

Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial

Toxicity effect of Cr (VI) and Zn (II) on growth of filamentous fungi *Aspergillus niger* isolated from industrial effluent

Maria do Socorro Vale

Química Industrial e Mestre em Química Inorgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutora em Engenharia Civil – área de concentração em Saneamento Ambiental pela UFC

Katiany do Vale Abreu

Química pela Universidade Estadual do Ceará (UECE). Mestranda em Ecologia e Recursos Naturais pela UFC

Sandro Thomaz Gouveia

Graduado em Química pela UFC. Mestre em Química pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFScar). Professor adjunto I da UFC

Renato Carrhá Leitão

Engenheiro Civil. Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical. Mestre em Hidráulica e Saneamento. Doutor em Ciências Ambientais pela Universidade de Wageningen, Holanda

Sandra Tédde Santaella

Química e Mestre em Química pela UFScar. Doutora em Engenharia Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Professora-Associada da UFC

Resumo

Processos convencionais de tratamento de efluentes utilizam microrganismos vivos, o que sugere limitações relativas à toxicidade de metais para os microrganismos. O experimento consistiu em adicionar soluções mono elementares de Cr (VI) e Zn(II) em diferentes concentrações (0, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.L⁻¹) ao meio de crescimento e observar a influência dos metais no crescimento micelial e germinativo do fungo *Aspergillus Níger* por verificação visual da expansão radial do micélio e da germinação de esporos, seguida de registro fotográfico. Os resultados mostraram que o metabolismo do fungo foi completamente inibido em concentrações acima de 500 mg Zn (II).L⁻¹ e 150 mg Cr (VI).L⁻¹. O ED₅₀ (concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do fungo) para os dois íons metálicos, nas condições estudadas, está na faixa entre 100 e 150 mg.L⁻¹.

Palavras-chave: metais pesados; inibição; crescimento micelial; *Aspergillus niger*; ED₅₀.

Abstract

Many standard processes of wastewater treatment use live microorganisms, which suggests limitations on a metal toxicity to the microorganism. The experiment consisted in adding mono elementary solutions of Cr (VI) and Zn (II) at different concentrations (0, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.L⁻¹) to the growth mean, and to observe the influence of metals on mycelial and germinative growth of the *Aspergillus niger* fungus, by means of visual observation of the radial expansion of the mycelium and the germination of spores, followed by photograph registration. The results showed that the metabolism of the fungus was completely inhibited at concentrations above 500 mg Zn (II).L⁻¹ and 150 mg Cr (VI).L⁻¹. The ED₅₀ (concentration of active ingredient capable of inhibiting 50% of mycelial growth of the fungus) for both metal ions, under the studied conditions, is in the range between 100 and 150 mg.L⁻¹.

Keywords: heavy metals; inhibition; mycelial growth; *Aspergillus niger*; ED₅₀.

Endereço para correspondência: Maria do Socorro Vale – Instituto de Ciências do Mar – Avenida da Abolição, 3.207 – CEP: 60165-081 – Meireles – Fortaleza (CE), Brasil – Tel: (85) 3366-7031 – Fax: (85) 3366-7002 – E-mail: svaleufc@gmail.com

Recebido: 01/02/10 – **Aceito:** 02/05/11 – **Reg. ABES:** 020 10

Introdução

Nas últimas décadas, o aumento populacional e o consequente incremento das atividades industriais contribuíram para o agravamento dos problemas ambientais (LUCAS *et al.*, 2007). Neste aspecto, o lançamento de águas residuárias industriais que contêm metais pesados afeta diretamente ambientes aquáticos de corpos receptores, tornando-se uma ameaça para os seres vivos (GADD, 1992; DURUIBE *et al.*, 2007).

Metais pesados e alguns semimetais são elementos químicos que possuem densidade superior a 5 g.cm^{-3} (TOES *et al.*, 2004; MALIK, 2004). Geralmente são tóxicos aos organismos vivos, mesmo em baixas concentrações, como por exemplo, $0,01 \text{ mg(Pb).L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg(Cr).L}^{-1}$ em águas doces (CONAMA, 357), sendo considerados poluentes. Os metais podem ser encontrados na água por meio de processos naturais, como o intemperismo de rochas ou o resultado de atividades antropogênicas, tais como a mineração, metalurgia, esgotos, resíduos sólidos e uso de combustíveis (PATINO *et al.*, 2003). Alguns elementos como cromo, cádmio, chumbo e mercúrio (LACERDA; MALM, 2008) ocasionam sérios transtornos à saúde humana quando ingeridos em doses inadequadas (ANSARI; MARR; TARIQ, 2004).

Uma vez lançados no ambiente, os metais pesados sofrem transformações químicas que podem resultar em espécies químicas muito mais tóxicas do que os íons isolados, como ocorre com cromo, arsênio e mercúrio, cujas toxicidades dependem da forma química e do estado de oxidação (LEITE, 2002).

O interesse da utilização de processos biológicos para remoção de metais pesados tem aumentado principalmente por ser um tratamento eficiente, de baixo gasto de energia e que não utiliza produtos químicos para tratar efluentes (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Reatores biológicos são mais compactos que os tratamentos convencionais (por exemplo, lagoas de estabilização) e a grande concentração de biomassa leva a uma maior taxa de remoção de poluentes (SANTOS, 2007).

Os microrganismos são usados nos processos de biotransformação ou de bioadsorção para transformar ou adsorver metais. Nestes processos, as células microbianas vivas ou mortas e os produtos do seu metabolismo podem ser bioacumuladores eficientes (KOVACEVIC *et al.*, 2000). A biomassa fúngica possui porcentagem de material de parede celular relativamente alta e este material é excelente ligante de metais (SRIVASTAVA *et al.*, 2007).

Algumas espécies de fungos, tais como *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus niger*, possuem capacidade de remover poluentes orgânicos recalcitrantes, por exemplo, o fenol (FONTOULAKIS *et al.*, 2002; HAI *et al.*, 2006; SANTAELLA *et al.*, 2009; PASSOS *et al.*, 2009) e os metais (YUN-GUO *et al.*, 2006), por meio de atividades metabólicas, pela produção de enzimas e propriedades de adsorção. *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma*

viride, *Trichoderma atroviride* têm sido usados para remoção de metais em despejos sintéticos (YIN *et al.*, 1998; PORCEL, *et al.*, 2005; ERRASQUIN; VÁZQUEZ, 2003; MUKHOPADHYAY, *et al.*, 2007).

Os fungos possuem propriedades que influenciam a diminuição da toxicidade de metais, incluindo a formação da ligação metal-proteína, precipitações orgânicas e inorgânicas, transporte ativo, compartimentação intracelular, enquanto que os constituintes da parede celular do fungo, como a quitina, possuem capacidade de adsorver metais (GADD *et al.*, 2001).

Alguns metais são essenciais para o metabolismo dos fungos, no entanto, são tóxicos quando presentes em excesso (BALDRIAN, 2003). Os metais essenciais ao metabolismo dos fungos incluem cobre, ferro, manganês, molibdênio, zinco e níquel (GADD, 1993), e são identificados como tóxicos em concentrações poucas vezes superiores às requeridas para o metabolismo (HUHES *et al.*, 1991). Os níveis de toxicidade de cada metal variam de acordo com a espécie de microrganismo, especiação do metal e pH (VALIX; LOON, 2003).

Metais tóxicos podem inibir o crescimento de fungos, além de causar mudanças morfológicas e fisiológicas e afetar a reprodução. Esses também reduzem o número, a diversidade e selecionam populações microbianas resistentes ou tolerantes (EZZOUHRI *et al.*, 2009).

O cromo é um metal pesado que ocorre naturalmente em rochas, plantas, solos e poeira vulcânica (EZZOUHRI *et al.*, 2009), é altamente reativo e origina uma variedade de compostos tóxicos. O grau de toxicidade do cromo varia com o estado de oxidação (GUPTA; BABU, 2009), e as duas formas de cromo predominantes no meio ambiente são: Cr (III) e Cr (VI), sendo que o Cr (VI) é solúvel, tóxico e carcinogênico (ACKERLEY *et al.*, 2004). O Cr (III) é um íon essencial para o desenvolvimento humano e animal, é mais estável que o Cr (VI), a oxidação a Cr (VI) é favorecida em pH menor que 5, o que torna preocupante a presença deste íon em efluentes (MICHALAK *et al.*, 2007). A maior toxicidade do Cr (VI) se deve às elevadas solubilidades e mobilidades em água (DONG *et al.*, 2009).

O zinco é um metal encontrado em águas residuárias industriais, principalmente de atividades de mineração e de galvanoplastia (KING *et al.*, 2008). Dependendo da concentração, este metal pode limitar o crescimento de fungos filamentosos e ser tóxico para alguns microrganismos, como fungos, bactérias e microalgas (ARUNAKUMARA; XUECHENG, 2008; VALIX; LOON, 2003; HEINLAAN *et al.*, 2008).

Há vários mecanismos de resistência utilizados pelos microrganismos como defesa em resposta direta ao contato com os metais, entre eles podem ser citados: precipitação extracelular, complexação e cristalização e transformação de metais (WHITE; SAYER; GADD, 1997), além de bioadsorção na parede celular, diminuição do transporte, compartimentação intracelular, impermeabilidade, sistema de extrusão de substâncias tóxicas e imobilização (BRUINS; KAPIL; OEHME, 1999; ZAFAR; AQIL; AHMAB, 2007).

A presença de metais pesados nas águas residuárias pode reduzir intensamente a atividade microbiana no tratamento biológico, pois

causa efeitos tóxicos à biota do tratamento, uma vez que dentro das células os íons metálicos podem se ligar a proteínas, deslocando alguns íons de suas posições habituais e prejudicando as suas funções metabólicas (CHIPASA, 2003; GADD, 1992). Devido à crescente utilização do tratamento biológico de águas residuárias (CHAALAL; ZEKRI; ISLAM, 2005), torna-se notória a necessidade do estudo da toxicidade de metais sobre a diversidade microbiana do sistema de tratamento.

Muitos íons metálicos têm influência direta sobre os processos fisiológicos e bioquímicos de microrganismos. Como o crescimento do microrganismo reflete o metabolismo celular, este tem sido usado como um indicador-chave da toxicidade de metais pesados para microrganismos (URUNAKUMARA; XUECHENG, 2008).

Este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade de Cr(VI) e Zn(II) pela avaliação do crescimento de *Aspergillus niger* isolado de um efluente de indústria petroquímica.

Materiais e métodos

Fungo

O fungo filamentosos, *Aspergillus niger*, foi isolado de uma água residuária que contém óleo, compostos nitrogenados e metais pesados (WAKE, 2005), proveniente da LUBNOR (Lubrificantes e Derivados de Petróleo do Nordeste), uma refinaria de petróleo da Petrobrás e identificado no Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA – Agroindústria Tropical, de acordo com as chaves taxonômicas clássicas (KLICH, 2002).

O isolamento do fungo (TUIITE, 1971) consistiu retirar o micélio fúngico diretamente do efluente com o auxílio de uma alça de platina flameada, e transferi-lo para placas de Petri contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de 100 mg de sulfato de estreptomicina/litro de meio, a fim reduzir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em uma sala com temperaturas variando de 25 a 32°C, com 12 horas de escuro e 12 horas de iluminação. Decorridos 7 dias após o isolamento, os fungos foram identificados com base em suas características morfológicas.

Teste de toxicidade em placa

A tolerância do *Aspergillus niger* aos metais Cr(VI) e Zn(II) foi avaliada por estudos de toxicidade para cada metal separadamente. Este teste foi dividido em duas etapas: efeito da concentração dos metais na germinação dos fungos e no crescimento micelial.

Solução estoque

A solução padrão-estoque 1.000 mg.L⁻¹ de íons de Cr(VI) foi preparada dissolvendo-se 2,830 g de K₂Cr₂O₇ (dinâmica), previamente seco à temperatura de 140°C, em 1 L de água destilada.

A solução padrão-estoque de Zn(II) foi preparada dissolvendo-se 4,550 g de Zn(NO₃)₂.6H₂O (Vetec) em 1 L de água destilada. A partir das soluções padrão-estoque, foram preparadas as soluções de trabalho (20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 mg.L⁻¹ de Zn(II) e de Cr(VI) utilizadas nos experimentos.

Efeito da concentração dos metais Cr(VI) e Zn(II) na germinação de *Aspergillus niger*

Preparou-se meio de cultura agar sabouraud dextrose (*Acumedia manufacturers*), 65 g.L⁻¹ para cada metal, e este foi distribuído em placas de petri estéreis, juntamente com alíquotas de 0,50; 1,25; 2,50; 3,75; 6,25; 7,50; 10,00; 12,50 mL da solução-estoque do metal de interesse, de modo que as concentrações deste nas placas fossem de 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 mg.L⁻¹, respectivamente. Após a solidificação do meio de cultura com a solução de metal, as placas foram inoculadas com 2,6 x 10⁶ esporos.mL⁻¹ – que é a concentração ótima utilizada em reatores biológicos de escala laboratorial (RODRIGUES, 2010) –, incubadas a 30 ± 2°C e observadas por 144 horas. O controle consistiu de placa com concentração 0 mg.L⁻¹ de solução de metal. O teste foi feito em triplicata, totalizando 27 placas para cada metal.

Nesta etapa, foi observada a concentração máxima de metal em que houve crescimento do fungo por verificação visual da expansão radial e da germinação de esporos, seguido de registro fotográfico.

Efeito da toxicidade de metais Cr(VI) e Zn(II) no crescimento micelial de *Aspergillus niger*

Placas de petri contendo meio de cultura agar sabouraud dextrose (*Acumedia*) foram inoculadas com 2,6 x 10⁶ esporos de *Aspergillus niger* e incubadas em estufa bacteriológica, a 30 ± 2°C por 72 horas. Após esse período, foram retirados discos de 4 mm de diâmetro do micélio desenvolvido nas placas, com auxílio de um vazador, para posterior inoculação (MENTEN *et al.*, 1976). Novas placas foram preparadas com o mesmo meio de cultura e alíquotas (0,5; 1,25; 2,50; 3,75; 6,25; 7,50; 10,00; 12,50 mL) da solução-estoque de metal de interesse para obtenção de concentrações de 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 mg.L⁻¹, respectivamente. O controle do experimento foi feito em placa sem solução de metal. Para cada metal, foram preparadas 27 placas, três para cada concentração.

No centro de cada placa, foi colocado um disco de micélio com os esporos voltados para baixo e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 ± 2°C, durante 144 horas, tempo em que a placa controle foi totalmente preenchida. O crescimento radial foi obtido a partir da medida do diâmetro médio do micélio do fungo a cada 24 horas. A inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela Equação 1, descrita por Edgington, Khew e Barron (1971) e modificada por Menten *et al.* (1976).

$$\%PIC = \frac{CRTE - CRT}{CRTE} \times 100$$

Equação 1

Onde,

PIC: inibição do crescimento micelial;

CRTE: crescimento radial do controle (cm);

CRT: crescimento radial do tratamento (cm).

Verificou-se a concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do fungo (ED_{50}) com base nos resultados PIC, ou seja, a faixa na qual o valor de PIC corresponde à taxa de inibição de 50%. A taxa de crescimento micelial do fungo em horas para faixa de ED_{50} foi calculada, dividindo-se o crescimento micelial médio (cm) pelo tempo total do experimento (144 horas). Os dados de PIC foram avaliados estatisticamente pelo Teste de Tukey.

Resultados

Efeito da concentração de Zn(II) na germinação de *Aspergillus niger* em placas

Na Figura 1 são mostradas as placas inoculadas com *Aspergillus niger*, sem solução dos metais, após 24 e 144 horas, que foram usadas como “branco” do experimento.

Na Figura 2 são mostradas as placas, contendo adição de solução de Zn(II) ao meio de cultura, inoculadas com esporos do fungo, após 144 horas de incubação.

Não houve inibição na germinação de esporos do fungo pelo metal em concentrações de 20 e 50 mg Zn(II).L⁻¹ no período de 24 horas. Ao contrário, notou-se maior intensidade na germinação dos esporos em comparação com a placa de controle para as mesmas condições, ocorrendo crescimento das hifas e, conseqüentemente, formação de micélio. Como zinco é um elemento essencial para o metabolismo do fungo (BABICH; STOTZKY, 1978; ANSARI; MARR; TARIQ, 2004; GADD et al., 2001; JI; SILVER, 1995), este deve ter sido usado para atividades de germinação, o que pode ter favorecido maior desenvolvimento dos esporos na fase inicial da germinação. Entretanto, no decorrer do experimento, foi observado que a germinação tornou-se lenta, como conseqüência da inibição na fase de esporulação, porém sem interromper completamente o desenvolvimento. Gadd et al. (2001) também observaram diminuição no desenvolvimento dos fungos de *Trichoderma viride* e *Rizhopus arrhizus* em presença de zinco e outros metais.

O aumento da concentração de zinco causou inibição a partir de 100 mg.L⁻¹, com completa inibição a partir de 200 mg.L⁻¹, ou seja, ausência de crescimento.

O zinco ajuda a manter a integridade de ribossomos, membranas biológicas e também é requerido para o crescimento de microrganismos, contudo, concentrações elevadas deste metal podem ser inibitórias ou tóxicas para as atividades celulares e de crescimento,

causando inibição da respiração e da germinação dos esporos (BABICH; STORTZKY, 1978). Neste trabalho, observou-se inibição na germinação e no crescimento do fungo em concentrações superiores a 100 mg Zn(II).L⁻¹.

Efeito da concentração de Cr(VI) na germinação de *Aspergillus niger* em placas

Na Figura 3 são mostradas as placas inoculadas com esporos de fungo, contendo solução de Cr(VI) após 144 horas de incubação.

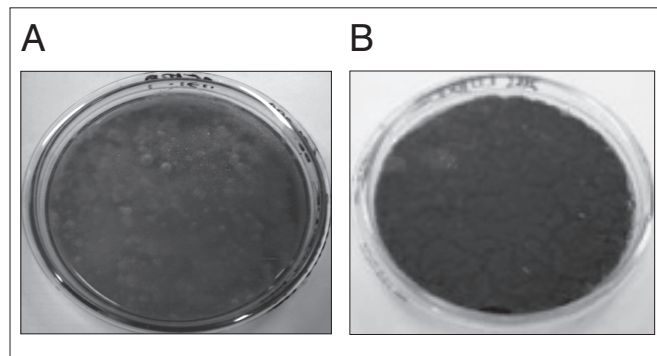


Figura 1 – Placa de controle do experimento: Placas sem solução de metais, inoculadas com esporos de *Aspergillus niger* após 24 horas (A) e após 144 horas (B).

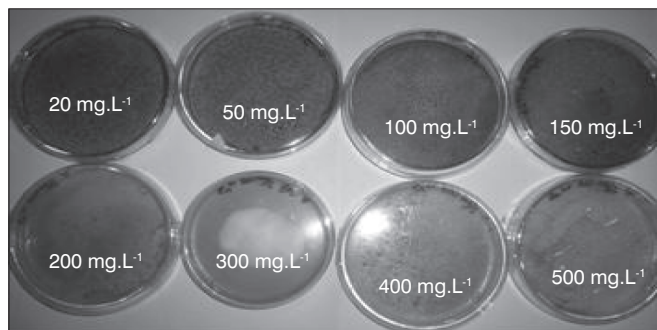


Figura 2 – Placas inoculadas com esporos de *Aspergillus niger*, contendo concentrações de 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 mg Zn(II).L⁻¹ no meio de crescimento, após 144 horas de incubação.

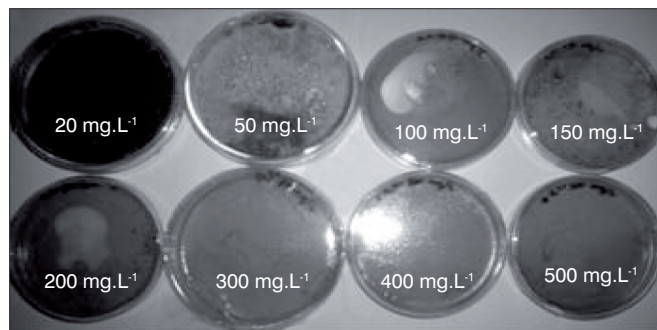


Figura 3 – Placas contendo concentrações de 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 Cr(VI) mg.L⁻¹, no meio de crescimento, após 144 horas de incubação.

Para a concentração de 20 mg Cr(VI).L⁻¹, não foi observada inibição da germinação de esporos do fungo, ou seja, com 24 horas de incubação a placa contendo 20 mg.L⁻¹ de Cr(IV) apresentou crescimento dos esporos semelhante à placa de controle. Após 144 horas de experimento, observou-se esporulação compatível com o controle para as mesmas condições.

Nas placas contendo 50 mg Cr(VI).L⁻¹, observou-se inibição acentuada na fase germinativa do fungo. Entretanto, houve pequeno desenvolvimento entre 96 e 144 horas, não chegando, porém, à completa esporulação, isso indica que se o tempo de contato fosse maior do que 144 horas, possivelmente haveria adaptação do fungo à concentração de metal, entretanto encerrou-se o experimento devido à contaminação nas placas.

Para as concentrações superiores a 100 mg Cr(VI).L⁻¹, não foi observado desenvolvimento do fungo com 144 horas de experimento.

De acordo com os resultados, o Cr(VI) foi mais tóxico ao fungo que o Zn(II), apresentando maior capacidade de inibição na fase germinativa, pois tal inibição ocorreu em concentrações menores quando comparado com o Zn(II). O fato também foi observado por Ezzouhri *et al.* (2009) quando testaram a tolerância de fungos filamentosos do gênero *Alternaria* aos metais Zn, Cr, Cu e Cd. As diferentes capacidades de resistir à toxicidade por metais diversos deve ser devido à presença e diferentes processos de tolerância ou mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos (EZZOUHRI *et al.*, 2009).

Efeito da toxicidade de metais Zn(II) e Cr(VI) no crescimento micelial de *Aspergillus niger*

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, não houve inibição no crescimento do fungo em concentrações menores que 50 mg Zn(II).L⁻¹ e 50 mg Cr(VI).L⁻¹, acima desta, foi observado aumento progressivo da inibição do crescimento micelial do fungo com o aumento da concentração dos metais.

Tabela 1 – Efeito da dosagem de metais na percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do *Aspergillus niger*, em 144 horas de crescimento

Concentração (mg.L ⁻¹)	PIC (%)	
	Zn(II)	Cr(VI)
0	0,00	0,00
20	0,00	0,00
50	0,00	0,00
100	29,38	11,00
150	59,13	100,00
200	72,88	100,00
300	77,88	100,00
400	86,25	100,00
500	100,00	100,00

Pelo teste de Tukey as médias não diferem significativamente ($p < 0,05$).

O Zn (II) inibiu totalmente o crescimento micelial do *Aspergillus niger* em concentração de 500 mg.L⁻¹, e o Cr(VI) em concentração acima de 150 mg.L⁻¹ (Tabela 1), verificando-se assim que o fungo é bem mais tolerante ao Zn(II) do que ao Cr(VI). Ezzouhri *et al.* (2009) estudaram a influência de metais no crescimento micelial de fungos, e constataram que uma linhagem de *Aspergillus niger* isolada de solo contaminado com metais pesados tolerou maior concentração de Cr(VI) (480 mg Cr(VI).L⁻¹), do que a registrada neste trabalho. Comparando os resultados obtidos neste trabalho com aqueles obtidos por Ezzouhri *et al.* (2009), pode-se observar que em microrganismos de mesma espécie, devido à capacidade adaptativa dos fungos, as diferentes linhagens, isoladas de ambientes diferentes, apresentam capacidades de resistência e adaptação diferentes quando expostas ao mesmo metal.

O ED₅₀ para os dois metais está na faixa de concentração entre 100 e 150 mg.L⁻¹, pois entre as concentrações de 100 e 150 mg.L⁻¹, observou-se 50% de inibição do crescimento micelial, identificado pelos valores de PIC (Tabela 1), para os metais estudados.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de crescimento micelial médio em cm e a taxa de crescimento em cm.h⁻¹. A taxa de crescimento do fungo no controle foi de 0,05 cm.h⁻¹. Portanto, a taxa que corresponde ao ED₅₀ é 50% do valor da taxa de crescimento no controle, ou seja, 0,025 cm.h⁻¹. Com este valor e com os dados da Tabela 2, chegou-se à faixa de concentração entre 100 e 150 mg.L⁻¹ para os dois metais, o que corrobora os valores da Tabela 1.

A partir da análise dos dados expostos na Tabela 2, confirma-se que o fungo apresentou maior tolerância ao Zn(II) do que ao Cr(VI), em condições controladas, pois houve maior crescimento do fungo na presença de maiores concentrações de Zn(II) do que de Cr(VI), ratificando a menor toxicidade de zinco para o fungo, já que este é um elemento essencial (DURUIBE; OGWUEGBU; EGWURUGWU, 2007), menos tóxico aos seres humanos que o cromo (NIES, 1999; BRUINS; KAPIL; OCHME, 1999).

Tabela 2 – Crescimento médio do micélio de *Aspergillus niger* e taxa de crescimento em cm.h⁻¹ nas concentrações de 0 a 500 mg.L⁻¹, de Cr(VI) e de Zn(II), em 144 horas de experimento

Concentração (mg.L ⁻¹)	Crescimento médio (cm)		Taxa de crescimento (cm.h ⁻¹)	
	Zn(II)	Cr(VI)	Zn(II)	Cr(II)
0	8,00	8,00	0,05	0,05
20	8,00	8,00	0,05	0,05
50	8,00	8,00	0,05	0,05
100	5,65	7,12	0,03	0,04
150	3,27	0,00	0,02	0,00
200	2,17	0,00	0,01	0,00
300	1,77	0,00	0,01	0,00
400	1,10	0,00	0,007	0,00
500	0,00	0,00	0,00	0,00

A partir de 100 mg.L⁻¹, observou-se o início da inibição no crescimento micelial do fungo, tanto para Zn(II) quanto para Cr(VI), o que reflete em menor taxa de crescimento micelial na presença de ambos metais (Tabela 2).

A presença de metais pode alterar também a coloração típica do fungo (EZZOUHRI *et al.*, 2009). No caso da Linhagem de *Aspergillus niger* estudada, foi observado um clareamento da pigmentação do micélio, tanto na presença de Zn(II) como na de Cr(VI). Tais mudanças são comuns em espécies fúngicas.

Em presença de 300 mg Zn(II).L⁻¹, houve inibição do crescimento micelial em 77,80% em relação ao controle (Tabela 2). Em seus experimentos, Babich e Stotzky (1978), adicionaram 300 mg Zn(II).L⁻¹ ao meio de crescimento e observaram redução de aproximadamente 50% no crescimento micelial do controle (sem zinco), de *Fusarium solani*, *Cunninghamella echinulata*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*. Comparando com a linhagem de *Aspergillus niger* estudada neste trabalho observou-se que a mesma foi menos tolerante ao Zn(II) que a linhagem estudada por Babich e Stotzky (1978). Esta tolerância pode ser consequência do requerimento deste metal como micronutriente essencial ao metabolismo de fungos e também na participação da síntese de enzimas.

Também foram observadas diferentes taxas de crescimento do fungo em presença de Zn(II) e Cr(VI), indicando que a tolerância do fungo aos metais depende do tipo e concentração de metal e da sua capacidade de adaptação, fato que corrobora com o estudo de Zafar, Aqil e Ahmad (2007), no qual os autores verificaram que a variação na tolerância deve-se a um ou mais tipos de mecanismos de resistência, os quais podem ser produção de enzimas, como a redutase (SRIVASTAVA; THAKUR, 2006a); imobilização de metais por formação de complexo, como os quelatos; bioacumulação ou biossorção; entre outros (AHMAD *et al.*, 2005; GUIBAL *et al.*, 1992). Desse modo, não foi possível identificar o mecanismo de resistência atuante devido à falta de estudos genéticos e moleculares para os fenômenos de tolerância e detoxificação de metais, apresentados por microrganismos. Segundo Srivastava e Thakur (2006b) e Ezzouhri *et al.* (2009), a detoxificação de Cr(VI) por *Aspergillus niger* é mediada por enzimas antioxidantes, tais como as peroxidases, a catalase e o ascorbato peroxidase.

Pela análise do teste de crescimento micelial do fungo na presença dos metais, observou-se maior concentração, com crescimento micelial de 400 mg.L⁻¹ tanto para o Cr(VI) quanto para o Zn(II). Esse crescimento foi gradativamente inibido com aumento da concentração de 0 para 400 mg.L⁻¹ para os dois metais estudados. Entretanto, a inibição foi mais acentuada para o Cr(VI).

Como os esporos são estruturas muito resistentes, espera-se que a fase vegetativa, aquela na qual o micélio já está formado, como no caso dos discos de micélio, seja bastante resistente às condições adversas. Se comparado com o mesmo teste para fase germinativa, observou-se que o fungo *Aspergillus niger*, na fase

vegetativa, apresentou maior tolerância aos metais, o que significa que, apesar da inibição ser menor na fase vegetativa, o crescimento do fungo não é impedido pela presença destes metais na fase germinativa.

A linhagem de fungo *Aspergillus niger* estudada apresentou níveis de tolerância diferentes para Zn(II) e Cr(VI) e seu uso, para tratamento de efluentes poluídos com metais, deve ser objeto de estudos posteriores.

Discussão

Como zinco é um elemento essencial para o metabolismo do fungo (BABICH; STOTZKY, 1978; ANSARI; MARR; TARIQ, 2004; GADD *et al.*, 2001; JI; SILVER, 1995), este metal deve ter sido usado para atividades de germinação, o que pode ter favorecido maior desenvolvimento dos esporos na fase inicial da germinação. Entretanto, no decorrer do experimento, foi observado que a germinação tornou-se lenta, como consequência da inibição na fase de esporulação, porém sem interromper completamente o desenvolvimento. Gadd *et al.* (2001) também observaram diminuição no desenvolvimento dos fungos de *Trichoderma viride* e *Rizhopus arrhizus* em presença de zinco e outros metais.

O zinco ajuda a manter integridade de ribossomos, membranas biológicas e também é requerido para o crescimento de microrganismos; contudo, concentrações elevadas desse metal podem ser inibitórias ou tóxicas para as atividades celulares e de crescimento, causar inibição da respiração e da germinação dos esporos (BABICH; STORTZKY, 1978).

A presença de metais pode alterar também a coloração típica do fungo (EZZOUHRI *et al.*, 2009). No caso da linhagem de *Aspergillus niger* estudada, foi observado um clareamento da pigmentação do micélio, tanto em presença de Zn(II) como em presença de Cr(VI). Tais mudanças são comuns em espécies fúngicas.

Foram observadas diferentes taxas de crescimento do fungo em presença de Zn(II) e Cr(VI), indicando que a tolerância do fungo aos metais depende do tipo e concentração de metal, e da sua capacidade de adaptação, fato que corrobora o estudo de Zafar, Aqil e Ahmad (2007), no qual os autores verificaram que a variação na tolerância deve-se a um ou mais tipos de mecanismos de resistência. Tais mecanismos podem ser produção de enzimas, como a redutase (SRIVASTAVA; THAKUR, 2006a), imobilização de metais por formação de complexo, como os quelatos, bioacumulação ou biossorção, entre outros (AHMAD *et al.*, 2005; GUIBAL *et al.*, 1992), não sendo possível identificar o mecanismo de resistência atuante devido à falta de estudos genéticos e moleculares para os fenômenos de tolerância e detoxificação de metais, apresentados por microrganismos. Segundo Srivastava e Thakur (2006b) e Ezzouhri *et al.*, (2009), a detoxificação de Cr(VI) por

Aspergillus niger é mediada por enzimas antioxidantes, tais como as peroxidases, catalase e ascorbato peroxidase.

Conclusões

A linhagem de *Aspergillus niger* estudada foi mais resistente ao Zn(II) do que ao Cr(VI). O fungo foi completamente inibido em concentrações acima de 500 mg Zn(II).L⁻¹ e 150 mg Cr(VI).L⁻¹. O ED₅₀ para os dois íons metálicos, nas condições estudadas, está na faixa entre 100 e 150 mg.L⁻¹. O fungo apresentou maior resistência aos metais estudados, Zn(II) e Cr(VI), na fase vegetativa do que na germinativa.

O *Aspergillus niger* é um microrganismo potencialmente aplicável para remoção de metais pesados de ambientes contaminados, tendo em vista que se mostrou tolerante a metais. Porém, estudos mais aprofundados são necessários.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) – Edital universal processo. 470628/2006-5 e a Lubnor.

Referências

- ACKERLEY, D.F. *et al.* Chromate reducing properties of soluble Xavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*, *Applied and environmental microbiology*, v. 70, p. 873-882, 2004.
- AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHAMAD, F. Heavy metal biosorption potencial os *Aspergillus* and *Rizopus* sp. Isolated from wastewater treated soil, *Journal of applied Sciences and Environmental Management*, v.9, n.1, p.123-126, 2005.
- ANSARI, T. M.; MARR, I. L.; TARIQ, N. Heavy metals in marine pollution perspective: a mini review. *Journal of Applied Sciences*, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2004.
- ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; XUECHENG, Z. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae, *Journal of ocean university of china*, v. 7, p. 60-64, 2008.
- BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-hot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, 78-91, 2003.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Toxicity of zinc to fungi, bacteria and coliphages: Influence of chloride ions, *Applied and environmental microbiology*, v.36, p. 906-914, 1978.
- BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 45, p. 198-207, 1999.
- CHAALAL, O.; ZEKRI, A. Y.; ISLAM, R. Uptake of Heavy Metals by Microorganisms: An Experimental Approach, *Energy Sources*, v. 27, p. 87-100, 2005.
- CHIPASA, K. B. Accumulation and fate of selected heavy metals in a biological wastewater treatment system, *Waste Management*, v. 23, p. 135-143, 2003.
- DONG, D.; ZHAO, X.; HUA, X.; LIU, J.; GAO, M. Investigation of the potential mobility of Pb, Cd and Cr(VI) from moderately contaminated farmland soil to Groundwater in Northeast, *China*, v. 162, p. 1261-1268, 2009.
- DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Science*, v. 2, n.5, p. 112-118, 2007.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds, *Phytopathology*, v. 61, p. 42-44, 1971.
- ERRASQUÍN, E. L.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge, *Chemosphere*, v. 50, p. 137-143, 2003.
- EZZOUHRI, L. *et al.* Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco, *African journal of microbiology research*, v. 3, n. 2, p. 35-48, 2009.
- FOUNTOULAKIS, M.S.; DOKIANAKIS, S.N.; KORNAROS, M.E.; AGGELIS G.G.; LYBERATOS, G. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Water Research*, v. 36, pp. 4735-4744, 2002.
- GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals, *News Phytology*, v. 124, p. 25-60, 1993.
- _____. Metals and microorganisms: A problem of definition, *FEMS Microbiology Letters*, v. 100, p. 197-204, 1992.
- GADD, G. M.; RAMSAY, L.; JOHN, W. C.; 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.

- GUIBAL, E.; ROULPH, C.; LECLOUREC, P. Uranium biosorption by the filamentous fungus *Mucor miehei*, pH effect on mechanisms and performance of uptake, *Water Resource*, v. 26, n. 8, p. 1139, 1992.
- HAI, F. I.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K. Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater treatment, *Desalination*, v. 192, p. 315-322, 2006.
- HEINLAAN, M.; IVASK, A.; BLINOVA, I.; DUBOURGUIER, H. KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, *Chemosphere*, v. 71, p. 1308-1316, 2008.
- HUHES, M. N.; POOLE, R. K. Metal speciation and microbial growth- the hard (and soft) facts, *Journal of General Microbiology*, v. 137, p. 725-734, 1991.
- JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern, *Journal of Industrial Microbiology*, v. 14, p. 2707-2708, 1995.
- KING, P.; RAKESH, N.; LAHARIA, S. B.; KUMARB, Y. P.; PRASAD, V.S.R.K. Biosorption of zinc onto *Syzygium cumini* L.: Equilibrium and kinetic studies, *Chemical Engineering Journal*, v. 144, p. 181-187, 2008.
- KOVACEVIC, F.Z.; SIPOS, L.; BRISKI, F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions, *Food Technology and Biotechnology*, v. 38, n. 3, 211-216, 2000.
- LACERDA, L. M.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas, *Estudos avançados*, v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.
- LEITE, M. A. *Análise do aporte, da taxa de sedimentação e da concentração de metais na água, plâncton e sedimento do reservatório de Salto Grande, Americana-SP*. 2002. Tese (Doutorado) – Ciências da Engenharia Ambiental da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- LUCAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; VILLASEÑOR, J.; FERNÁNDEZ, F.J. Fermentation of agro-food wastewaters by activated sludge, *Water Research*, v. 41, p. 1635-1644, 2007.
- MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells, *Environment International*, v. 30, p. 261-278, 2004.
- MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de Alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (TASS.) GOID. "In vitro", *Fitopatologia Brasileira*, v.1, n.2, p. 57-66, 1976.
- MICHALAK, I.; ZIEKINSKA, A.; CHOJNACKA, K.; MATULA, J. *Biosorption of Cr(II) by microalgae: equilibrium of the process*. *American Journal of agricultural and biological sciences*, v. 2, n.4, p. 284-290, 2007.
- MUKHOPADHYAY, M.; NORONHA, S. B.; SURAISHKUMAR, G. K. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1781-1787, 2007.
- PASSOS, C. T.; BURKET, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma linhagem de *Aspergillus niger* SP. Isolada de um solo contaminado do sul do Brasil, *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.
- PATINO, L. C.; VELBEL, M. A.; PRICE, J. R.; WADE, J. A. Trace element mobility during spheroidal weathering of basalts and andesites in Hawaii and Guatemala, *Chemical Geology*, v. 202, p. 343-364, 2003.
- PORCEL, E. M. R.; LOPEZ, J. L.; PEREZ, J. A. S.; SEVILLA, J. M. F.; CHISTI, Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*, *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, p. 139-144, 2005.
- SANTAELLA, S.T. *et al*. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*, *Engenharia Sanitária Ambiental*, v.14, n.1, p. 139-148, 2009.
- SANTOS, A. B. *Avaliação técnica de sistemas de tratamento de esgotos*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 205 p.
- SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Evaluation of bioremediation and detoxification potential of *Aspergillus niger* for removal hexavalent chromium in soil microcosm, *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 1904-1911, 2006a.
- _____. *Biosorption potency of Aspergillus niger for removal of chromium (VI)*. *Current Microbiology*, v.53, p. 232-237, 2006b.
- SRIVASTAVA, S.; AHMAD, A. H.; THAKUR, I. S. Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery e Zuentes, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1128-1132, 2007.
- URUNAKUMARA, K. K. I. U.; XUECHENG, Z. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae, *Journal of Ocean University of China*, v. 7, n. 1, p. 60-64, 2008.
- VALIX, M.; LOON, L. O. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals, *Minerals Engineering*, v. 16, p. 193-198, 2003.
- VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal biosorption: a review, *Hydrometallurgy*, v.44, p.301-316, 1997.
- WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination, *FEMS microbiology reviews*, v. 20, p. 503-516, 1997.
- YIN, P.; YU, Q.; JIN, B.; LING, Z. Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch wastewater, *Water Resource*, v. 33, p. 1960-1963, 1998.
- YUN-GUO, L. *et al*. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solutions by living *Aspergillus niger*, *Transactions of Nonferrous Metals Society*, v.16, p.681-686, 2006.
- ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAB, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2557-2561, 2007.