE, T. Two new species of homothallic *Mucor* in Japan. **Mycologia**, v. 86, n. 5, p. 691-695, 1994.
- WEITZMAN, I.; CRIST, M. Studies with clinical isolates of *Cunninghamella*. II Physiological and morphological studies. **Mycologia**, v. 72, p. 661-669, 1980.
- WEITZMAN, I.; CRIST, M. Studies with clinical isolates of *Cunninghamella*. I Mating behavior. **Mycologia**, v. 71, p. 1024-1033, 1979.
- WEITZMAN, I.; McGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G.; DELLA-LATTA, P. *Rhizopus schipperae*, sp. nov., a new agent of zygomycosis. **Mycotaxon**, v. 59, p. 217-225, 1996.
- WELLBAUM, C.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; SANTOS, V.B. Fungos filamentosos em folhas do ambiente terrestre e aquático da Ilha dos Eucaliptos, Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 1, p. 69-74, 1999.

- WHITE, C.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biochemical processes for treatment of contamination. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 503-516, 1997.
- WILHELMI, B.S.; DUNCAN, J.R. Metal recovery from *Saccharomyces cerevisiae* biosorption columns. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 9, p. 1007-1012, 1995.
- YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 243-249, 2001.
- ZAK, J.C. Response of soil fungal communities to disturbance. In: CARROLL, G.C.; WICKLOW, D.T. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 403-425.
- ZAK, J.C.; RABATIN, S.C. Organization and description of fungal communities. In: ESSER, K.; LEMKE, P.A. (Ed.). **The mycota. Environmental and microbial relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. v. 4, p. 33-46.
- ZALAR, P.; HENNEBERT, G.L.; GUNDE-CIMERMAN, N.; CIMERMAN, A. *Mucor troglophilus*, a new species from cave crickets. **Mycotaxon**, v. 65, p. 507-516, 1997.
- ZHENG, R.Y.; CHEN, G.Q. A monograph of *Cunninghamella*. **Mycotaxon**, v. 80, p. 1-75, 2001.
- ZHENG, R.Y.; CHEN, G.Q. *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* var. nov. **Mycotaxon**, v. 69, p. 181-186, 1998.
- ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A.; HANCOCK, I.C. Biosorption of metals from dilute aqueous solutions. **Separation and Purification Methods**, v. 26, n. 2, p. 255-295, 1997.



## 8. APÊNDICES

### 8.1. Apêndice 1 - ANOVA Curvas de Crescimento

Análise de variância dos resultados obtidos nos ensaios de curvas de crescimento (biomassa, g) e de pH final (pHf) do MA líquido para *M. hiemalis* (SPC 2042, 2044, 2043, 2040 e 2041) e *Mucor bainieri* (SPC 2033), segundo os tratamentos analisados: linhagens, dias, pHi do MA líquido e linhagens x dias.

**Variável analisada: Biomassa**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Linhagens	5	0.001197	0.000239	79.405	0.0000
Dias	9	0.006000	0.000667	221.138	0.0000
pHi	3	0.000773	0.000258	85.464	0.0000
Linhagens*Dias	45	0.000954	0.000021	7.032	0.0000
erro	117	0.000353	0.000003		
Total corrigido	179	0.009276			
CV (%) =	8.92				
Média geral:	0.0194539	Número de observações:	180		

---

**Teste Tukey para a FV Linhagens**

---

DMS: 0,00129930863605277 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 30

Erro padrão: 0,000316995281085465

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.015663	a1
4	0.017890	a2
6	0.018623	a2 a3
1	0.019267	a3
3	0.021627	a4
2	0.023653	a5

---



---

**Teste Tukey para a FV Dias**

---

DMS: 0,00186714861606601 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 18

Erro padrão: 0,000409239148156781

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.006850	a1
2	0.012767	a2
3	0.016406	a3
5	0.018228	a3 a4
4	0.019628	a4
6	0.021728	a5
8	0.023622	a6
12	0.024489	a6 a7
16	0.025267	a6 a7
20	0.025556	a7

---



---

**Teste Tukey para a FV pHi**

---

DMS: 0,00101213682472698 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 40

Erro padrão: 0,000274525966299801

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	0.015663	a1
5,3	0.017890	a2
5,1	0.020125	a3
5	0.021460	a4

**Análise do desdobramento de Linhagens dentro de cada nível de:Dias**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Linhagens	/1 5	0.000106	0.000021	7.017	0.0000
Linhagens	/2 5	0.000011	0.000002	0.720	0.6093
Linhagens	/3 5	0.000078	0.000016	5.202	0.0002
Linhagens	/4 5	0.000456	0.000091	30.233	0.0000
Linhagens	/5 5	0.000134	0.000027	8.897	0.0000
Linhagens	/6 5	0.000259	0.000052	17.153	0.0000
Linhagens	/8 5	0.000266	0.000053	17.658	0.0000
Linhagens	/12 5	0.000343	0.000069	22.763	0.0000
Linhagens	/16 5	0.000367	0.000073	24.368	0.0000
Linhagens	/20 5	0.000131	0.000026	8.682	0.0000
Resíduo	117	0.000353	0.000003		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 1**

Teste Tukey para a FV Linhagens

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

3	0.004167	a1
4	0.005000	a1
1	0.006200	a1
2	0.006967	a1
5	0.007000	a1
6	0.011767	a2

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 2**

-----

Teste Tukey para a FV Linhagens

-----

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

-----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	0.011667	a1
6	0.012300	a1
5	0.012333	a1
4	0.012767	a1
2	0.013733	a1
1	0.013800	a1

-----

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 3**

-----

Teste Tukey para a FV Linhagens

-----

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

-----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.013733	a1
4	0.013967	a1
6	0.016333	a1 a2
1	0.016900	a1 a2
3	0.017800	a1 a2
2	0.019700	a2

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 4**  
 -----

Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.015933	a1
4	0.016600	a1
3	0.017333	a1
1	0.018033	a1
6	0.019233	a1
2	0.030633	a2

-----

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 5**  
 -----

Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.015833	a1
5	0.015967	a1
4	0.016633	a1
6	0.016933	a1
2	0.021233	a2
3	0.022767	a2

-----

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 6**  
 -----

Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.015667	a1
4	0.018933	a1 a2
6	0.020000	a2
1	0.024533	a3
2	0.025100	a3
3	0.026133	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 8**

---

Teste Tukey para a FV Linhagens

---

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.016900	a1
6	0.021267	a2
4	0.022400	a2 a3
1	0.026200	a3 a4
3	0.027367	a4
2	0.027600	a4

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 12**

---

Teste Tukey para a FV Linhagens

---

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.018100	a1
6	0.021700	a1 a2
1	0.022600	a2
4	0.024467	a2
2	0.029433	a3
3	0.030633	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 16**

---

Teste Tukey para a FV Linhagens

---

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.019300	a1
6	0.022733	a1 a2
1	0.023433	a2
4	0.023600	a2
3	0.030200	a3
2	0.032333	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 20**

---

Teste Tukey para a FV Linhagens

---

DMS: 0,00410877467345352 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5	0.021700	a1
6	0.023967	a1

4	0.024533	a1	a2
1	0.025133	a1	a2
3	0.028200	a2	a3
2	0.029800		a3

-----  
**Análise do desdobramento de Dias dentro de cada nível de: Linhagens**  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Dias	/SPC 2042	9	0.001075	0.000119	39.611	0.0000
Dias	/SPC 2044	9	0.001834	0.000204	67.589	0.0000
Dias	/SPC 2043	9	0.002069	0.000230	76.242	0.0000
Dias	/SPC 2040	9	0.001057	0.000117	38.972	0.0000
Dias	/SPC 2041	9	0.000441	0.000049	16.273	0.0000
Dias	/SPC 2033	9	0.000478	0.000053	17.610	0.0000
Resíduo		117	0.000353	0.000003		

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2042**  
 -----

Teste Tukey para a FV Dias

DMS: 0,00457356138330551 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.006200	a1
2	0.013800	a2
5	0.015833	a2
3	0.016900	a2
4	0.018033	a2 a3
12	0.022600	a3 a4
16	0.023433	a4
6	0.024533	a4
20	0.025133	a4
8	0.026200	a4



**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2044**

-----  
 Teste Tukey para a FV Dias  
 -----

DMS: 0,00457356138330551 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,00100242709575536  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.006967	a1
2	0.013733	a2
3	0.019700	a3
5	0.021233	a3 a4
6	0.025100	a4 a5
8	0.027600	a5 a6
12	0.029433	a5 a6 a7
20	0.029800	a6 a7
4	0.030633	a6 a7
16	0.032333	a7

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2043**

-----  
 Teste Tukey para a FV Dias  
 -----

DMS: 0,00457356138330551 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,00100242709575536  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.004167	a1
2	0.011667	a2
4	0.017333	a3
3	0.017800	a3
5	0.022767	a4
6	0.026133	a4 a5
8	0.027367	a5
20	0.028200	a5
16	0.030200	a5
12	0.030633	a5

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2040**

---

Teste Tukey para a FV Dias

---

DMS: 0,00457356138330551 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.005000	a1
2	0.012767	a2
3	0.013967	a2
4	0.016600	a2 a3
5	0.016633	a2 a3
6	0.018933	a3 a4
8	0.022400	a4 a5
16	0.023600	a5
12	0.024467	a5
20	0.024533	a5

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2041**

---

Teste Tukey para a FV Dias

---

DMS: 0,00457356138330551 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.007000	a1
2	0.012333	a2
3	0.013733	a2 a3
6	0.015667	a2 a3 a4
4	0.015933	a2 a3 a4
5	0.015967	a2 a3 a4
8	0.016900	a2 a3 a4
12	0.018100	a3 a4 a5

16	0.019300	a4 a5
20	0.021700	a5

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2033**

-----

Teste Tukey para a FV Dias

-----

DMS: 0,00457356138330551 NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00100242709575536

-----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.011767	a1
2	0.012300	a1
3	0.016333	a1 a2
5	0.016933	a2 a3
4	0.019233	a2 a3 a4
6	0.020000	a2 a3 a4 a5
8	0.021267	a3 a4 a5
12	0.021700	a4 a5
16	0.022733	a4 a5
20	0.023967	a5

-----

**Variável analisada: pHf**

-----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Linhagens	5	7.506225	1.501245	15.993	0.0000
Dias	9	0.450738	0.050082	0.534	0.8476
pHi	3	3.227558	1.075853	11.461	0.0000
Linhagens*Dias	45	6.323025	0.140512	1.497	0.0444
erro	117	10.982908	0.093871		

-----

Total corrigido 179 28.490455

-----

CV (%) = 6.16

Média geral: 4.9755000 Número de observações: 180

---



---

**Teste Tukey para a FV Linhagens**

---

DMS: 0,229279195435957 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 30

Erro padrão: 0,0559377664302069

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.700000	a1
1	4.783333	a1 a2
3	4.920000	a1 a2
4	4.986333	a2 a3
5	5.193333	a3 a4
2	5.270000	a4

---



---



---

**Teste Tukey para a FV Dias**

---

DMS: 0,329481633979989 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 18

Erro padrão: 0,0722153459360772

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
12	4.900000	a1
4	4.905556	a1
20	4.922222	a1
3	4.949444	a1
1	4.983333	a1
5	5.000000	a1
6	5.000000	a1
8	5.022222	a1
16	5.027778	a1
2	5.044444	a1

---



---



---

**Teste Tukey para a FV pH<sub>i</sub>**

-----  
 DMS: 0,178604151781442 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 40

Erro padrão: 0,0484435267595195  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,1	4.810000	a1
5,3	4.986333	a1 a2
5	5.026667	a2 a3
6	5.193333	a3

-----

-----  
**Análise do desdobramento de Linhagens dentro de cada nível de: Dias**  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Linhagens	/1 5	0.731667	0.146333	1.559	0.1768
Linhagens	/2 5	2.057778	0.411556	4.384	0.0011
Linhagens	/3 5	0.752028	0.150406	1.602	0.1645
Linhagens	/4 5	0.996111	0.199222	2.122	0.0673
Linhagens	/5 5	1.240000	0.248000	2.642	0.0265
Linhagens	/6 5	1.160000	0.232000	2.471	0.0361
Linhagens	/8 5	1.417778	0.283556	3.021	0.0133
Linhagens	/12 5	1.080000	0.216000	2.301	0.0490
Linhagens	/16 5	3.389444	0.677889	7.221	0.0000
Linhagens	/20 5	1.004444	0.200889	2.140	0.0652
Resíduo	117	10.982908	0.093871		

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 1**  
 -----

Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4	4.700000	a1
6	4.900000	a1
3	4.900000	a1
1	4.900000	a1
5	5.233333	a1
2	5.266667	a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 2**

Teste Tukey para a FV Linhagens

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4	4.700000	a1
3	4.833333	a1
6	4.900000	a1
1	4.933333	a1
5	5.166667	a1 a2
2	5.733333	a2

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 3**

Teste Tukey para a FV Linhagens

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.733333	a1
2	4.833333	a1
1	4.833333	a1

4 4.930000 a1  
 3 5.000000 a1  
 5 5.366667 a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 4**

Teste Tukey para a FV Linhagens

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.700000	a1
1	4.766667	a1
2	4.800000	a1
4	4.800000	a1
3	4.966667	a1
5	5.400000	a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 5**

Teste Tukey para a FV Linhagens

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	4.733333	a1
6	4.733333	a1
3	4.833333	a1
4	5.033333	a1
5	5.233333	a1
2	5.433333	a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 6**

-----  
 Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.633333	a1
3	4.900000	a1 a2
1	4.900000	a1 a2
4	4.933333	a1 a2
5	5.200000	a1 a2
2	5.433333	a2

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 8**  
 -----

Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.633333	a1
1	4.766667	a1 a2
3	4.933333	a1 a2
4	5.100000	a1 a2
5	5.233333	a1 a2
2	5.466667	a2

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 12**  
 -----

Teste Tukey para a FV Linhagens  
 -----

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05  
 -----



Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.600000	a1
2	4.700000	a1
1	4.700000	a1
3	5.000000	a1
5	5.200000	a1
4	5.200000	a1

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 16**

---

Teste Tukey para a FV Linhagens

---

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4.566667	a1
1	4.633333	a1 a2
5	4.833333	a1 a2
3	5.000000	a1 a2
4	5.300000	a2 a3
2	5.833333	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Linhagens dentro da codificação: 20**

---

Teste Tukey para a FV Linhagens

---

DMS: 0,725044477668508 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

```

-----
6                4.600000 a1
1                4.666667 a1
3                4.833333 a1
5                5.066667 a1
4                5.166667 a1
2                5.200000 a1
-----

```

-----

**Análise do desdobramento de Dias dentro de cada nível de: Linhagens**

-----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

```

-----
FV                GL                SQ                QM                Fc  Pr>Fc
-----
Dias  /SPC 2042    9                0.295000          0.032778          0.349 0.9561
Dias  /SPC 2044    9                4.096333          0.455148          4.849 0.0000
Dias  /SPC 2043    9                0.134667          0.014963          0.159 0.9974
Dias  /SPC 2040    9                1.189097          0.132122          1.407 0.1925
Dias  /SPC 2041    9                0.672000          0.074667          0.795 0.6210
Dias  /SPC 2033    9                0.386667          0.042963          0.458 0.8999
Resíduo                117            10.982908          0.093871
-----

```

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2042**

-----

Teste Tukey para a FV Dias

-----

DMS: 0,807061882869424 NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

-----

```

-----
Tratamentos                Médias                Resultados do teste
-----
16                4.633333 a1
20                4.666667 a1
12                4.700000 a1
5                4.733333 a1
8                4.766667 a1
4                4.766667 a1
3                4.833333 a1
1                4.900000 a1
6                4.900000 a1
-----

```

2 4.933333 a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2044**

Teste Tukey para a FV Dias

DMS: 0,807061882869424 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
12	4.700000	a1
4	4.800000	a1
3	4.833333	a1
20	5.200000	a1 a2
1	5.266667	a1 a2
6	5.433333	a1 a2
5	5.433333	a1 a2
8	5.466667	a1 a2
2	5.733333	a2
16	5.833333	a2

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2043**

Teste Tukey para a FV Dias

DMS: 0,807061882869424 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
20	4.833333	a1
5	4.833333	a1
2	4.833333	a1
1	4.900000	a1
6	4.900000	a1
8	4.933333	a1
4	4.966667	a1

3 5.000000 a1  
 16 5.000000 a1  
 12 5.000000 a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2040**

Teste Tukey para a FV Dias

DMS: 0,807061882869424 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	4.700000	a1
2	4.700000	a1
4	4.800000	a1
3	4.930000	a1
6	4.933333	a1
5	5.033333	a1
8	5.100000	a1
20	5.166667	a1
12	5.200000	a1
16	5.300000	a1

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2041**

Teste Tukey para a FV Dias

DMS: 0,807061882869424 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,17689074914196

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
16	4.833333	a1
20	5.066667	a1
2	5.166667	a1
6	5.200000	a1
12	5.200000	a1

8	5.233333 a1
1	5.233333 a1
5	5.233333 a1
3	5.366667 a1
4	5.400000 a1

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Dias dentro da codificação: SPC 2033**

-----

Teste Tukey para a FV Dias

-----

DMS: 0,807061882869424 NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,17689074914196

-----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
16	4.566667 a1	
12	4.600000 a1	
20	4.600000 a1	
8	4.633333 a1	
6	4.633333 a1	
4	4.700000 a1	
3	4.733333 a1	
5	4.733333 a1	
1	4.900000 a1	
2	4.900000 a1	

-----

## 8.2. Apêndice 2 - ANOVA Biossorção

Análise de variância dos resultados obtidos nos ensaios de biossorção de Pb e Zn pela biomassa de *M. hiemalis* SPC 2044, *M. hiemalis* SPC 2040 e o carvão ativado (CA), segundo os tratamentos analisados: materiais adsorventes, Ci e materiais adsorventes x Ci em relação às variáveis Cf (mg L<sup>-1</sup>), q (mg g<sup>-1</sup>), qM (mM g<sup>-1</sup>) e q%.

## Biossorção Pb

Variável analisada: Cf

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	2	251.347652	125.673826	251.752	0.0000
Ci	2	53.662585	26.831293	53.749	0.0000
Adsorvente*Ci	4	40.087104	10.021776	20.076	0.0000
erro	18	8.985533	0.499196		
Total corrigido	26	354.082874			
CV (%) =	16.49				
Média geral:	4.2851852	Número de observações:	27		

### Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,850458202188754 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,235512749429904

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CA	0.000000	a1
SPC 2044	5.990000	a2
SPC 2040	6.865556	a3

### Teste Tukey para a FV Ci

DMS: 0,850458202188754 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,235512749429904

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	2.360000	a1
26,65	4.798889	a2
35,66	5.696667	a3

---



---

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

---

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

---

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente /13,06	2	25.371467	12.685733	25.412	0.0000
Adsorvente /26,65	2	118.578822	59.289411	118.770	0.0000
Adsorvente /35,66	2	147.484467	73.742233	147.722	0.0000
Resíduo	18	8.985533	0.499196		

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 13,06**

---

Teste Tukey para a FV Adsorvente

---

DMS: 1,47303681590461 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,407920047842833

---



---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CA	0.000000	a1
SPC 2044	3.313333	a2
SPC 2040	3.766667	a2

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 26,65**

---

Teste Tukey para a FV Adsorvente

---

DMS: 1,47303681590461 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,407920047842833

```
-----
Tratamentos                Médias      Resultados do teste
-----
CA                          0.000000   a1
SPC 2044                    5.620000   a2
SPC 2040                    8.776667   a3
-----
```

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 35,66**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 1,47303681590461 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,407920047842833

```
-----
Tratamentos                Médias      Resultados do teste
-----
CA                          0.000000   a1
SPC 2040                    8.053333   a2
SPC 2044                    9.036667   a2
-----
```

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de: Adsorvente**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

```
-----
FV          GL          SQ          QM          Fc  Pr>Fc
-----
Ci          /CA          2          0.000000    0.000000    0.000 1.0000
Ci          /SPC 2040    2          43.998822    21.999411    44.070 0.0000
Ci          /SPC 2044    2          49.750867    24.875433    49.831 0.0000
Resíduo          18          8.985533    0.499196
-----
```

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**

Teste Tukey para a FV Ci



DMS: 1,47303681590461 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,407920047842833

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
35,66	0.000000	a1
26,65	0.000000	a1
13,06	0.000000	a1

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 1,47303681590461 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,407920047842833

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	3.766667	a1
35,66	8.053333	a2
26,65	8.776667	a2

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 1,47303681590461 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,407920047842833

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	3.313333	a1
26,65	5.620000	a2

35,66

9.036667

a3

-----

-----

**Variável analisada: q mg/g**

-----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	2	62.875400	31.437700	250.182	0.0000
Ci	2	420.796867	210.398433	1674.357	0.0000
Adsorvente*Ci	4	10.053867	2.513467	20.002	0.0000
erro	18	2.261867	0.125659		
Total corrigido	26	495.988000			
CV (%) =	3.40				
Média geral:	10.4200000	Número de observações:	27		

-----

**Teste Tukey para a FV Adsorvente**

-----

DMS: 0,426692043250302 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,118161499303688

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2040	9.130000	a1
SPC 2044	9.566667	a2
CA	12.563333	a3

-----

**Teste Tukey para a FV Ci**

-----

DMS: 0,426692043250302 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,118161499303688

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	5.351111	a1
26,65	10.927778	a2
35,66	14.981111	a3

---



---

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

---

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

---

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	/13,06	2	6.328822	3.164411	25.182	0.0000
Adsorvente	/26,65	2	29.712622	14.856311	118.227	0.0000
Adsorvente	/35,66	2	36.887822	18.443911	146.777	0.0000
Resíduo		18	2.261867	0.125659		

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 13,06**

---

Teste Tukey para a FV Adsorvente

---

DMS: 0,7390522980949 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,204661720292502

---



---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2040	4.650000	a1
SPC 2044	4.873333	a1
CA	6.530000	a2

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 26,65**

---

Teste Tukey para a FV Adsorvente

---

DMS: 0,7390522980949 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,204661720292502

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2040	8.936667	a1
SPC 2044	10.516667	a2
CA	13.330000	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 35,66**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,7390522980949 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,204661720292502

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	13.310000	a1
SPC 2040	13.803333	a1
CA	17.830000	a2

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de:Adsorvente**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci	/CA	2	194.180000	97.090000	772.645	0.0000
Ci	/SPC 2040	2	125.843467	62.921733	500.733	0.0000
Ci	/SPC 2044	2	110.827267	55.413633	440.983	0.0000
Resíduo		18	2.261867	0.125659		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**

Teste Tukey para a FV Ci

DMS: 0,7390522980949 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,204661720292502

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	6.530000	a1
26,65	13.330000	a2
35,66	17.830000	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 0,7390522980949 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,204661720292502

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	4.650000	a1
26,65	8.936667	a2
35,66	13.803333	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 0,7390522980949 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,204661720292502

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	4.873333	a1



Erro padrão: 0,001111111111111111

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	0.023333	a1
26,65	0.051111	a2
35,66	0.073333	a3

---

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

---

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

---

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente /13,06	2	0.000200	0.000100	9.000	0.0018
Adsorvente /26,65	2	0.000422	0.000211	19.000	0.0000
Adsorvente /35,66	2	0.001267	0.000633	57.000	0.0000
Resíduo	18	0.000200	0.000011		

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 13,06**

---

Teste Tukey para a FV Adsorvente

---

DMS: 0,006949549768279 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00192450089729875

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	0.020000	a1
SPC 2040	0.020000	a1
CA	0.030000	a2

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 26,65**

---

Teste Tukey para a FV Adsorvente

---

DMS: 0,006949549768279 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00192450089729875

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2040	0.043333	a1
SPC 2044	0.050000	a1
CA	0.060000	a2

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 35,66**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,006949549768279 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00192450089729875

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	0.063333	a1
SPC 2040	0.066667	a1
CA	0.090000	a2

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de:Adsorvente**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci /CA	2	0.005400	0.002700	243.000	0.0000
Ci /SPC 2040	2	0.003267	0.001633	147.000	0.0000
Ci /SPC 2044	2	0.002956	0.001478	133.000	0.0000
Resíduo	18	0.000200	0.000011		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**



Teste Tukey para a FV Ci

DMS: 0,006949549768279 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
Erro padrão: 0,00192450089729875

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	0.030000	a1
26,65	0.060000	a2
35,66	0.090000	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**

Teste Tukey para a FV Ci

DMS: 0,006949549768279 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
Erro padrão: 0,00192450089729875

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
13,06	0.020000	a1
26,65	0.043333	a2
35,66	0.066667	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**

Teste Tukey para a FV Ci

DMS: 0,006949549768279 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
Erro padrão: 0,00192450089729875

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

13,06	0.020000	a1
26,65	0.050000	a2
35,66	0.063333	a3

-----

-----

**Variável analisada: q%**

-----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	2	1036.039622	518.019811	266.769	0.0000
Ci	2	6.390067	3.195033	1.645	0.2207
Adsorvente*Ci	4	43.551244	10.887811	5.607	0.0041
erro	18	34.952867	1.941826		

-----

Total corrigido            26            1120.933800

-----

CV (%) =                    3.37

Média geral:            41.323333            Número de observações:            27

-----

-----

**Teste Tukey para a FV Adsorvente**

-----

DMS: 1,67734517740111    NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,464498047588999

-----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2040	35.938889	a1
SPC 2044	38.031111	a2
CA	50.000000	a3

-----

-----

**Teste Tukey para a FV Ci**

-----

DMS: 1,67734517740111    NMS: 0,05

-----

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,464498047588999

```
-----
Tratamentos                Médias      Resultados do teste
-----
13,06                       40.964444  a1
26,65                       40.994444  a1
35,66                       42.011111  a1
-----
```

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

```
-----
FV              GL          SQ          QM          Fc  Pr>Fc
-----
Adsorvente /13,06  2          371.927089  185.963544  95.767 0.0000
Adsorvente /26,65  2          417.578956  208.789478  107.522 0.0000
Adsorvente /35,66  2          290.084822  145.042411  74.694 0.0000
Resíduo              18          34.952867   1.941826
-----
```

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 13,06**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 2,90524706908935 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,804534218440692

```
-----
Tratamentos                Médias      Resultados do teste
-----
SPC 2040                   35.576667  a1
SPC 2044                   37.316667  a1
CA                          50.000000  a2
-----
```

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 26,65**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 2,90524706908935 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,804534218440692

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2040	33.530000	a1
SPC 2044	39.453333	a2
CA	50.000000	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 35,66**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 2,90524706908935 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,804534218440692

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	37.323333	a1
SPC 2040	38.710000	a1
CA	50.000000	a2

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de: Adsorvente**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci /CA	2	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Ci /SPC 2040	2	40.839022	20.419511	10.516	0.0009
Ci /SPC 2044	2	9.102289	4.551144	2.344	0.1214
Resíduo	18	34.952867	1.941826		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 2,90524706908935 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,804534218440692

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
35,66	50.000000	a1
26,65	50.000000	a1
13,06	50.000000	a1

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: 2040**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 2,90524706908935 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,804534218440692

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
26,65	33.530000	a1
13,06	35.576667	a1
35,66	38.710000	a2

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: 2044**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 2,90524706908935 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,804534218440692

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

---

13,06 37.316667 a1  
 35,66 37.323333 a1  
 26,65 39.453333 a1

## Biossorção Zn

Variável analisada: Cf

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	2	120.381813	60.190906	304.389	0.0000
Ci	2	69.012002	34.506001	174.499	0.0000
Adsorvente*Ci	4	30.742494	7.685624	38.867	0.0000
erro	18	3.559381	0.197743		
Total corrigido	26	223.695690			
CV (%) =	14.12				
Média geral:	3.1503407	Número de observações:	27		

### Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,535264305054675 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,148227823343557

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CA	0.785222	a1
SPC 2040	2.754122	a2
SPC 2044	5.911678	a3

### Teste Tukey para a FV Ci

DMS: 0,535264305054675 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,148227823343557

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	1.277100	a1
10,75	2.990500	a2
15,33	5.183422	a3

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente /5,34	2	7.750439	3.875220	19.597	0.0000
Adsorvente /10,75	2	35.081073	17.540537	88.704	0.0000
Adsorvente /15,33	2	108.292794	54.146397	273.822	0.0000
Resíduo	18	3.559381	0.197743		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 5,34**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,927104971832744 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,256738121126385

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CA	0.158300	a1
SPC 2040	1.242400	a2
SPC 2044	2.430600	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 10,75**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 0,927104971832744 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,256738121126385  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CA	1.075500	a1
SPC 2040	2.188333	a2
SPC 2044	5.707667	a3

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 15,33**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 0,927104971832744 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,256738121126385  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
CA	1.121867	a1
SPC 2040	4.831633	a2
SPC 2044	9.596767	a3

-----

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de: Adsorvente**

-----  
 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA  
 -----

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci	/CA	2	1.771866	0.885933	4.480	0.0253
Ci	/SPC 2044	2	77.218209	38.609105	195.249	0.0000
Ci	/SPC 2040	2	20.764421	10.382210	52.503	0.0000
Resíduo		18	3.559381	0.197743		



-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci  
 -----

DMS: 0,927104971832744 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,256738121126385  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	0.158300	a1
10,75	1.075500	a1 a2
15,33	1.121867	a2

-----

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci  
 -----

DMS: 0,927104971832744 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,256738121126385  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	2.430600	a1
10,75	5.707667	a2
15,33	9.596767	a3

-----

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci  
 -----

DMS: 0,927104971832744 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,256738121126385

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	1.242400	a1
10,75	2.188333	a2
15,33	4.831633	a3

---



---

**Variável analisada: q mg/g**

---

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

---

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	2	30.149385	15.074693	305.385	0.0000
Ci	2	42.283941	21.141970	428.296	0.0000
Adsorvente*Ci	4	7.718104	1.929526	39.089	0.0000
erro	18	0.888533	0.049363		
Total corrigido	26	81.039963			
CV (%) =	6.07				
Média geral:	3.6629630	Número de observações:	27		

---



---

**Teste Tukey para a FV Adsorvente**

---

DMS: 0,26743479228761 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,0740592577774814

---



---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	2.281111	a1
SPC 2040	3.861111	a2
CA	4.846667	a3

---



---

**Teste Tukey para a FV Ci**

---

DMS: 0,26743479228761 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,0740592577774814

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	2.033333	a1
10,75	3.880000	a2
15,33	5.075556	a3

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	/5,34	2	1.939267	0.969633	19.643	0.0000
Adsorvente	/10,75	2	8.782467	4.391233	88.958	0.0000
Adsorvente	/15,33	2	27.145756	13.572878	274.961	0.0000
Resíduo		18	0.888533	0.049363		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 5,34**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,463210647953769 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,128274397241438

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	1.456667	a1
SPC 2040	2.050000	a2
CA	2.593333	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 10,75**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 0,463210647953769 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,128274397241438  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	2.520000	a1
SPC 2040	4.283333	a2
CA	4.836667	a3

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 15,33**  
 -----

Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 0,463210647953769 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,128274397241438  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	2.866667	a1
SPC 2040	5.250000	a2
CA	7.110000	a3

-----

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de: Adsorvente**  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci	/CA	2	30.600867	15.300433	309.958	0.0000
Ci	/SPC 2044	2	3.238956	1.619478	32.808	0.0000
Ci	/SPC 2040	2	16.162222	8.081111	163.708	0.0000
Resíduo		18	0.888533	0.049363		

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci  
 -----

DMS: 0,463210647953769 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,128274397241438  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	2.593333	a1
10,75	4.836667	a2
15,33	7.110000	a3

-----

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci  
 -----

DMS: 0,463210647953769 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,128274397241438  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	1.456667	a1
10,75	2.520000	a2
15,33	2.866667	a2

-----

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci  
 -----

DMS: 0,463210647953769 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,128274397241438

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	2.050000	a1
10,75	4.283333	a2
15,33	5.250000	a3

---



---

**Variável analisada: q mM/g**

---

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

---

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente	2	0.007756	0.003878	209.400	0.0000
Ci	2	0.010067	0.005033	271.800	0.0000
Adsorvente*Ci	4	0.002111	0.000528	28.500	0.0000
erro	18	0.000333	0.000019		
Total corrigido	26	0.020267			
CV (%) =	7.75				
Média geral:	0.0555556	Número de observações:	27		

---



---

**Teste Tukey para a FV Adsorvente**

---

DMS: 0,00517988856496325 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,00143443827637312

---



---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	0.033333	a1
SPC 2040	0.058889	a2
CA	0.074444	a3

---



---

**Teste Tukey para a FV Ci**

---

DMS: 0,00517988856496325 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,00143443827637312

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	0.030000	a1
10,75	0.060000	a2
15,33	0.076667	a3

**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente /5,34	2	0.000600	0.000300	16.200	0.0001
Adsorvente /10,75	2	0.001867	0.000933	50.400	0.0000
Adsorvente /15,33	2	0.007400	0.003700	199.800	0.0000
Resíduo	18	0.000333	0.000019		

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 5,34**

Teste Tukey para a FV Adsorvente

DMS: 0,00897183017206139 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00248451997499977

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	0.020000	a1
SPC 2040	0.030000	a2
CA	0.040000	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 10,75**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 0,00897183017206139 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,00248451997499977  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	0.040000	a1
SPC 2040	0.066667	a2
CA	0.073333	a2

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 15,33**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 0,00897183017206139 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,00248451997499977  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	0.040000	a1
SPC 2040	0.080000	a2
CA	0.110000	a3

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de: Adsorvente**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci	/CA	2	0.007356	0.003678	198.600	0.0000
Ci	/SPC 2044	2	0.000800	0.000400	21.600	0.0000
Ci	/SPC 2040	2	0.004022	0.002011	108.600	0.0000



Resíduo 18 0.000333 0.000019

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 0,00897183017206139 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00248451997499977

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	0.040000	a1
10,75	0.073333	a2
15,33	0.110000	a3

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 0,00897183017206139 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00248451997499977

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
5,34	0.020000	a1
15,33	0.040000	a2
10,75	0.040000	a2

---

**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**

---

Teste Tukey para a FV Ci

---

DMS: 0,00897183017206139 NMS: 0,05

---

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,00248451997499977

```

-----
Tratamentos                Médias      Resultados do teste
-----
5,34                       0.030000  a1
10,75                      0.066667  a2
15,33                      0.080000  a3
-----

```

**Variável analisada: q%**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

```

-----
FV              GL          SQ              QM              Fc  Pr>Fc
-----
Adsorvente      2          2521.056585      1260.528293      465.458 0.0000
Ci              2          111.905541       55.952770       20.661 0.0000
Adsorvente*Ci  4          67.239504       16.809876       6.207 0.0025
erro           18          48.746600       2.708144
-----
Total corrigido 26          2748.948230
-----
CV (%) =          4.60
Média geral:     35.7462963  Número de observações: 27
-----

```

**Teste Tukey para a FV Adsorvente**

DMS: 1,98085738565794 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 9

Erro padrão: 0,548548027315389

```

-----
Tratamentos                Médias      Resultados do teste
-----
SPC 2044                  23.140000  a1
SPC 2040                  37.481111  a2
CA                        46.617778  a3
-----

```

**Teste Tukey para a FV Ci**

-----  
 DMS: 1,98085738565794 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 9  
 Erro padrão: 0,548548027315389  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
15,33	33.098889	a1
10,75	36.090000	a2
5,34	38.050000	a2

-----

-----  
**Análise do desdobramento de Adsorvente dentro de cada nível de: Ci**  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Adsorvente /5,34	2	678.461600	339.230800	125.263	0.0000
Adsorvente /10,75	2	758.780867	379.390433	140.092	0.0000
Adsorvente /15,33	2	1151.053622	575.526811	212.517	0.0000
Resíduo	18	48.746600	2.708144		

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 5,34**  
 -----

Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 3,43094563450761 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,950113053701935  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	27.256667	a1
SPC 2040	38.376667	a2
CA	48.516667	a3

-----

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 10,75**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 3,43094563450761 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,950113053701935  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	23.453333	a1
SPC 2040	39.820000	a2
CA	44.996667	a3

**Teste de Tukey para o desdobramento de Adsorvente dentro da codificação: 15,33**

-----  
 Teste Tukey para a FV Adsorvente  
 -----

DMS: 3,43094563450761 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,950113053701935  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
SPC 2044	18.710000	a1
SPC 2040	34.246667	a2
CA	46.340000	a3

**Análise do desdobramento de Ci dentro de cada nível de: Adsorvente**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ci	/CA	2	18.932822	9.466411	3.496	0.0504
Ci	/SPC 2044	2	110.010067	55.005033	20.311	0.0000
Ci	/SPC 2040	2	50.202156	25.101078	9.269	0.0016

Resíduo 18 48.746600 2.708144

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: CA**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci

-----  
 DMS: 3,43094563450761 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,950113053701935  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10,75	44.996667	a1
15,33	46.340000	a1 a2
5,34	48.516667	a2

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2044**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci

-----  
 DMS: 3,43094563450761 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,950113053701935  
 -----

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
15,33	18.710000	a1
10,75	23.453333	a2
5,34	27.256667	a3

-----  
**Teste de Tukey para o desdobramento de Ci dentro da codificação: SPC 2040**  
 -----

Teste Tukey para a FV Ci

-----  
 DMS: 3,43094563450761 NMS: 0,05  
 -----

Média harmônica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 0,950113053701935

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
-------------	--------	---------------------

---

15,33	34.246667	a1
-------	-----------	----

5,34	38.376667	a2
------	-----------	----

10,75	39.820000	a2
-------	-----------	----

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)