



Universidade
Estadual de Goiás

Universidade Estadual de Goiás

Campus Central Sede: Anápolis

Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado

ESTER VIEIRA GONÇALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE CÉLULAS FÚNGICAS IMOBILIZADAS EM
ESPUMAS COMERCIAIS DE POLIURETANO NA REMOÇÃO DE
FÓSFORO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS**

Anápolis

2022

ESTER VIEIRA GONÇALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE CÉLULAS FÚNGICAS IMOBILIZADAS EM
ESPUMAS COMERCIAIS DE POLIURETANO NA REMOÇÃO DE
FÓSFORO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Recursos Naturais do Cerrado, da
Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de
Mestre em Recursos Naturais do Cerrado.

Orientadora: Profa Dra. Samantha Salomão Caramori

Coorientadora: Profa Dra. Solange Xavier dos Santos

Anápolis

2022

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Dados do autor (a)Nome Completo: Ester Vieira GonçalvesE-mail: estervieiragbio@gmail.com**Dados do trabalho**

Título: Bioprospecção de células fúngicas imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano na remoção de fósforo de efluentes domésticos

Tipo

() Tese (X) Dissertação

Curso/Programa: Recursos Naturais do Cerrado (Renac)Concorda com a liberação documento [X] SIM [] NÃO¹

Universidade Estadual de Goiás – Campus Central, 31/01/2024

Local

Data

Documento assinado digitalmente
gov.br ESTER VIEIRA GONCALVES
Data: 31/01/2024 08:43:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do autor (a)

Documento assinado digitalmente
gov.br SAMANTHA SALOMAO CARAMORI
Data: 31/01/2024 09:34:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do orientador (a)

Gonçalves, Ester Vieira

Bioprospecção de células fúngicas imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano na remoção de fósforo de efluentes domésticos / Ester Vieira Gonçalves. – 2022

X f.: figs, tabs.

Orientadora: Prof. Dr. Samantha Salomão Caramori

Coorientadora: Prof. Dr. Solange Xavier dos Santos


Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Central, 2022.

Bibliografia.

ESTER VIEIRA GONÇALVES

BIOPROSPECÇÃO DE CÉLULAS FÚNGICAS
IMOBILIZADAS EM ESPUMAS COMERCIAIS
DE POLIURETANO NA REMOÇÃO DE
FÓSFORO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos
Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás,
para a obtenção do grau de mestre(a), aprovada em 3 de março de 2022, pela
Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Prof. Dra. Samantha Salomão Caramori
Presidente da banca
Universidade Estadual de Goiás


Prof. Dra. Luciane Madureira de Almeida
Universidade Estadual de Goiás


Prof. Dra. Thâmara Machado e Silva
Faculdade Estácio de Sá de Goiás

DEDICATÓRIA

**A Deus,
a meu pai Cláudio Alberto Gonçalves
e minha mãe Kátia Sirlene Alves Vieira Gonçalves**

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Cláudio Alberto Gonçalves e minha mãe Kátia Sirlene Alves Vieira Gonçalves que me ofereceram todas as condições para que eu pudesse me dedicar aos estudos e facilitaram a realização dos meus sonhos. Agradeço pelo encorajamento, por acreditar em mim, sendo meu suporte emocional; por serem simplesmente meu alicerce, uma grande estrutura que ninguém vê, mas sem a qual eu não estaria de pé.

Ao Marcos Henrique Dias Martins, meu colega de iniciação científica, por sua colaboração em todas as etapas experimentais.

À Isabel Cristina em cada mensagem preocupada (diariamente), conselhos e ajuda incessante, ajuda nos dias difíceis, e seu posicionamento como amiga no trabalho e na vida.

À Dra. Solange Xavier dos Santos por aceitar ser minha coorientadora, disponibilizar seu laboratório – FungiLab – todos os materiais e equipamentos, pelas orientações, ensinamento e solicitação de ajuda de pessoas para também me orientar.

À Marcela Felix de Paula que possibilitou a parceria com a Saneago e Carlos Eduardo, diretor da Saneago, que nos ajudaram a definir o tema e coletas.

Ao Rodrigo da Costa Andrade pelo auxílio com imagem georreferenciada.

Ao Dr. Leonardo Luiz Borges pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao Lucas Leonardo da Silva por me ajudar em diversas etapas da minha pesquisa, ensinando com muita paciência quase todas as técnicas de microbiologia desenvolvidas nesse trabalho. À Dra. Samantha Salomão Caramori pela credibilidade, oferecendo-me muita força para sonhar. Por agregar na minha vida ensino, maturidade e crescimento profissional e pessoal juntamente com compreensão e encorajamento. Por demonstrar que eu não estava trabalhando sozinha e que problema meu era problema nosso. Considero o dia que eu a vi pela primeira vez o meu dia de sorte.

À CAPES pela bolsa de mestrado que possibilitou a realização dos experimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....;	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIACOES.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	18
REFERENCIAL TEORICO.....	19
1.1 Efeito do fósforo nos corpos hídricos.....	19
1.2 Remoção de fósforo de águas residuais – tratamento convencional.....	21
1.3 Fungos: Ferramenta biorremediativa na remoção de fósforo de águas residuais.....	21
1.4 Efluentes domésticos – caracterização e tratamento convencional.....	24
1.5 Imobilização de microrganismos em suporte de espuma de poliuretano para remoção de poluentes de águas residuais.....	25
1.6 Caracterização de fosfatases.....	26
1.7 Fins biotecnológicos das fosfatases.....	26
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 Referências.....	28
CAPÍTULO 1 REMEDIAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS POR FUNGOS: UMA ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA... ..	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
Efeito do tempo sobre o número de publicações.....	38
Poluentes e Parâmetros de Qualidade.....	39
Aplicação dos fungos em processos biorremediativos.....	42
Distribuição geográfica das pesquisas.....	42
Métodos empregados no tratamento de efluentes por fungos.....	44
Imobilização/encapsulamento de enzimas ou células fúngicas.....	45
Fotocatálise.....	45
Biofloculantes.....	46
Consórcio e microrganismos.....	46
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 2 POTENCIAL DE FUNGOS IMOBILIZADOS EM ESPUMAS COMERCIAIS DE POLIURETANO SOBRE A REMOÇÃO DE FÓSFORO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	59
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
<i>Screening</i> qualitativo da atividade fosfatase.....	52

<i>Screening</i> quantitativo da atividade fosfatase.....	54
Determinação da atividade enzimática.....	54
Imobilização de células fúngicas na espuma de poliuretano por aprisionamento e amostragem para determinação da atividade enzimática e remoção de fósforo.....	57
Planejamento fatorial.....	58
Tratamento do efluente doméstico.....	59
Coleta de efluente.....	56
Efeito do sistema imobilizado sobre a remoção de fósforo de efluentes comésticos.....	57
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	59
<i>Screening</i> qualitativo da atividade fosfatase.....	59
<i>Screening</i> quantitativo da atividade fosfatase.....	60
Imobilização de células fúngicas em espuma de poliuretano.....	64
Otimização do sistema imobilizado empregando desenho fatorial composto central rotacional (DCCR)	66
<i>Aspergillus flavus</i>	67
<i>Aspergillus niger</i>	68
<i>Talaromyces pinophilus</i>	69
<i>Trichoderma asperellum</i>	70
Otimização do processo da remoção de fósforo empregando planejamento fatorial composto central rotacional (DCCR)	71
Remoção de fósforo de efluentes domésticos.....	71
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

RESUMO

Os fungos são conhecidos por degradar uma grande variedade de materiais e compostos. Um dos objetivos deste estudo analisar o efeito do tempo sobre o número de produção científica sobre biorremediação de efluentes utilizando fungos, avaliar os tipos de poluentes biorremediativos, e os países os quais tem utilizado está abordagem. Como resultado da busca pelas palavras chaves foram identificados 3.665 artigos na base de dados Web of Science, mas 1.877 abordavam diretamente o tema. A maior parte dos artigos investigam a remoção de corantes por fungos, seguido por compostos fenólicos, demanda química de oxigênio, metais pesados e compostos farmacêuticos, respectivamente. Os países que mais apresentaram pontos de coleta foram Índia e Espanha, respectivamente. Outro objetivo deste trabalho foi selecionar isolados fúngicos com potencial para produzir fosfatases e desenvolver um produto capaz de remover fósforo de efluentes domésticos. Após triagem de 12 isolados fúngicos em testes enzimáticos quantitativos e qualitativos para produção de fosfatases, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Talaromyces pinophilus* e *Trichoderma asperellum* foram selecionados como eficientes produtores de fosfatases e candidatos a remover fósforo dos efluentes domésticos. Os isolados fúngicos foram incubados em meio mínimo de cultura contendo fosfato de potássio variando de 1g L^{-1} a 4g L^{-1} para induzir a produção de fosfatase. Espumas comerciais de poliuretano foram cortadas em $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 0.7\text{ cm}$ paralelepípedos. Então, a biomassa fúngica. foi inoculada em meio mínimo contendo 5g de paralelepípedos ($0,71\text{ mm}^3$) de espumas comerciais de poliuretano previamente autoclavadas. Os micro-organismos cresceram por 12 dias e durante esse período, os fungos aprisionados nas espumas foram monitorados pela cor característica de cada fungo, seguido pela medida de atividade de fosfatase ácida com *p*-nitrofenil fosfato. Foi construído um planejamento fatorial 3^2 para verificar a influência do tempo de imobilização (Ti) e oferta de espuma (E) sobre a produção de fosfatase pelos fungos. Posteriormente, um novo planejamento fatorial 5^2 foi construído para avaliar simultaneamente os efeitos do tempo de reação e do volume de efluente doméstico. Todos os fungos produziram fosfatase no sistema imobilizado, sendo *A. niger* por 12 dias, seguido por *T. asperellum* por 11 dias e *A. flavus* e *T. asperellum* por 7 dias. Os isolados *A. niger* e *A. flavus* apresentaram maior atividade de fosfatase ($229\text{ }\mu\text{mol/h}$), depois de 192 e 96 h, respectivamente. *T. pinophilus* e *T. asperellum* apresentaram atividade enzimática (AE) mais elevada após 72 h, com 37,7 e $78\text{ }\mu\text{mol/h}$ para *T. asperellum* *T. pinophilus*, respectivamente. O tempo de imobilização e a oferta de espuma influenciaram significativamente a produção de fosfatase. A máxima atividade de fosfatase foi obtida com 96

h de imobilização e 9 paralelepípedos de espuma para *A. flavus*; já para os fungos *T. pinophilus* e *T. asperellum* a máxima atividade de fosfatase foi obtida com 72 h de imobilização e 12 paralelepípedos de espuma; e para *A. niger* 72 h e 15 paralelepípedos de espuma. O modelo matemático planejamento composto central rotacional foi usado para verificar a otimização do tempo de imobilização e oferta de espuma. O coeficiente de determinação (R^2) sobre a influência dos fatores sobre a atividade enzimática foi de 0,938 para *A. flavus*; 0,867 para *A. niger*; 0,997 para *T. pinophilus*. e 0,955 para *T. asperellum*. O sistema imobilizado de *A. flavus*, *A. niger*, e *T. asperellum* foi capaz de remover 99,9% do fósforo em 1h10m; e de *T. pinophilus*, 99,9% do fósforo em 2 h. Todos os isolados fúngicos são biorremediadores potenciais de fósforo em efluentes domésticos.

Palavras-chave: biorremediação, fosfatase, imobilização, poluentes aquáticos.

ABSTRACT

Fungi are known to degrade a wide variety of materials and compounds. One of the objectives of this study to analyze the effect of time on the number of scientific production on bioremediation of effluents using fungi, to evaluate the types of bioremediative pollutants, and the countries that have used it is approach. As a result of the search for the key words, 3,665 articles were identified in the Web of Science database, but 1,877 directly addressed the theme. The year with the largest number of articles published was in 2020. Most articles investigate the removal of dyes by fungi, followed by phenolic compounds, chemical oxygen demand, heavy metals and pharmaceutical compounds, respectively. The countries with the most collection points were India, Spain, China, the United States, Brazil and Turkey, respectively. The countries with the most collection points were India and Spain, respectively. Another objective of this work was to select fungal isolates with potential to produce phosphatases and develop a product capable of removing phosphorus from domestic effluents. After screening of 12 fungal isolates in quantitative and qualitative enzymatic tests for phosphate production, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Talaromyces pinophilus* and *Trichoderma asperellum* were selected as efficient phosphatase producers and candidates to remove phosphorus from domestic effluents. The fungal isolates were incubated in a minimum culture medium containing potassium phosphate ranging from 1g L⁻¹ to 4g L⁻¹ to induce phosphatase production. Commercial polyurethane foams were cut into 1.0 cm x 1.0 cm x 0.7 cm cobblestones. So the fungal biomass. it was inoculated in a minimum medium containing 5g of cobblestones (0.71 mm³) of previously autoclaved commercial polyurethane foams. Microorganisms grew for 12 days and during this period, the fungi trapped in the foams were monitored by the characteristic color of each fungus, followed by the measure of acid phosphatase activity with p-nitrophenyl phosphate. A factorial planning 3² was constructed to verify the influence of immobilization time (Ti) and foam supply (E) on the production of phosphatase by fungi. Subsequently, a new factorial planning 5² was constructed to simultaneously evaluate the effects of reaction time and domestic effluent volume. All fungi produced phosphatase in the immobilized system, being *A. niger* for 12 days, followed by *T. asperellum* for 11 days and *A. flavus* and *T. asperellum* for 7 days. The isolates *A. niger* and *A. flavus* showed higher phosphatase activity (229 µmol/h), after 192 and 96 h, respectively. *T. pinophilus* and *T. asperellum* showed higher enzymatic activity (AE) after 72 h, with 37.7 and 78 µmol/h for *T. asperellum* *T. pinophilus*, respectively. Immobilization time and foam supply significantly influenced phosphatase production. The maximum phosphatase activity was

obtained with 96 h of immobilization and 9 foam cobblestones for *A. flavus*; for the fungi *T. pinophilus* and *T. asperellum*, the maximum phosphatase activity was obtained with 72 h of immobilization and 12 foam cobblestones; and for *A. niger* 72 h and 15 foam cobblestones. The mathematical model central rotational composite planning was used to verify the optimization of immobilization time and foam supply. The coefficient of determination (R^2) on the influence of factors on enzymatic activity was 0.938 for *A. flavus*; 0.867 for *A. niger*; 0.997 for *T. pinophilus*. and 0.955 for *T. asperellum*. The immobilized system of *A. flavus*, *A. niger*, and *T. asperellum* was able to remove 99.9% of phosphorus in 1h10m; and *T. pinophilus*., 99.9% of phosphorus in 2 h. All fungal isolates are potential bioremediats of phosphorus in domestic effluents.

Keywords: bioremediation, phosphatase, immobilization, water pollutants.

LISTA DE ABREVIACÕES

- AE – Atividade enzimática
- BDA – Meio de cultura Batata Dextrose Agar
- COT – Carbono orgânico total
- DBO – Demanda bioquímica de oxigênio
- DCCR - Planejamento composto central rotacional
- DQO – Demanda química de oxigênio
- ETE – Estação de Tratamento de Esgoto
- IET – Índice de Estado Trófico
- MM – Meio de cultura mínimo
- NA - Nitrogênio amoniacal
- OF – Oferta de espuma
- OD – Oxigênio dissolvido
- OG – Óleos e graxas residuais
- PT – Teor de fósforo total PVK –
Meio de cultura Pikovskaya rpm –
Rotação por minuto
- S. Sed. – Sólidos Sedimentáveis
- STV – Sólidos Totais Voláteis
- ST – Sólidos totais
- STF – Sólidos totais fixos
- TCP - Fosfato tricálcico
- Ti – Tempo de imobilização

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Efeito do tempo sobre o número de publicações de periódicos que aplicaram fungos em na remoção de poluentes de efluentes, soluções aquosas ou meios de cultura.....	39
Figura 2. Número de periódicos apresentando os poluentes mais investigados em processos biorremediativos por fungos.....	41
Figura 3. Número de periódicos apresentando os padrões de qualidade investigados em processos biorremediativos por fungos.....	42
Figura 4. Representação dos países em que águas residuais foram objeto de estudo em pesquisas de tratamento de efluente real por fungos, apresentando locais de coletas nos últimos 5 anos.....	43

Capítulo 2

Figura 1. Coordenadas geográficas da ETE de Goiânia, GO, com Rio Meia Ponte, sua bacia e municípios vizinhos.....	59
Figura 2. Zona clara em meio Pikovskaya inoculado por <i>Talaromyces pinophilus</i> (a) e <i>Aspergillus niger</i> (b).....	62
Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura apresentando as medidas de diâmetro dos poros de espuma comercial de poliuretano a) Porosidade média de 0,71 mm ³ ; b) 0,63 mm ³ ; c) 0,25 mm ³	65
Figura 4. Células fúngicas imobilizadas em espumas de poliuretano a) <i>Trichoderma asperellum</i> b) <i>Talaromyces pinophilus</i> c) <i>Aspergillus niger</i> e d) <i>Aspergillus flavus</i>	66
Figura 5. Efeito do tempo de imobilização sobre a atividade enzimática de fosfatase ($\mu\text{mol/h}$ de p-nitrofenol) por biomassa fúngica imobilizada em espuma comercial de poliuretano.....	67
Figura 6. Superfície de resposta da atividade fosfatase máxima em função da variação da oferta de espuma de poliuretano e tempo de imobilização celular para <i>Aspergillus flavus</i>	68
Figura 7. Superfície de resposta da atividade fosfatase máxima em função da variação da oferta de espuma de poliuretano e tempo de imobilização celular para <i>Aspergillus niger</i>	69

Figura 8. Superfície de resposta da atividade fosfatase máxima em função da variação da oferta de espuma de poliuretano e tempo de imobilização celular para <i>Talaromyces pinophilus</i>	70
Figura 9. Superfície de resposta da atividade fosfatase máxima em função da variação da oferta de espuma de poliuretano e tempo de imobilização celular para <i>Trichoderma asperellum</i>	71

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1. Estudos sobre o tratamento de efluentes com fungos.....	22
--	-----------

Capítulo 2

Tabela 1. Isolados fúngicos do Laboratório de Micologia Básica, Aplicada e Divulgação Científica (FungiLab) da Universidade Estadual de Goiás– Câmpus Central Sede: Anápolis-GO utilizados em <i>screening</i> da atividade de fosfatase.....	55
Tabela 2. Valores naturais e codificados assumidos pelos fatores investigados em durante o processo de imobilização de células de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Talaromyces pinophilus</i> e <i>Trichoderma asperellum</i>	58
Tabela 3. Valores naturais e codificados assumidos pelos fatores investigados em durante o processo de incubação de células de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Talaromyces pinophilus</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> em amostras de efluentes.....	58
Tabela 4. Efeito do período de cultivo sobre a produção de fosfatase ácida.....	63
Tabela 5. Efeito estimado das variáveis usadas no planejamento composto central rotacional para otimização da produção de fosfatase produzida por <i>Aspergillus flavus</i> em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano.....	66
Tabela 6. Efeito estimado das variáveis usadas no planejamento composto central rotacional para otimização da produção de fosfatase produzida por <i>Aspergillus niger</i> em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano.....	68

Tabela 7. Efeito estimado das variáveis usadas no planejamento composto central rotacional para otimização da produção de fosfatase produzida por <i>Talaromyces pinophilus</i> . em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano...	69
Tabela 8. Efeito estimado das variáveis usadas no planejamento composto central rotacional para otimização da produção de fosfatase produzida por <i>Trichoderma asperellum</i> em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano	71
Tabela 9. Efeito do tempo sobre a remoção de fósforo de efluentes.....	73
Tabela 10. Efeito do volume de efluentes sobre a remoção de fósforo.....	73
Tabela 11. Proporção entre quantidade de paralelepípedos do sistema imobilizado para volume de efluente tratado eficientemente, em menor período.....	74

INTRODUÇÃO

Os poluentes, sejam resíduos orgânicos e inorgânicos, sólidos ou dissolvidos em chorume, ou efluentes, não desaparecem rapidamente quando descartados pelas atividades humanas. Ao contrário, muitas vezes, a decomposição é extremamente demorada diante da quantidade de resíduos descartados todos os dias. Nesse cenário de grande volume de resíduos produzidos diariamente, os efluentes, sejam de origem industrial, agrícola ou municipal, ameaçam a saúde ambiental e pública (GOSWAMI et al., 2021). De forma geral, os principais constituintes desses tipos de efluentes são: excreta humana (i.e., fezes e urina), águas de banho, de processamento de alimentos e de produtos de manutenção pessoais e domésticos, juntos a uma grande variedade de traços de outros compostos orgânicos e inorgânicos (METCALF; EDDY, 2015).

Estes efluentes acabam sendo lançados em corpos d'águas receptores, ou seja, corpos hídricos. O CONAMA, em sua Resolução no 430/11, dispõe sobre condições e padrões em corpos d'águas receptores e determina que efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e seguindo orientações legais (capacidade de suporte do corpo receptor, concentração de efeitos não observados, concentração do efluente no corpo receptor, zona de mistura, etc). Diante disso, empresas públicas e privadas buscam alternativas para atender às exigências normativas.

Dentre estas alternativas, existe a possibilidade de biodegradação ou biorremediação de efluentes promovida por fungos (ZAPANA-HUARACHE et al., 2020). Os fungos constituem um grande e diversificado reino de organismos eucarióticos, morfologicamente classificados como leveduras, fungos filamentosos ou fungos dimórficos (SÁNCHEZ, 2020). São conhecidos por degradar ou causar a deterioração de uma ampla variedade de materiais e compostos, processo conhecido como micodegradação ou micodeterioração (SINGH, 2006).

Suas enzimas extracelulares são ferramentas utilizadas durante o processo de decomposição da matéria orgânica, no qual macromoléculas orgânicas são convertidas em pequenos compostos orgânicos absorvidos pelas células microbianas (SÁNCHEZ, 2020). Além disso, os fungos têm a capacidade de mineralizar compostos orgânicos, liberando e armazenando vários elementos e íons e acumulando materiais tóxicos (SINGH, 2006). Outras vantagens incluem a habilidade de se adaptar a mudanças ambientais, como cargas de efluentes flutuantes, baixo pH e tolerância a baixa concentração de nutrientes ou presença de vários tipos de poluentes (SÁNCHEZ, 2020).

Diante dessas vantagens, os fungos constituem uma poderosa ferramenta biorremediativa para diferentes ambientes (solo, corpos hídricos), assim como de águas residuais (BALDANTONI et al., 2017). Nesta pesquisa, análise cienciométrica foi realizada para verificar como os fungos são investigados para tratar diversos tipos de efluentes e a realização de experimentos constatou a eficiência de enzimas fúngicas por células imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano na remoção de fósforo de efluentes domésticos.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Efeito do fósforo nos corpos hídricos

O fósforo é um elemento essencial para todas as formas de vida, mas suas reservas são limitadas no planeta (LEI et al., 2020). A presença de fósforo está relacionada a processos naturais (dissolução de rochas, decomposição de matéria orgânica, fósforo de composição celular de microrganismos) ou antropogênicos (esgotos, despejos industriais, detergentes, fertilizantes, pesticidas, excrementos de animais) (SCHWANKE, 2013). Entretanto, concentrações excessivas de fósforo podem influenciar o crescimento exagerado de algas, levando a eutrofização do ambiente (CONLEY et al., 2009).

A eutrofização consiste em um conjunto de respostas biogeoquímicas e ecológicas, diretas ou indiretas, originada pela fertilização antropogênica dos ecossistemas aquáticos (referência). A eutrofização é causada quando os níveis de carga de nutrientes provenientes de lançamentos de esgotos domésticos e industriais atingem altos níveis (BITTENCOURT; PAULA, 2014). Nessas condições, há rápido crescimento de algas e redução dos níveis de oxigênio na água, ocasionando a mortandade de peixes, algas e vegetais (WIJAYA; SOEDJONO, 2018).

O fósforo é o principal causador da eutrofização (CADONÁ et al., 2018). O ciclo do fósforo é compreendido pela utilização das reservas naturais desse elemento presentes nos solos e nas águas pelos seres vivos. Como o nitrogênio possui uma dinâmica própria de fixação, cabe geralmente ao fósforo o papel de limitar a atividade biológica. Considerando o fósforo como nutriente limitante, entendemos que seu excesso pode permitir o desenvolvimento acentuado de algas e plantas nas águas, reduzindo significativamente as concentrações de oxigênio e criando condições para a mortandade de peixes, algas e vegetais (BITTENCOURT; PAULA, 2014).

Além dos danos ambientais ocasionados por altos níveis de fósforo, existem os riscos à saúde humana, uma vez que os efluentes, provenientes de atividades industriais, domésticas e

agricultura, são tratados, descartados em corpos hídricos e retirados para reutilização por uma população a jusante (SHON et al., 2006). A Resolução do CONAMA 357 de 16 de março de 2005 esclarece, que o crescimento de cianobactérias em mananciais superficiais com elevados níveis de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e a liberação de toxinas produz efeitos adversos à saúde. As cianotoxinas podem ser neurotóxicas, hepatóxicas ou dermatóxicas e essas toxinas são liberadas quando há o rompimento da célula, que pode acontecer quando são aplicados algicidas ou sulfato de cobre (BORTOLI et al., 2015).

Schwanke (2013, p.105) ressalta que a contaminação de águas superficiais ocorre principalmente nas grandes cidades, onde, depois de consumida nas residências e indústrias, a água residual, a qual também é chamada de efluente ou esgoto, precisa ser tratada para garantir a saúde da população e reduzir os danos ambientais. Nos centros urbanos, esse tratamento da água residual oriunda das residências normalmente ocorre nas denominadas estações de tratamento de esgotos (ETE).

Nas ETES, a água residual é submetida a tratamento físicos, químicos e biológicos, para diminuição dos contaminantes e devolver ao ambiente um efluente tratado, que atenda aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental. No Brasil, a Resolução no 357 do CONAMA, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), alterada pelas Resoluções 410/2009 e 430/2011, determina a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e os padrões de lançamento de efluentes (SCHWANKE, 2013, p.105).

1.2 Remoção de fósforo de águas residuais - Tratamento convencional

No Brasil a legislação do CONAMA, 2005 estabelece que o nível crítico de P total na água é de 0,020 – 0,025; 0,030 – 0,050 e 0,050 – 0,075 mg L⁻¹ nas Classes 1, 2 e 3, respectivamente (BRASIL, 2005). Existem tecnologias baseadas em métodos físico-químicos e biológicos que são usadas para remover o fósforo das águas residuais. O método físicoquímico mais empregado é a adição de sulfato de alumínio ou o cloreto férrico ou a cal. Promove-se, com isso, a precipitação e a sedimentação do fósforo, além da redução consecutiva dos teores desse composto, chegando a remover 95% do fósforo (NUNES, 2012; BITTENCOURT; PAULA, 2014). A desvantagem desse método é o alto custo dos reagentes e a poluição secundária (RUZHITSKAYA; GOGINA, 2017).

Convencionalmente, as ETEs aplicam diversos tipos de microrganismos, na terceira fase do tratamento, em um processo conhecido como lodo ativado (METCALF; EDDY, 2015). O lodo ativado consiste em uma massa de microrganismos capazes de estabilizar o efluente sob condições aeróbias, aplicado ou na entrada do decantador primário, ou no tanque de aeração (NUNES, 2012; SIKOSANA et al., 2019). No tanque de aeração, o tempo de contato é proporcional ao tempo de ocorrência entre a mistura e a aeração do esgoto afluyente com a suspensão microbiana, também conhecida como sólidos suspensos no liquor misto (METCALF; EDDY, 2015).

Existe também o tratamento biológico em condições anaeróbias para remoção de fósforo. Neste sistema, as células microbianas de metabolismo anaeróbio decompõem os nutrientes do efluente a partir da matéria orgânica e armazenam a energia da degradação desses compostos em seu interior na forma de adenosina trifosfato (ATP). Se forem conduzidos adequadamente, os métodos biológicos podem remover o fósforo eficientemente (RUZHITSKAYA; GOGINA 2017).

1.3 Fungos: Ferramenta biorremediativa na remoção de fósforo de águas residuais

Já é de amplo conhecimento na literatura científica que os fungos removem, em diversos tipos de efluentes, os corantes e outros compostos fenólicos, os metais pesados, fósforo, nitrogênio, celulose, hemicelulose, lignina, lipídeos, hormônios, detergente, petróleo e hidrocarbonetos (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; BISHNOI et al., 2005; TAMAGAWA et al., 2006; JAKOVLJEVIĆ; VRVIĆ, 2016; DALECKA et al., 2020). Dentre esses trabalhos, vários gêneros são apontados como bons biorremediadores de efluentes, como: *Trichoderma* (SARAVANAN et al., 2019), *Aspergillus* (CHUPPA-TOSTAIN, 2020), *Phanerochaete*, *Saccharomyces*, *Pleurotus* sp. (JIA et al., 2007; SIERRA-SOLACHE et al., 2020). Isso porque os fungos adquirem nutrientes do ambiente secretando enzimas hidrolíticas, que degradam diferentes recursos (CRUZ, 2019).

Aqueles que são produtores de fosfatase extracelular podem adquirir o ortofosfato ou fósforo inorgânico (Pi), absorvendo este recurso após a catálise no ambiente em que habitam (NOZAWA et al., 1998; ANAND; SRIVASTAVA, 2012). Isto ocorre em um processo conhecido como transformação biológica de fósforo por meio da mineralização da fosfatase extracelular, em que Pi são liberados a partir do fósforo orgânico. O Pi é a forma que pode ser absorvida por plantas e microrganismos (LIU et al., 2021).

Alguns fungos são reconhecidos por remover fósforo, como: *A. luchuensis* (DALECKA et al., 2020), *A. niger* (Rodrigues et al., 2010), *A. oryzae* (JIN et al., 2002), *Aureobasidium* sp. (ZENG et al., 2021), *Ganoderma lucidum* (GUO et al., 2017), *Glomus etunicatum* (Gao et al., 2020), *Mucor circinelloides* (Ye et al., 2015), *Pleurotus ostreatus* (HULTBERG; BODIN, 2017), *Phanerochaete chrysosporium* (LIU et al., 2015), *Rhizopus oligosporus* (JIN et al., 2002), *Trametes versicolor* (GUO et al., 2017), *T. harzianum* (HULTBERG; BODIN, 2017) (Tabela 1).

Diversos tipos de efluentes são submetidos ao tratamento com fungos na literatura científica, por exemplo, efluentes de indústria de cervejarias (ZENG et al., 2021), águas residuais de estrume (HE et al., 2019) e efluentes de processamento de amido (JIN et al., 2002). Alguns trabalhos demonstram também usam o consórcio de fungos com microalgas ou bactérias, como *Chlorella sorokiniana* (TANG et al., 2019) e *Chlorella vulgaris* (XU et al., 2017), com o sucesso para remoção de fósforo de efluentes domésticos acima de 87%.

Tabela 1. Estudos sobre remoção de fósforo de efluentes por fungos.

Autores	Tipos de efluentes	Microrganismos	Remoção de fósforo (%)
Jin et al. (2002)	Indústria de processamento de amido	<i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	75,0
Guest e Smith (2007)	Indústria de minério	<i>Geotrichum spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> ; <i>Mucor sp.</i> ; <i>Phoma sp.</i>	53, 6, 39, 9, respectivamente
Ma et al. (2009)	Doméstico	Actinomicetos, fungos e bactérias anaeróbias presentes em sistema de infiltração	85,0
Rodrigues et al. (2010)	Têxtil sintético	<i>Aspergillus niger</i> AN400	21
Wang et al. (2010)	Doméstico	Fungos e bactérias presentes em sistema de infiltração	98,0
Ye et al. (2015)	Doméstico	<i>Mucor circinelloides</i>	40,1
Liu et al. (2015)	Digestor de biogás em uma fazenda de porcos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	61,0

Guo et al. (2017)	Indústria de vinho	<i>Ganoderma lucidum</i> e a microalga: <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Trametes versicolor</i> ,	85,3
Hultberg e Bodin (2017)	Efluentes sintéticos de cervejaria	<i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Trichoderma harzianum</i>	39,5
Marinho et al. (2017)	Solução aquosa	<i>Aspergillus niger</i> AN 400	15,0
Xu et al. (2017)	Efluente doméstico sintético	Fungo: <i>Ganoderma lucidum</i> e a alga: <i>Chlorella vulgaris</i>	89,57
Srinuanpan et al. (2018)	Indústria de processamentos de frutos do mar	<i>Trichoderma reesei</i>	93,0
Tang et al. (2019)	Efluente simulado	<i>Aspergillus</i> sp. XJ-2 <i>Trametes versicolor</i> e	83,9
DALECKA et al. (2020)	Doméstico	<i>Aspergillus luchuensis</i>	99,9
Gao et al. (2020)	Efluentes simulado com baixo teor de sal	<i>Glomus etunicatum</i>	22,5
Fazelipour et al. (2020)	Efluente sintético	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Stachybotrys</i> sp. <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Aurobasidium</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp.; <i>Geotrichum</i> sp., <i>Candida albicans</i> ., <i>Rhodotorula</i> sp. e <i>Trichosporon</i> sp.	80,2 para <i>T. harzianum</i> (máxima remoção de fósforo)
Paździor et al. (2020)	Indústria de corante	Fungos, bactérias e cianobactérias	98,0
Zeng et al. (2021)	Cervejaria	<i>Aureobasidium</i> sp.	53,5

Outra vantagem de se usar fungos, é a sua capacidade de quebrar macromoléculas em partículas menores. Assim, os fungos são capazes de agregar valor às águas residuárias, por exemplo, transformando-as em fertilizantes (SHON et al., 2006), ou obter um produtor rico em nutrientes para alimentação de animais (SOUZA FILHO et al. 2019). Sendo assim, é interessante que a micorremediação seja mais explorada, inclusive para gerar produtos.

1.4 Efluentes domésticos – Caracterização e tratamento convencional

Os efluentes domésticos são provenientes das residências, hotéis, casas de diversões, clubes, comércios e centros comerciais, de serviços (salões de cabeleireiros, consultórios, clínicas, por exemplo). A norma técnica brasileira NBR 9648 (ABNT, 1986) descreve outra definição: “Despejo líquido resultante do uso da água para higiene e necessidades fisiológicas humana”. Os principais compostos presentes em efluentes domésticos são fezes humanas e animais, restos de alimentos, sabões, detergentes (ARCHELA et al., 2003), produtos farmacêuticos, hormônios, biocidas e metais pesados (NAGHDI et al., 2018; MIRTUTUSAUS; SARRÁ, 2020). Ressaltando que a comunidade faz uso de várias substâncias, estima-se que 10 mil substâncias podem alcançar os efluentes domésticos (DEZOTTI, 2008).

Alguns dos principais parâmetros utilizados para avaliar e caracterizar o efluente sanitário bruto e tratado são: Potencial Hidrogeniônico (pH), temperatura, Oxigênio Dissolvido (OD), Nitrogênio Amoniacal (NA), DBO, DQO, Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Sedimentáveis (S. Sed.), Fósforo Total (PT) e Óleos e Graxas Residuais (OG) (LOPES, 2015). A diminuição da quantidade dos poluentes existentes nas águas residuais ocorre nas estações de tratamento de efluentes (ETEs), passando por vários processos de tratamento. As ETEs consistem em locais destinados ao tratamento de águas residuais de origem doméstica e industrial (DEZOTTI, 2008). O tratamento convencional nas ETEs normalmente adota métodos físicos, químicos e biológicos. É dividido em preliminar, primário, secundário e terciário (SHON et al., 2006).

O tratamento preliminar remove grosseiramente e prontamente sólidos inorgânicos acomodáveis, tais como partículas de areia e grãos (SHON et al., 2006). O primário consiste em retirar do esgoto bruto o máximo possível de sólidos em suspensão por separação mecânica e sedimentadores. O tratamento secundário utiliza os tratamentos biológicos, como tanque de aeração com lodos ativados (DEZOTTI, 2008). O oxigênio fornecido e difundido é consumido por um grupo de bactérias heterotróficas, promovendo o processo de degradação da matéria orgânica. No tratamento com lodo ativado, o afluente e o lodo ativado são intensamente misturados, agitados e aerados em unidades chamadas tanques de aeração para, em seguida, o lodo ativado ser separado do efluente tratado por sedimentação em decantadores. O tratamento terciário é qualquer processo após os tratamentos primário e secundário e que tem por objetivo produzir um efluente de maior qualidade (COSTA, 2019).

1.5 Imobilização de microrganismos em suporte de poliuretano para remoção de poluentes de águas residuais

As enzimas ou as células fúngicas podem ser imobilizadas com métodos simples, otimizando seu tempo de catálise (MORAIS et al., 2013). A imobilização refere-se à técnica de confinar/ancorar as enzimas ou células dentro ou em um suporte inerte para sua estabilidade e reutilização funcional (BRODELIUS, 1985). Das e Adholeya (2015) definem célula imobilizada como célula que por meios naturais ou artificiais é impedida de se mover independentemente de suas células vizinhas para todas as partes da solução aquosa do sistema.

A imobilização de células permite sua utilização contínua, maior densidade celular, maior atividade metabólica e proteção contra acidificação (WANG et al., 2020). Uma das vantagens mais importantes de imobilizar células ou enzimas é a proteção de perturbações ambientais externas, como estresses abióticos, como congelamento e descongelamento, ciclos secos e molhados, compostos químicos tóxicos e solventes orgânicos e outros estresses bióticos, como enzimas líticas, capazes de lisar a parede celular (D'SOUZA, 2002).

A matriz de espuma de poliuretano é um meio de propagação ideal, com alta porosidade para imobilização de microrganismo, boa resistência mecânica e baixo custo (FENG et al., 2012). Este material tem sido aplicado em processos de remediação de efluentes, incluindo a remoção de corante, fenóis, redução da demanda química de oxigênio, carbono orgânico, amônia e fósforo (CHU; WANG, 2011; FENG et al., 2012; VAIRAVEL; MURTY, 2021). Fungos imobilizados em espumas de poliuretano são propostos na literatura científica como soluções para gargalos biotecnológicos, como remoção de metais pesados com *Aspergillus terreus* (DIAS et al., 2002), redução de cetonas com *Diplogelasinospora grovesii* (QUEZADA et al., 2012) e *Monascus kaoliang* (QUEZADA et al., 2009) e degradação de diclofenaco em efluentes domésticos por *Trametes versicolor* e *Aspergillus luchuensis* (DALECKA et al., 2020).

As espumas de poliuretano também já foram utilizadas para imobilização de microorganismos com o fim de obter maior produção de fosfatase. Cianobactérias, como *Nodularia* sp., imobilizada produzem altas quantidades de fosfatase alcalina (RAMALINGAM; PRASANNA, 2006). *Serratia* sp., bactéria conhecida por produzir fosfatase ácida, também foi imobilizada em espumas de poliuretano para remover metais pesados (U, Ni²⁺ e Co²⁺) em um

biorreator, contendo anéis de cerâmica e glutaraldeído em ligação cruzada (PATERSONBEEDLE; MACASKIE, 2005).

1.6 Caracterização de fosfatases

A fosfatase é a enzima que catalisa o fósforo orgânico por meio da clivagem das ligações éster de fosfato (CHAUDHURI et al., 2017). As fosfatases são caracterizadas em ácidas e alcalinas, podendo também ser subdivididas em isoenzimas, diferenciadas por seu pH ótimo. A fosfatase ácida é produzida em condições de meio ácido e a fosfatase alcalina é produzida em condições de meio alcalino. Além disso, são classificadas por seu substrato específico, resistência a desnaturação por calor em vários níveis de pH, separação por cromatografia, inibição por fosfato inorgânico e síntese de regulação por fósforo (SHIEH et al., 1969). Os principais gêneros de fungos que produzem a fosfatase verificados na literatura são: *Aspergillus* (SHIEH et al., 1969; NOZAWA et al., 1998; DOILOM et al., 2020), *Penicillium* (PANDEY et al., 2007), *Phanerochaete* (ZHAO et al., 2020) e *Trichoderma* e alguns fungos micorrízicos (AOKI et al., 2012; LIU et al., 2021).

1.7 Fins biotecnológicos das fosfatases

Os microrganismos solubilizadores de fosfato – *actinomyces*, bactérias, fungos e leveduras - são frequentemente relatados para aumentar a biodisponibilidade de fósforo para as plantas (DOILOM et al., 2020), e esta ação é realizada pela enzima fosfatase, que transforma o fósforo orgânico em fósforo inorgânico que é a forma absorvida pelas plantas (PANDEY et al., 2007). Fungos do gênero *Trichoderma* são exemplos de organismos solubilizadores de fósforo e tem sido um dos fungos filamentosos mais estudados para promover a produção e desenvolvimento de várias espécies de monocultura. Tandon et al. (2019) ressaltam que a aplicação desses fungos é ideal em plantações em solos áridos ou semiáridos, onde o pH é bastante ácido. Isso porque esses organismos podem solubilizar P no solo em condições adversas, e demonstram respostas positivas na promoção do crescimento das raízes e contribuindo para uma região maior de absorção de nutrientes pelas plantas, conforme demonstrado por Bononi et al. (2020) em monocultura de soja. Esses autores ressaltam que, apesar de tais comprovações científicas, a agricultura no Brasil continua dependendo da fertilização química de fosfato.

A aplicação da biomassa de fungos micorrízicos arbusculares (AMF) produz fosfatase ácida, o que satisfaz o aumento da demanda de fósforo de plantas durante a sucessão florestal, mantendo alta produtividade das florestas tropicais e subtropicais limitadas por este elemento (LIU et al., 2021). Além de produzir a fosfatase, AMF secretam ácidos orgânicos, que solubilizam o fósforo ligado a óxidos de alumínio ou ferro (Al/Fe) e aumentam a disponibilidade de fósforo na rizosfera (AOKI et al., 2012).

Mais recentemente, a fosfatase tem sido proposta para remoção de metais pesados. Zhao et al. (2020) descreveram que a fosfatase e o fósforo inorgânico liberado promovem a remoção de chumbo em solução contendo chumbo (Pb^{2+}) e sugerem que pode ser aplicado na biorremediação de chumbo e em outros contextos ambientais. Além disso, existem os fungos bioacumuladores de polifosfato. Polifosfatos são sais ou ésteres de oxianions poliméricos formados a partir de unidades de PO_4 tetraédrico (fosfato) e ligados pelo compartilhamento de átomos de oxigênio. Tandon et al. (2019) descrevem o gênero *Trichoderma* como um bioacumulador de polifosfato.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral: Investigar o potencial de células fúngicas imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano na remoção de fósforo de efluentes domésticos.

2.2 Objetivos específicos:

- Investigar as tendências mundiais sobre as publicações a respeito do tema deste trabalho;
- Selecionar isolados fúngicos potencialmente produtores de fosfatases;
- Imobilizar isolados fúngicos em espumas comerciais de poliuretano;
- Verificar a atividade enzimática da preparação imobilizada e otimizar os resultados mediante design composto fatorial.
- Testar *in vitro*, dentro da melhor resposta de otimização do processo de atividade enzimática da preparação imobilizada, a capacidade de remoção do fósforo das amostras de efluentes domésticos coletadas na ETE;
- Verificar a remoção de fósforo dos efluentes mediante os sistemas imobilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, R. et al. Biodegradation and metabolic pathway of anthraquinone dyes by *Trametes hirsuta* D7 immobilized in light expanded clay aggregate and cytotoxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 405, p. 124176, 2021.

ANAND, A.; SRIVASTAVA, Pramod Kumar. A molecular description of acid phosphatase. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 167, n. 8, p. 2174-2197, 2012.

AOKI, M et al. Environmental control of root exudation of low-molecular weight organic acids in tropical rainforests. *Ecosystems*, v. 15, n. 7, p. 1194-1203, 2012.

ARCHELA, E. et al. Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. *Geografia (Londrina)*, v. 12, n. 1, p. 517-526, 2003.

BALDANTONI, A. D. et al. Anthracene and benzo(a)pyrene degradation in soil is favoured by compost amendment: perspectives for a bioremediation approach. *Journal of Hazardous Materials*, 2017.

BISHNOI, N. R. et al. Fungus-an alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. v. 64, p. 93-100, 2005

BITTENCOURT, C.; DE PAULA, M. A. S. Tratamento de Água e Efluentes–Fundamentos de saneamento ambiental e gestão de recursos hídricos. Saraiva Educação SA, 2014, p. 59 e 62.

BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020

BORTOLI, S; PINTO, E. Cianotoxinas: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. *Ecologia de reservatórios e interfaces*, p. 321-339, 2015.

BRODELIUS, P. Immobilized plant cells, in *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology* (Laskin, A. L, ed.) *Benjamin Cummings*, London, pp. 109–148, 1985.

CADONÁ, E. A. et al. Contaminação por nitrogênio e fósforo de águas destinadas ao consumo humano em região com intensa atividade suinícola. *Geosciences= Geociências*, v. 37, n. 4, p. 883-891, 2018.

CHAUDHURI, G. et al. Recent Trends in Phosphatase-Mediated Bioremediation. *Phosphoric Acid Industry: Problems and Solutions*, p. 27-46, 2017.

CHU, L.; WANG, J. Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio. *Chemosphere*, v. 83, n. 1, p. 63-68, 2011.

CHUPPA-TOSTAIN, G. et al. Evaluation of Filamentous Fungi and Yeasts for the Biodegradation of Sugarcane Distillery Wastewater. *Microorganisms*, v. 8, n. 10, p. 1588, 2020.

CONLEY, D. J. et al. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, v. 323, n. 5917, p. 1014-1015, 2009.

CRUZ, M. P. Compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* na indução de resistência a oídio em soja e a toxicidade a organismos não-alvo. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

DALECKA, B. et al. Constructive use of filamentous fungi to remove pharmaceutical substances from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, v. 33, p. 100992, 2020.

DAS, M.; ADHOLEYA A. Potential uses of immobilized bacteria, fungi, algae, and their aggregates for treatment of organic and inorganic pollutants in wastewater. In: *Water challenges and solutions on a global scale*. American Chemical Society, p. 319-337, 2015.

DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos: Volume 5 da Série Escola Piloto de Engenharia Química (Vol. 5). Editora E-papers, 2008.

DIAS, M.A. et al. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Letters in applied microbiology*, v. 34, n. 1, p. 46-50, 2002.

DOILOM, M. et al. Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium* and *Talaromyces*. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 2443, 2020.

FAZELIPOUR, M. et al. Fungi-based treatment of brewery wastewater—biomass production and nutrient reduction. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 101(11), p. 4791-4798.2020, 2017.

FENG, Q. et al. Effects of packing rates of cubic-shaped polyurethane foam carriers on the microbial community and the removal of organics and nitrogen in moving bed biofilm reactors. *Bioresource technology*, v. 117, p. 201-207, 2012.

FU, Y; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology*, v. 79, n. 3, p. 251-262, 2001.

GAO, P. et al. AM fungi enhance the function of ecological floating bed in the treatment of saline industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 14, p. 16656-16667, 2020.

GOSWAMI, R. K. et al. Microalgae-based biorefineries for sustainable resource recovery from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, v. 40, p. 101747, 2021.

GUEST, R. K.; SMITH, D. W. Isolation and screening of fungi to determine potential for ammonia nitrogen treatment in wastewater. *Journal of Environmental Engineering and Science*, v. 6, n. 2, p. 209-217, 2007.

HE, Q. et al. Phosphorus recovery from dairy manure wastewater by fungal biomass treatment. *Water and Environment Journal*, v. 33, n. 4, p. 508-517, 2019.

HULTBERG, M.; BODIN, H. Fungi-based treatment of brewery wastewater—biomass production and nutrient reduction. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(11), 47914798, 2017.

JAKOVLJEVIĆ, V.D.; VRVIĆ, M.M. Capacity of *Aspergillus niger* to degrade anionic surfactants and coproduce the detergent compatible enzymes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 183-189, 2016.

JIA, C. et al. Synergic treatment for monosodium glutamate wastewater by *Saccharomyces cerevisiae* and *Coriolus versicolor*. *Bioresource technology*, v. 98, n. 4, p. 967-970, 2007

JIN, B. et al. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. *Advances in Environmental Research*, 6(2), 179-189, 2002.

KAPRI, A; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 787-795, 2010.

LEI, Y. et al. Electrochemically mediated calcium phosphate precipitation from phosphonates: Implications on phosphorus recovery from non-orthophosphate. *Water research*, v. 169, p. 115206, 2020.

LIU, Y. et al. Mycorrhizal fungi and phosphatase involvement in rhizosphere phosphorus transformations improves plant nutrition during subtropical forest succession. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 153, p. 108099. 2021.

- LOPES, T. R. Caracterização do esgoto sanitário e lodo proveniente de reator anaeróbio e de lagoas de estabilização para avaliação da eficiência na remoção de contaminantes. 2015. Tese (Dissertação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2015.
- MA, L. et al. Biological nitrogen removal by nitrification-denitrification in constructed rapid infiltration land system to treat municipal wastewater. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 7, n. 3/4, p. 795-798, 2009.
- MARINHO, G. et al. Employment of *Aspergillus niger* AN 400 in batch reactors to remove pesticide aqueous matrix. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, (AHEAD), 0-0, 2017.
- METCALF, L; EDDY, H. P. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. *McGraw Hill Brasil*, 2015.
- MIR-TUTUSAUS, J. A.; SARRÀ, M. Fungal Reactors: A Solution for the Removal of Pharmaceuticals in Urban and Hospital Wastewater. In: *Removal and Degradation of Pharmaceutically Active Compounds in Wastewater Treatment*. p. 145-162, 2020.
- MORAIS, R. R. et al. Immobilization of α -amylase onto *Luffa operculata* fibers. *Enzyme research*, v. 2013, 2013.
- NAGHDI, M. et al. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. *Environmental pollution*, v. 234, p. 190-213, 2018.
- NARENDRAN R, 2019. Bioremoval of toxic substances in synthetic wastewater using *Trichoderma pubescens* (NPK2), isolated from mangrove soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 19, p. 101100, 2019.
- NUNES, J.A. Tratamento físico-químico de águas residuárias industriais. Editora J. Andrade, 2012, p.184.
- OLANDER, L.P.; VITOUSEK, P.M.. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry*, 49 (2000), pp. 175-190, 2000.
- QUEZADA, M. A. et al. *Monascus kaoliang* CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso-propanol as co-substrate: optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 6, p. 2018-2025, 2009.
- QUEZADA M.A. et al. *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 immobilized in polyurethane foam. An efficient biocatalyst for stereoselective reduction of ketones. *Bioresource technology*, v. 112, p. 18-27. 2012.

PANDEY, A. et al.. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24(1), p. 97-102, 2008.

PAŹDZIOR, K. Treatment of industrial textile wastewater in biological aerated filters– Microbial diversity analysis. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 2020.

RAMALINGAM, N.; PRASANNA, B. Gowtham. Effect of aluminum phosphate on alkaline phosphatase activity of polyurethane foam immobilized cyanobacteria. *Current microbiology*, v. 53, n. 3, p. 194-197, 2006.

RODRIGUES, K. et al. Viability of the synthetic textile wastewater treatment in a fixed-bed aerobic reactor. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 15, n. 1, p. 99-106, 2010.

RUZHITSKAYA, O; GOGINA, E. Methods for removing of phosphates from wastewater. In: SPbWOSCE-2016, *MATEC conference*, vol 106, p 07006, 2017.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro-and microplastics biodegradation. *Biotechnology advances*, v. 40, p. 107501, 2020.

SARAVANAN, S. et al. Comparative study on treatment of cassava wastewater using free, immobilized and biofilm of *Trichoderma harzianum*-*Trichoderma viride* consortium. *Water Desalin. Treat*, v. 156, p. 370-377, 2019.

SCHWANKE, C. Ambiente: Tecnologias: Série Tekne. Bookman Editora, 2003, p. 43.

SHON, H. K. et al. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Critical reviews in environmental science and technology*, v. 36, n. 4, p. 327-374, 2006.

SHIEH, T.R. et al. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *Journal of Bacteriology*, v. 100, n. 3, p. 1161-1165, 1969.

SIKOSANA, M. L. et al. Municipal wastewater treatment technologies: A review. *Procedia Manufacturing*, v. 35, p. 1018-1024, 2019.

- SRINUANPAN, S. et al. A rapid method for harvesting and immobilization of oleaginous microalgae using pellet-forming filamentous fungi and the application in phytoremediation of secondary effluent. *International journal of phytoremediation*, v. 20, n. 10, p. 1017-1024, 2018.
- TAMAGAWA, Y. et al. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere*, v. 65, n. 1, p. 97-101, 2006.
- TANDON, A. et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *Journal of King Saud University-Science*, v. 32, n. 1, p. 791798, 2020.
- TANG, W. et al. Decolorization and degradation analysis of Disperse Red 3B by a consortium of the fungus *Aspergillus* sp. XJ-2 and the microalgae *Chlorella sorokiniana* XJK. *RSC advances*, v. 9, n. 25, p. 14558-14566, 2019.
- VAIRAVEL, P.; MURTY, V. Ramachandra. Decolorization of Congo red dye in a continuously operated rotating biological contactor reactor. *Desalin. Water Treat*, v. 196, p. 299-314, 2020.
- WANG, H. LI, T. Sun and J. Pan, "Pilot Study on the Performance and Microbial Structure of a Subsurface Wastewater Infiltration System," *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, pp. 1-9, 2010.
- WANG, L. et al. In-situ growth of graphene on carbon fibers for enhanced cell immobilization and xylitol fermentation. *Applied Surface Science*, v. 527, p. 146793, 2020.
- WIJAYA, I. M. W.; SOEDJONO, E. S. Domestic wastewater in Indonesia: challenge in the future related to nitrogen content. *Geomate Journal*, v. 15, n. 47, p. 32-41, 2018.
- XU, J. et al. Effects of influent C/N ratios and treatment technologies on integral biogas upgrading and pollutants removal from synthetic domestic sewage. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.
- YE, D. et al. P accumulation of *Polygonum hydropiper*, soil P fractions and phosphatase activity as affected by swine manure. *Applied Soil Ecology*, v. 86, p. 10-18, 2015.

ZAPANA-HUARACHE, S. V. et al. Chromium (VI) bioremediation potential of filamentous fungi isolated from Peruvian tannery industry effluents. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 271-278, 2020.

ZENG, X. Efficient phosphorus removal by a novel halotolerant fungus *Aureobasidium* sp. MSP8 and the application potential in saline industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 334, p. 125237, 2021.

ZHAO, W.W. et al. Removal and biomineralization of Pb^{2+} in water by fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Cleaner Production*, v. 260, p. 120980, 2000.

CAPÍTULO 1

Remediação de águas residuais por fungos: Uma análise Cienciométrica

RESUMO

Os fungos são conhecidos por degradar uma grande variedade de materiais e compostos. O objetivo do presente estudo foi analisar a produção científica sobre biorremediação de efluentes por fungos, analisando-se a tendência temporal das publicações, classificação de poluentes estudados, e a distribuição geográfica dos estudos com os principais países que pesquisam sobre o assunto. A base de dados *Web of Science* foi utilizada na busca dos periódicos, no período de 1991 a 2021. Foram encontrados 3.665 artigos e após a leitura de resumos, apenas 1.877 abordavam remediação de águas residuais por fungos. O ano de maior quantidade de artigos publicados foi em 2020. A maior parte dos artigos investigou a remoção de corantes por fungos, seguido por compostos fenólicos, demanda química de oxigênio, metais pesados e compostos farmacêuticos, respectivamente. Os países que mais apresentaram pontos de coleta de águas residuais nos últimos 5 anos foram Índia, Espanha, China, Estados Unidos, Brasil e Turquia, respectivamente.

Palavras-chave: biorremediação, efluente, poluentes, remoção.

ABSTRACT

Fungi are known to degrade a wide variety of materials and compounds. The aim of this study was to analyze the scientific production on bioremediation of effluents by fungi, analyzing the temporal trend of publications, classification of pollutants studied, and the geographical distribution of studies with the main countries that research on the subject. The Web of Science database was used in the search of journals from 1991 to 2021. We found 3,665 articles and after reading abstracts, only 1,877 addressed remediation of wastewater by fungi. The year with the largest number of articles published was in 2020. Most articles investigated the removal of dyes by fungi, followed by phenolic compounds, chemical oxygen demand, heavy metals and pharmaceutical compounds, respectively. The countries that presented the most wastewater collection points in the last 5 years were India, Spain, China, the United States, Brazil and Turkey, respectively.

Keywords: bioremediation, effluents, pollutants, removal.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são capazes de degradar uma ampla diversidade de compostos orgânicos (DALECKA et al., 2020). São vantajosos devido à produção de atividade extracelular, bem como a habilidade de resistir às difíceis condições ambientais, baixo pH, tolerância a baixa concentração de nutrientes e resistente contra poluentes orgânicos e metais pesados (WANG et al., 2019). Além disso, podem oferecer outros serviços, por exemplo, agregar valor às águas residuais, que podem ser usadas como fertilizantes (SHON et al., 2006).

Há décadas, os fungos são conhecidos por serem eficientes em remover poluentes de águas residuais (SINGH, 2006). Porém, estudos buscam obter resultados cada vez melhores, somando o tratamento biológico a tecnologias ou métodos, convencionais ou inovadores, que prometem potencializar o trabalho dos fungos na biorremediação de efluentes, melhorando, ainda mais, sua qualidade quando são lançados no ambiente natural. Nesse contexto, sobressaem métodos que propõem materiais/equipamentos de baixo custo, reutilizáveis, fácil aplicação e que não geram resíduos secundários ou que possam ser reciclados em outras atividades.

O estudo cienciométrico sobre a aplicação dos fungos em remover poluentes de águas residuais, abordando os métodos, poluentes, espécies e locais em que as pesquisas são realizadas poderia apontar tendências e lacunas nesta temática. Garfield e Welljams-Dorof acrescenta ainda que a ciencimetria é capaz de nortear os gestores de políticas públicas, pesquisas corporativas e administradores de universidades, que precisam de indicadores sobre ciência e tecnologia válidos e confiáveis para identificar especialidades emergentes, por exemplo. Diante disso, os objetivos deste estudo foram analisar o efeito do tempo sobre o número de produção científica sobre biorremediação de efluentes utilizando fungos, avaliar os tipos de poluentes biorremediativos, parâmetros de qualidade utilizados e os países os quais tem utilizado está abordagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O foco da investigação são estudos que aplicam fungos na remoção de poluentes, de águas residuais, meio de cultura ou soluções aquosas. A pesquisa foi realizada na base de dados do *Web of Science*, com os seguintes termos de busca: (TS=((fung* OR mushroom*) AND (remediation* OR bioremediation* OR mycoremediation* OR treatment* OR remov* OR biosor*))(wastewater* OR sewage* OR effluent*). O filtro para somente “artigos” foi aplicado.

Após a triagem, foi realizada uma tendência temporal e uma classificação das pesquisas por poluente. Os dados foram trabalhados com auxílio do software Microsoft Excel. De posse dos resultados, uma seleção de artigos que realizaram pesquisas in loco nos últimos 5 anos foi realizada para obter dados mais recentes de distribuição entre países, pois os autores que testam remoção de poluentes em meios de cultura e soluções aquosas dificilmente mencionam os locais onde as pesquisas ocorreram. Os dados foram obtidos por meio de uma pré-seleção a partir dos resumos e leitura dos materiais e métodos do artigo completo. Em seguida, as coordenadas geográficas dos pontos foram convertidas para coordenadas decimais e planilhadas com auxílio do software Excel. A planilha foi convertida em “txt” e depois, dentro do software livre, de geoprocessamento QGIS 3.10, uma camada vetorial de pontos com datum WGS84 foi adicionada contendo as informações georreferenciadas dos artigos. O comando utilizado foi “adicionar camada de texto delimitado”. Logo após, foi adicionada outra camada vetorial do tipo shapefile de delimitação dos países do mundo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do tempo sobre o número de publicações

Como resultado da busca pelas palavras chaves (TS=((fung* OR mushroom*) AND (remediation* OR bioremediation* OR mycoremediation* OR treatment* OR remov* OR biosor*))(wastewater* OR sewage* OR effluent*)), foram identificados 3.665 artigos na base de dados Web of Science. Após a triagem com a leitura de resumos, restaram 1.877. Com a análise dos dados, é possível verificar que houve um crescente aumento no número de publicações ao longo do tempo. Na última década, o número de publicações aumentou, sendo o ano de maior quantidade de artigos publicados foi em 2020 (160) (Figura 1).

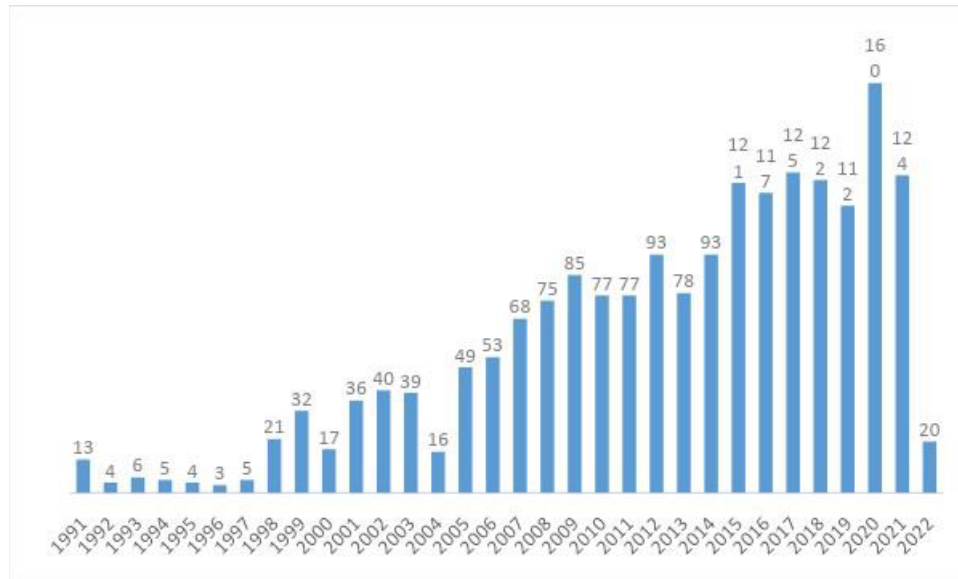


Figura 1. Efeito do tempo sobre o número de publicações de periódicos que aplicaram fungos na remoção de poluentes, soluções aquosas ou meios de cultura.

O aumento de lançamento de águas residuais no ambiente prejudica a saúde humana e ambiental em todo o mundo, se não devidamente tratado. Essa problemática de danos ambientais tende a se agravar com a incapacidade dos governantes de gerir os recursos naturais limitados, e, por fim, promove o aumento de publicações de pesquisas com a temática de biorremediação (HERBIG, 2019). Cria-se então financiamento de pesquisas inovadoras, desenvolvendo biotecnologias que podem ser usadas para proteger o meio ambiente e promover saúde da comunidade (WU et al., 2018).

A organização de eventos mundiais que buscam minimizar os danos ambientais também pode ser um impulsionador realização e publicação de pesquisas científicas. Em 2015, 193 países membros da Organização das Nações Unidas (ONU) se reuniram para elaborar uma Agenda. A agenda 2030 estabelece 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. O objetivo 6 busca assegurar a disponibilidade e gestão sustentável de água e saneamento para todos. Acrescenta-se a isto o objetivo 6.3, que descreve sobre o tratamento de águas residuais:

Até 2030, melhorar a qualidade da água, reduzindo a poluição, eliminando despejo e minimizando a liberação de produtos químicos e materiais perigosos, reduzindo à metade a proporção de águas residuais não tratadas e aumentando substancialmente a reciclagem e reutilização segura globalmente (AGENDA, 2020).

3.2 Poluentes e Parâmetros de Qualidade

A maior parte dos artigos investigam a remoção de corantes por fungos (926), seguido por compostos fenólicos (643), metais pesados (532) e compostos farmacêuticos (259). Há

lacunas a serem preenchidas quanto a remoção de nitrogênio (41), fósforo (20), óleos (18), lignina (16), pesticida (5), cianeto (5), detergente (5), açúcares (4), celulose (3), entre outros, citados na figura 2. Em relação aos parâmetros de qualidade como Demanda química de oxigênio (DQO) (639), cor (28), DBO (22), Carbono Orgânico Total (COT) (15) Total de Sólidos Suspensos (TSS) (13). Os parâmetros menos estudados são: Turbidez (6), Toxicidade (5), Sólidos Secos Totais (2) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (1) (Figura 3).

Águas residuais contendo corantes e compostos fenólicos têm gerado preocupações da comunidade e da comunidade científica, devido sua toxicidade, compostos cancerígenos, propriedades mutagênicas e pouca biodegradabilidade (JUN et al., 2019). As águas residuais coloridas estão tornando-se uma grande preocupação no sentido de devolver ao ambiente em melhor qualidade, porque são muitas fontes que as produzem: indústrias têxteis, de papéis, de plásticos, impressões, couros e papéis (BHARATHI et al., 2022). Essas tendências apontam o aumento do interesse desta área entre a comunidade científica.

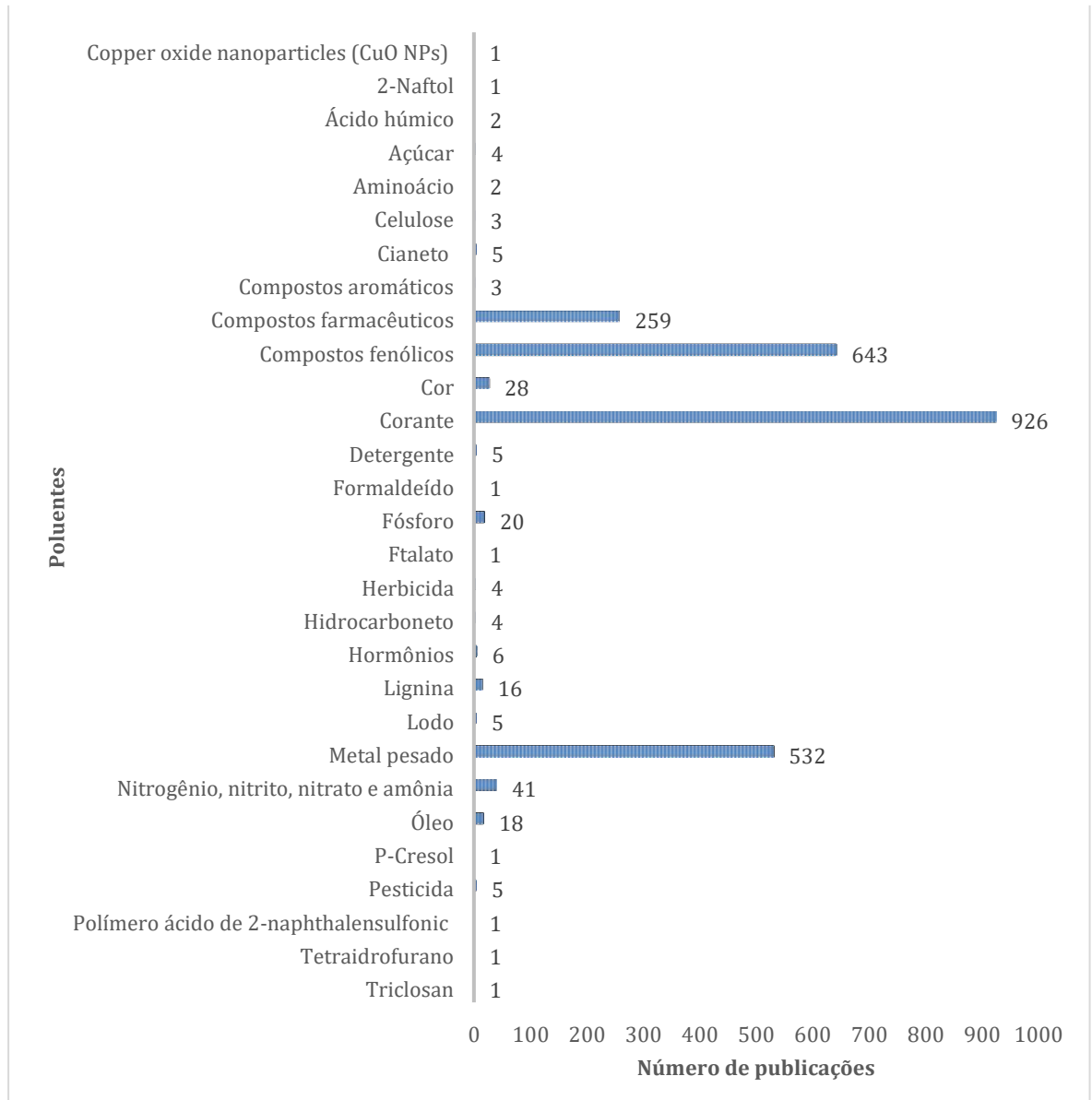


Figura 2. Número de periódicos apresentando os poluentes investigados em processos biorremediativos por fungos.

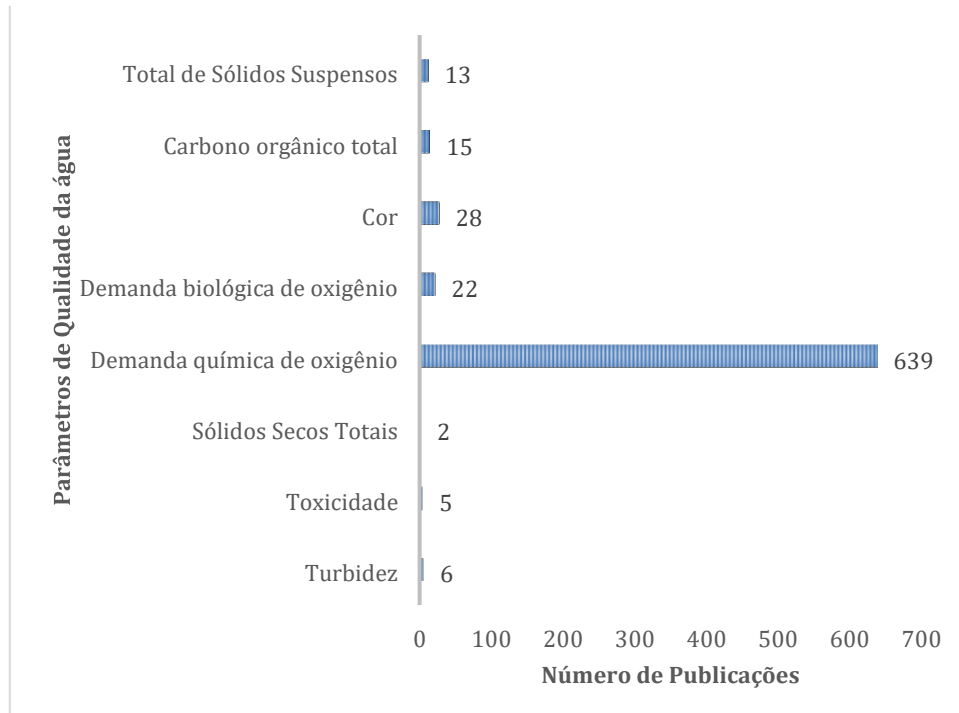


Figura 3 Número de periódicos apresentando os padrões de qualidade investigados em processos biorremediativos por fungos.

3.3 Aplicação dos fungos em processos biorremediativos

Mediante a leitura dos resumos, 105 espécies de fungos foram aplicadas para remover poluentes de efluentes reais, meios de cultura ou soluções aquosas. As espécies mais aplicadas foram: *Trametes versicolor* (174), *Aspergillus niger* (144), *Phanerochaete chrysosporium* (127), *Pleurotus ostreatus* (93) e *Ganoderma lucidum* (34).

O gênero *Trametes* foi citado em pesquisas aplicando outras quatro espécies, além de *T. versicolor*: *Trametes hirsuta* (17), *Trametes pubescens* (13), *Trametes villosa* (9), *Trametes trogii* (7). Em 4 pesquisas, a espécie não foi mencionada no resumo. *Aspergillus* foi o gênero que mais variou a quantidade de espécies, sendo 13, além de *A. niger*: *Aspergillus flavus* (39), *Aspergillus terreus* (25), *Aspergillus fumigatus* (24), *Aspergillus oryzae* (24), *Aspergillus versicolor* (13), *Aspergillus nidulans* (9), *Aspergillus lentulus* (6), *Aspergillus aculeatus* (3), *Aspergillus carneus* (2), *Aspergillus sydowii* (2), *Aspergillus arcovendensis* (1) e *Aspergillus keratitidis* (1). Em 14 pesquisas a espécie não foi identificada. O gênero *Phanerochaete* usou também a espécie *Phanerochaete sórdida* (4). Para o gênero *Pleurotus*, além de *Pleurotus ostreatus*, foram aplicadas em pesquisas outras 3 espécies: *Pleurotus sajor-caju* (20), *Pleurotus*

eryngii (12) e *Pleurotus florida* (8). Em 3 trabalhos, a espécie não foi identificada. Por fim, o gênero *Ganoderma*, também envolveu as espécies: *Geotrichum candidum* (12), *Ganoderma cupreum* (2) e em 1 trabalho, a espécie não foi identificada.

3.4 Distribuição geográfica das pesquisas

Os trabalhos investigaram a remoção de poluentes de soluções aquosas, meio de cultura e efluentes reais, que seriam aqueles industriais, municipais ou agroindustriais. De 2017 a 2022, apenas 114 pontos foram encontrados de pesquisas realizadas mediante coletas (Figura 3). A pesquisa in loco é importante, porque as substâncias presentes nos efluentes, muitas vezes não são controladas (DEZOTTI, 2008), o que permitiria testar a capacidade de adaptação dos fungos, uma vez que no geral, são bons decompositores. Os países que mais apresentaram pontos de coleta de efluentes foram Índia (26), Espanha (15), China (12), Estados Unidos (7), Brasil (6) e Turquia (6), respectivamente. Esses dados apontam quais países estão desempenhando esforços para remover poluentes de efluentes com ferramentas biotecnológicas, com experimentos in vitro.

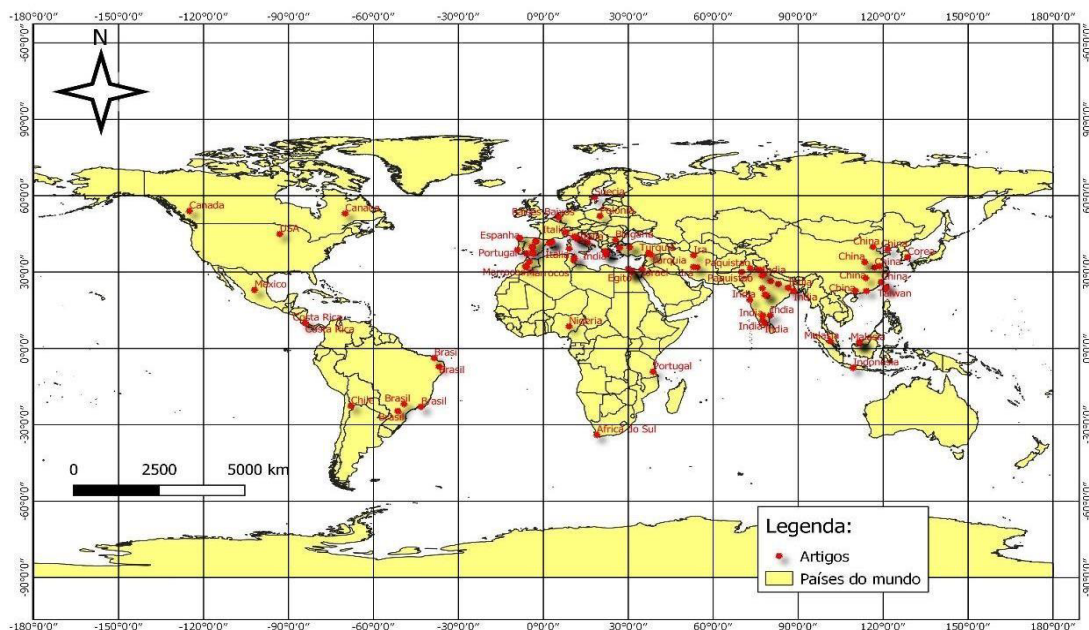


Figura 4. Representação dos países em que águas residuais foram objeto de estudo em pesquisas de tratamento de efluente real por fungos, apresentando locais de coletas nos últimos cinco anos.

Autor: Rodrigo da Costa Andrade

3.5 Métodos empregados no tratamento de efluentes por fungos

3.5.1 Imobilização/encapsulamento de enzimas ou células fúngicas

A imobilização refere-se a técnica de confinar/ancorar enzimas ou células dentro de um suporte inerte para sua estabilidade e reutilização funcional (MORAIS et al., 2013). Os suportes para células/enzimas podem ser provenientes de compostos diversificados: Alginato, PVC, espuma de poliuretano, quitosana, lodo e biomassa fúngica. Os trabalhos buscam, muitas vezes, por meio da biomassa imobilizada, aumentar produção enzimática, tempo de catálise, reutilização do sistema, maior densidade celular, maior atividade metabólica, proteção contra acidificação do meio ou, no caso da imobilização enzimática, promover uma estabilidade na conformação estrutural, para que a enzima não perca sua função devido às variações do meio - pH ou presença de outros compostos (MORAIS et al., 2013; L. WANG et al., 2020).

Trabalhos aplicam a imobilização de células/enzimas em alginato. O alginato é um polissacarídeo, presente nas paredes de algas marinhas pardas do Filo Phaeophyta e na cápsula celular de algumas bactérias. Com bons resultados de remoção da matéria orgânica, já foram imobilizados os fungos *P. chrysosporium* (Sierra-Solache et al., 2020; Sierra Solache et al., 2016), *A. niger* (ABD; AZZA, 2017), entre outros. Outras técnicas de tratamento foram adicionadas à imobilização e, quanto mais processos existem, a tendência é alcançar resultados mais satisfatórios. Por exemplo, *P. chrysosporium*, encapsulado dentro alginato, álcool polivinílico e grafeno, reduziu 70% de DQO em efluentes têxteis em 7 dias, no entanto, 90% foi alcançado quando somado à ultrafiltração com membranas (SIERRA-SOLACHE et al., 2020).

Em pesquisa mais recente, *P. chrysosporium* foi imobilizado em PVC, mediante modificação na superfície de PVC com reação de fotopolimerização por enxerto. O tratamento removeu 90% dos materiais orgânicos presentes em efluentes de matadouro (DQO, BDO, nitrogênio total e sólidos totais) e metais pesados (HERNÁNDEZ-AGUIRRE et al., 2020). A espuma comercial de poliuretano também é mencionada, principalmente, para obter maior produção enzimática a partir da biomassa aprisionada. *Bjerkandera adusta* foi imobilizado a fim otimizar a catálise da DQO por manganês peroxidase (BARDI et al., 2017).

Houve estudos que a matriz foi a própria biomassa fúngica como fungos filamentosos (SRINUANPAN et al., 2018) e *Ganoderma lucidum* (GUO et al., 2017) formaram pelotas a fim de imobilizar microalgas na biomassa fúngica. O processo foi eficiente para remover 93% do fósforo, 74% de DQO e 44% de nitrogênio por fungos filamentosos, e 79% de DQO, 4% de nitrogênio e 74% de fósforo por *G. lucidum*. Além desses trabalhos, já foi realizado imobilizado,

em lodo de tratamento de efluentes domésticos, *Penicillium corylophilum* e *A. niger*, removendo 94% da DQO e 98% de turbidez (MANNAN et al., 2005).

3.5.2 Fotocatálise

Alguns trabalhos usam o tratamento biológico com fungos em combinação com atividade fotocatalítica (BARRETO-RODRIGUES et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2015). A fotocatalise é uma técnica baseada na ativação de um material semicondutor por luz solar ou artificial (BARRETO-RODRIGUES et al., 2009).

O fungo *P. chrysosporium* foi adicionado ao tratamento com fotocatalise (nanoTiO₂/UV, nano-Fe₂O₃/UV, nanoTiO₂/H₂O₂/UV e nano-Fe₂O₃/H₂O₂/UV). Foi possível alcançar 38% de remoção de DQO, 31% de compostos fenólicos totais, 14% de compostos aromáticos e 43% de cor (NOGUEIRA et al., 2015). A técnica apresentou excelentes resultados com *Aspergillus sp* em efluente de uma indústria que usa algodão como matéria-prima para produzir polpa alcalilina da nitrocelulose (NaOH). A combinação do tratamento biológico com a fotocatalise mostrou um aumento na remoção de 92% de compostos fenólicos, 4,9% de toxicidade e 62% de carbono orgânico total (c) (BARRETO-RODRIGUES et al., 2009).

3.5.3 Biofloculantes

Os biofloculantes são produtos derivados do metabolismo microorganismos, incluindo fungos, que são eficientemente aplicados na remoção da matéria orgânica em diversos tipos de efluentes. Podem ser constituídos por polissacarídeos, proteínas ou glicoproteínas (LI et al., 2021). Trata-se de produtos não tóxicos, ambientalmente sustentáveis e superam as desvantagens dos floculantes inorgânicos (sulfato de alumínio e hidrato de cloro-alumínio) e sintéticos orgânicos (poliacrilamida), amplamente usados em águas residuais industriais, podendo causar problemas ambientais (ALJUBOORI et al., 2014; LI et al., 2021).

Produtos solúveis microbianos (PSM) são polissacarídeos liberados do metabolismo de *P. chrysosporium* que mostram alta atividade biofloculante. PSM não é tóxico, sendo ambientalmente sustentável, com a capacidade de superar desvantagens de floculantes inorgânicos e sintéticos de alto peso molecular. Com esse sistema, a DQO foi removido eficientemente de efluentes domésticos (LI et al., 2021).

A. niger também foi estudado por sua capacidade de produzir biofloculante, denominado como PM-5, constituído de carboidrato e proteína. PM-5 apresentou capacidade

de remoção de 63% de turbidez de efluentes de usina de extração óleo de palma (ALJUBOORI et al., 2014).

3.5.4 Consórcio de microorganismos

Outro método que os autores testam é a interação entre diferentes microrganismos. Os microrganismos são inoculados no mesmo meio para crescer juntos e sua interação é observada. Há experimentos de consórcio de dois ou mais microrganismos, sendo fungo com alga, com bactéria, com planta e entre diferentes isolados fúngicos.

Em geral, os resultados do consórcio são bons. O resultado depende de os microrganismos conviverem bem no mesmo ambiente, podendo assim reunir as vantagens que oferecem, por exemplo, 93,9% de remoção de fósforo em solução aquosa por *Aspergillus* sp. XJ-2 e a microalga *Chlorella sorokiniana* XJK (TANG et al., 2019); 97,8 de remoção de DQO por três fungos: *Chaetomium globosum* IMAI, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* (AJMI et al., 2018).

4. CONCLUSÃO

O estudo cienciométrico sobre biorremediação de águas residuais por fungos permitiu traçar o perfil das pesquisas, sua distribuição temporal entre países, bem como o foco das pesquisas, permitindo identificar tendências e lacunas na exploração da área temática. Foi possível constatar o crescimento de publicações nas últimas décadas, sendo o ano de maior publicação em 2020, em que os corantes e os compostos fenólicos são objetos de estudos da maior parte das pesquisas e que há escassez de pesquisas investigando remoção de outros poluentes, por exemplo, fósforo, celulose e óleos. Os parâmetros de qualidade mais investigados são: DQO, cor e COT. Há poucos estudo quanto aos outros parâmetros: Turbidez, Toxicidade, Sólidos Secos Totais e DBO. Os países que mais realizaram coletas de efluentes, desde 2015 são Índia e Espanha. De acordo com os dados, perspectivas futuras são de que o aumento de pesquisas científicas com o passar do tempo continue ocorrendo, principalmente relacionadas a remoção de corantes, uma vez que a indústria têxtil, e a produção de plásticos, impressões, cosméticos, couros e papéis crescem cada vez mais no contexto do capitalismo.

REFERÊNCIAS:

ABD, E. H. F.; AZZA, E. A. M. A. Industrial oil wastewater treatment by free and immobilized *Aspergillus niger* KX759617 and the possibility of using it in crop irrigation. *Rendiconti Lincei*, 28(1), 93–103, 2017.

AGENDA 2030. Os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: < Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável | As Nações Unidas no Brasil> Acesso em: 18 fev. 2022.

AJMI, K et al. Polyvinyl acetate processing wastewater treatment using combined Fenton's reagent and fungal consortium: Application of central composite design for conditions optimization. *Journal of Hazardous Materials*, 358, 243–255, 2018.

ALJUBOORI, A. H. R. et al. Production of a bioflocculant from *Aspergillus niger* using palm oil mill effluent as carbon source. *Bioresource Technology*, 171, 66–70, 2014.

BARDI, A. et al. Recalcitrant compounds removal in raw leachate and synthetic effluents using the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Water (Switzerland)*, 9(11), 1–14, 2017.

BARRETO-RODRIGUES, M et al. Combined photocatalytic and fungal processes for the treatment of nitrocellulose industry wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2–3), 1569–1573, 2009.

BHARATHI, D et al. Microbial approaches for sustainable remediation of dye-contaminated wastewater: a review. *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 3, p. 1-11, 2022.

DALECKA, B. et al. Constructive use of filamentous fungi to remove pharmaceutical substances from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, v. 33, p. 100992, 2020.

DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos: *Volume 5 da Série Escola Piloto de Engenharia Química* (Vol. 5). Editora E-papers, 2008.

GARFIELD, E.; WELLJAMS-DOROF, A. Citation data: their use as quantitative indicators for science and technology evaluation and policy-making. *Science and Public Policy*, London, v. 19, n. 5, p. 321-327, 1992.

GUO, G et al. Nutrient removal and biogas upgrading by integrating fungal–microalgal cultivation with anaerobically digested swine wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 2857–2866, 2017.

HERBIG, JW. Talking dirty-effluent and sewage irreverence in South Africa: A conservation crime perspective. *Cogent Social Sciences*, v. 5, n. 1, p. 1701359, 2019.

JUN, L. Y et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 2, p. 102961, 2019.

HERNÁNDEZ-AGUIRRE, O. A. et al. Evaluación del tratamiento de aguas de matadero a través del uso de un lecho fijo de PVC-g-Ácido Acrílico inoculado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Afinidad*, v. 77, n. 590, 2020.

LI, N. J. et al. Soluble microbial products from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as the bioflocculant for municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 780, 146662, 2021.

MANNAN, S et al. Use of fungi to improve bioconversion of activated sludge. *Water Research*, 39(13), 2935–2943, 2005.

MORAIS, R. R et al. Immobilization of α -amylase onto *luffa operculata* fibers. *Enzyme Research*, 2013.

NOGUEIRA, V et al. Biological treatment with fungi of olive mill wastewater pre-treated by photocatalytic oxidation with nanomaterials. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 234–242, 2015.

SHON, H. K. et al. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Critical reviews in environmental science and technology*, v. 36, n. 4, p. 327-374, 2006.

SIERRA-SOLACHE, R.E. et al. Water recovery from textile wastewater treatment by encapsulated cells of *Phanerochaete chrysosporium* and ultrafiltration system. *Biologia*, 75(10), 1717–1729, 2020.

SIERRA-SOLACHE, R.E. et al. Application of immobilized fungi on food effluent treatment using airlift reactor. *Desalination and Water Treatment*, 57(27), 12743–12754, 2016.

SINGH, H. Mycoremediation: fungal bioremediation. Wiley Interscience, New York, NY, USA John Wiley & Sons, 2006.

SRINUANPAN, S. et al. A rapid method for harvesting and immobilization of oleaginous microalgae using pellet-forming filamentous fungi and the application in phytoremediation of secondary effluent. *International journal of phytoremediation*, v. 20, n. 10, p. 1017-1024, 2018.

TANG, W. et al. Decolorization and degradation analysis of Disperse Red 3B by a consortium of the fungus *Aspergillus* sp. XJ-2 and the microalgae *Chlorella sorokiniana* XJK. *RSC advances*, v. 9, n. 25, p. 14558-14566, 2019.

WANG, L. et al. In-situ growth of graphene on carbon fibers for enhanced cell immobilization and xylitol fermentation. *Applied Surface Science*, 527, 146793, 2020.

WANG, X. Isolation of a highly efficient phenol-degrading fungus and the preparation of an effective microbial inoculum for activated sludge and its enhancement for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(30), 16004–16014, 2019.

WU, H. et al. An empirical study of the assessment of green development in Beijing, China: Considering resource depletion, environmental damage and ecological benefits simultaneously. *Sustainability*, v. 10, n. 3, p. 719, 2018.

CAPÍTULO 2

POTENCIAL DE FUNGOS IMOBILIZADOS EM ESPUMAS COMERCIAIS DE POLIURETANO SOBRE A REMOÇÃO DE FÓSFORO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS

RESUMO

A fosfatase (EC 3.1.3.2), enzima que transforma o fósforo orgânico em fósforo inorgânico por meio de hidrólise com a formação do ortofosfato, está envolvida em processos biotecnológicos, incluindo a biorremediação de efluentes domésticos e industriais. Neste trabalho o objetivo foi avaliar o potencial de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Talaromyces pinophilus* e *Trichoderma asperellum* aprisionadas em espumas de poliuretano para remover fósforo de efluentes domésticos. Os isolados fúngicos foram inoculados no meio Pikovskaya para análise qualitativa da atividade fosfatase. Em seguida foi utilizado o meio de cultura mínimo contendo potássio (1g a 4g L⁻¹) para induzir a produção de fosfatase. Então, a biomassa fúngica foi

inoculada em meio mínimo contendo 5g de paralelepípedos ($0,71 \text{ mm}^3$) de espumas comerciais de poliuretano. Os micro-organismos cresceram por 12 dias e durante esse período, os fungos aprisionados nas espumas foram monitorados pela cor característica de cada fungo, seguido pela medida de atividade de fosfatase ácida com *p*-nitrofenil fosfato. Foi construído um planejamento fatorial 2^2 para verificar a influência do tempo de imobilização (Ti) e oferta de espuma (E) sobre a produção de fosfatase pelos fungos. Posteriormente, um novo planejamento fatorial 3^2 foi construído para avaliar simultaneamente os efeitos do tempo de reação e do volume de efluente doméstico. Somente *T. pinophilus*. e *A. niger* foram capazes de solubilizar o fosfato tricálcico no meio Pikovskaya, no entanto, a indução de produção de fosfatase ocorreu com fosfato de potássio a 4 gL^{-1} para *A. flavus*, *T. pinophilus* e *T. asperellum* e a 1 gL^{-1} para *A. niger*. Todos os fungos produziram fosfatase após aprisionamento em espumas de poliuretano, sendo *A. niger* por 12 dias, seguido por *T. asperellum* por 11 dias e *A. flavus* e *T. asperellum* por 7 dias. Os isolados *A. niger* e *A. flavus* apresentaram maior atividade de fosfatase ($229 \text{ } \mu\text{mol/h}$), depois de 192 e 96 h, respectivamente. *T. pinophilus* e *T. asperellum* apresentaram atividade enzimática (AE) mais elevada após 72 h, com $37,7$ e $78 \text{ } \mu\text{mol/h}$ *T. asperellum* *T. pinophilus*, respectivamente. O planejamento composto central rotacional foi aplicado para otimizar o volume da oferta do sistema imobilizado e o período de imobilização para melhor resposta da atividade enzimática. As duas variáveis independentes foram fatores significativos ($p < 0,05$) para a produção de fosfatases, sendo que a máxima atividade de fosfatase foi obtida com 96 h de imobilização e 9 paralelepípedos de espuma para *A. flavus*, 72 h de imobilização e 12 paralelepípedos de espuma para *T. pinophilus* e *T. asperellum*, e 72 h e 15 paralelepípedos de espuma para *A. niger*. O modelo matemático apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,938 para *A. flavus*; 0,867 para *A. niger*; 0,997 para *T. pinophilus*. e 0,955 para *T. asperellum*. O sistema imobilizado de *A. flavus*, *A. niger*, e *T. asperellum* foi capaz de remover 99,9% do fósforo em 1h10m; e de *T. pinophilus*., 99,9% do fósforo em 2 h após a incubação com o efluente doméstico. Todos os isolados fúngicos são biorremediadores potenciais de fósforo em efluentes domésticos.

Palavras-chave: Imobilização de células, micodegradação, micorremediação.

ABSTRACT

Phosphatase (EC 3.1.3.2), an enzyme that transforms organic phosphorus into inorganic phosphorus by hydrolysis, forming orthophosphate (PO₄), is involved in biotechnological processes, including the bioremediation of domestic and industrial effluents. In this work the objective was to evaluate the potential of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Talaromyces pinophilus*. and *Trichoderma asperellum* trapped in polyurethane foams to remove phosphorus from domestic effluents. The fungal isolates were inoculated on Pikovskaya culture medium for qualitative analysis of phosphatase activity. Then the minimal culture medium containing potassium ranging from 1g L⁻¹ to 4g L⁻¹ was used to induce phosphatase production. Then, the biomass of *A. flavus*, *A. niger*, *T. pinophilus*. and *T. asperellum* was inoculated in minimal medium containing 5,0 g parallelepipeds of commercial polyurethane foam (0.71 mm³) previously autoclaved. The entrapment immobilization process was monitored for each fungus and the acid phosphatase activity was tested with p-nitrophenyl phosphate. A factorial design 2² was constructed to verify the influence of immobilization time and foam supply on phosphatase production by the fungi. Subsequently, a new factorial design 3² was constructed to simultaneously evaluate the effects of reaction time and volume of domestic wastewater.

Only *T. pinophilus* and *A. niger* were able to solubilize tricalcium phosphate in Pikovskaya medium, however the induction of phosphatase production occurred with potassium phosphate at 4 gL⁻¹ for *A. flavus*, *T. pinophilus* and *T. asperellum* and 1 gL⁻¹ for *A. niger*. All fungi produced phosphatase in the immobilized system, being *A. niger* for 12 days, followed by *T. asperellum* for 11 days and *A. flavus* and *T. asperellum* for 7 days. The isolates *A. niger* and *A. flavus* showed higher phosphatase activity (229 µmol/h) after 192 h and 96 h, respectively. *T. pinophilus* and *T. asperellum* showed higher enzymatic activity after 72 h, with 37.7 µmol/h and 78 µmol/h respectively. Central composite rotational planning was applied to optimize the volume of supply of the immobilized system and the period of immobilization for better response of enzymatic activity. The two independent variables were significant factors ($p < 0.05$) for the production of phosphatase, and the maximum phosphatase activity was obtained with 96 h of immobilization and 9 foam cobbles for *A. flavus*, 72 h of immobilization and 12 foam cobblestones for *T. pinophilus* and *T. asperellum*, and 72 h and 15 foam cobblestones for *A. niger*. The mathematical model presented a coefficient of determination (R^2) of 0.938 for *A. flavus*; 0.867 for *A. niger*; 0.997 for *T. pinophilus* and 0.955 for *T. asperellum*. The immobilized system of *A. flavus*, *A. niger*, and *T. asperellum* were able to remove 99.9% of phosphorus in 1h10m and *T. pinophilus*, 99.9% of the phosphorus in 2 h after incubation with the domestic effluent. All fungal isolates are potential bioremediators of phosphorus in domestic effluent.

Keywords: Cell immobilization, mycodegradation, mycoremediation.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes atividades humanas geram resíduos que contaminam o ambiente e desequilibram os ecossistemas. Nos ambientes aquáticos, a poluição gerada pelo esgoto doméstico está diretamente associada à eutrofização nos cursos d'água (PREISNER et al., 2020). A eutrofização acarreta alterações de parâmetros da água importantes para o abastecimento (p. ex. claridade, odor e sabor da água), produz consequências negativas para a saúde e bem-estar da população, além de modificar a composição da biodiversidade, estrutura trófica, ciclos biogeoquímicos e promove a floração de algas, macrófitas e cianobactérias, com espécies potencialmente tóxicas (LE MOAL et al., 2019). O fósforo é o principal componente responsável pela eutrofização dos corpos hídricos (LI et al., 2013), e isto pode prejudicar a saúde humana, pois o crescimento dessas espécies libera muitas toxinas (BRASIL, 2005).

O fósforo presente nos efluentes tem origem de diversas fontes orgânicas, como materiais fecais, detergentes sintéticos, produtos de limpeza doméstica e usos industriais, institucionais e comerciais (BALI; GUEDDARI, 2019). A legislação brasileira tem exigido baixos níveis de fósforo para o lançamento dos efluentes nos corpos d'água. A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 357 de 16 de março de 2005 estabelece que os níveis de fósforo adequados para descarte sejam de: “até 0,030 mg/L, em ambientes lênticos;

e até 0,050 mg/L, em ambientes intermediários, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico” (BRASIL, 2005).

Métodos físicos, biológicos e químicos para remover fósforo de efluentes têm sido desenvolvidos, incluindo precipitação química, adsorção, sistemas de membrana e processos biológicos (MOHAMMED; SHANSHOOL, 2009; LOGANATHAN., 2014; LUO et al., 2016; HULTBERG et al., 2017; PENG et al., 2018). Porém, a remoção biológica do fósforo é econômica, ambientalmente sustentável e permite a recuperação dos recursos do fósforo. Enzimas fosfatases produzidas por fungos são soluções biotecnológicas eficientes para remover o fósforo de águas efetivamente (YE et al., 2015) podendo remediar efluentes domésticos, industriais e nucleares (ANUPAMA et al., 2012). A fosfatase (EC 3.1.3.2) transforma o fósforo orgânico em fósforo inorgânico por meio da hidrólise, formando o ortofosfato (PO_4) (BALI; GUEDDARI, 2019). Linhagens dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são produtoras de fosfatase, conhecidas por remover fósforo eficientemente de águas residuais (KAPRI; TEWARI, 2010; NARENDRAN et al., 2019).

A catálise enzimática pode ser otimizada com métodos simples de imobilização celular em diferentes matrizes. A espuma de poliuretano tem sido aplicada como suporte para o crescimento de microrganismos com a finalidade de remover poluentes de águas residuais, incluindo corante, fenóis, redução da demanda química de oxigênio, carbono orgânico, amônia e fósforo (CHU; WANG, 2011; FENG et al., 2012). Fungos imobilizados em espumas de poliuretano são propostos na literatura científica como soluções para gargalos biotecnológicos. Por exemplo, remoção de 100% dos metais pesados com *Aspergillus terreus* (DIAS et al., 2002) e redução de cetonas com os fungos *Diplogelatinospora grovesii* (QUEZADA et al., 2012) e *Monascus kaoliang* (QUEZADA et al., 2009). A aplicação das espumas mostrou-se eficiente na remoção de fósforo no estudo de Guo et al. (2010), que obteve 100% de remoção de fósforo com uso das espumas em 3 horas.

Este trabalho objetivou selecionar isolados fúngicos com potencial para produzir fosfatases e desenvolver um produto capaz de remover fósforo de efluentes domésticos. Para isso, foram testadas técnicas de imobilização celular, utilizando como suporte espumas comerciais de poliuretano por ser um material com alta porosidade, boa resistência mecânica e baixo custo (FENG et al., 2012). Para obter bons resultados de remoção de fósforo de efluentes, foi realizado um planejamento fatorial para investigar a influência da oferta de sistema imobilizado e período sobre a AE. A hipótese deste trabalho é que fungos potencialmente produtores de fosfatases, ancorados em sistema imobilizado, são capazes de remover fósforo de efluentes domésticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Screening* qualitativo da atividade de fosfatase

Para o presente estudo foram utilizados ensaios envolvendo 12 diferentes isolados fúngicos da coleção de culturas de fungos do Laboratório de Micologia Básica, Aplicada e Divulgação Científica (FungiLab) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) – Câmpus Central Sede: Anápolis-GO (Tabela 1). Os isolados fúngicos foram reativados da coleção a partir da inoculação em placas de Petri contendo o meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubação em BOD a 27 °C.

Tabela 1. Isolados fúngicos do Laboratório de Micologia Básica, Aplicada e Divulgação Científica (FungiLab) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) – Câmpus Central Sede: Anápolis-GO utilizados em *Screening* atividade de fosfatase.

Isolado	Espécie
SXS 670	<i>Cunninghamella echinulata</i>
SXS 639	<i>Aspergillus niger</i>
SXS 645	<i>Aspergillus flavus</i>
SXS 672	<i>Talaromyces pinophilus</i>
SXS 671	<i>Trichoderma asperellum</i>
THA 47	Indeterminada
THA 50	Indeterminada
THA 60	Indeterminada
THA 69	Indeterminada
THA 80	Indeterminada
THA 84	Indeterminada

Para a análise enzimática qualitativa da fosfatase, foi avaliada a solubilização de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) em fosfato inorgânico no meio Pikovskaya (PVK) ágar, segundo o método de Pikosvkaya (1948). Um litro de PVK ágar contém (g/L): 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,003 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g Ca_3

(PO_4)₂, 10 g glicose, 0,5 g de extrato de levedura, 15 g de ágar, completado para 1000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min e disposto em placas de Petri esterilizadas (9 cm de diâmetro).

Os isolados fúngicos foram inoculados a partir de discos (5 mm de diâmetro) de cultura miceliada em BDA, os quais foram dispostos no centro das placas de Petri contendo meio PVK ágar, suplementado com 0,5% (p/v) de fosfato tricálcico. O grupo controle foi inoculado em meio BDA. As culturas foram incubadas por 7 dias a 28 °C. Foram testadas três réplicas para cada isolado fúngico. O diâmetro, em centímetros, da zona clara ao redor da colônia de cada isolado foi medido no 1°, 3°, 5° e 7° dia de incubação. O índice de solubilização do fosfato foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{(\text{diâmetro da colônia} + \text{diâmetro da zona clara})}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Onde IS = Índice de solubilização.

2.2 *Screening* quantitativo por fungos com atividade fosfatase

Fungos já conhecidos na literatura científica como bons produtores de fosfatase foram selecionados para esses ensaios e alguns isolados fúngicos não conhecidos para esse fim também foram testados a fim de evidenciar novidade científica para esses microrganismos isolados de solos do Cerrado. Os fungos pré-selecionados da coleção de cultura do FungiLab (Tabela 1) foram inoculados em meio mínimo modificado pH 4,0 (SOUZA et al., 2011). Um litro de meio mínimo modificado contém: 1,0 g a 4,0 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5% (p/v) de glicose e 0,25% (p/v) de extrato de levedura. Dentre os fungos que apresentaram atividade fosfatase no meio mínimo, foi testada também a AE no meio TLE modificado pH 6,5. Um litro de meio TLE modificado contém: 0,3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,5% (p/v) glicose.

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer (100 mL) contendo 50 mL de meio mínimo modificado. Os isolados fúngicos foram inoculados de acordo com o método de Kapri e Tewari (2010), a partir de quatro discos (5 mm diâmetro) de cultura ativa em meio BDA. A incubação foi realizada a 28 °C em uma incubadora *shaker* a 120 rpm por 5 dias. O experimento foi conduzido em triplicata. Uma alíquota de 5 mL foi retirada periodicamente de cada frasco de cultura em 48, 72 e 96 h de incubação. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro Watman nº1.

2.3 Determinação da atividade enzimática

O *screening* de fosfatase no meio de cultura foi determinado usando substrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) a 5 mM, sendo 10 μ L de solução enzimática, 20 μ L de solução p-NPP e 100 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 em banho maria a 37 °C. Depois de 15 min, a reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de NaOH 100 mM (LEITÃO et al., 2010). A adição da base desenvolve coloração amarela, característica da presença de p-nitrofenol em meio alcalino. A atividade da fosfatase foi calculada por meio da quantidade de enzima capaz de produzir 1 μ mol de p-nitrofenol por hora, por mililitro de meio líquido. O p-nitrofenol foi quantificado a 405 nm por espectrofotometria (LEITÃO et al., 2010).

2.4 Imobilização de células fúngicas na espuma de poliuretano por aprisionamento e amostragem para determinação da atividade enzimática e remoção de fósforo

Cortes de 2 mm³ de espuma foram usados para obter a média de tamanho dos poros em microscópio eletrônico de varredura (MEV). A marca e modelo das espumas obtidas foram Ortobom, densidade 20, sem ser selada e Prorelax, densidade 28 e 33, seladas. Foram testadas espumas de porosidade média igual a 0,71, 0,63 e 0,25 mm de diâmetro, segundo a microscopia eletrônica de varredura. A espuma comercial foi cortada na forma de paralelepípedo de 1,0 x 1,0 x 0,7 cm (QUEZADA et al., 2012). Então, 0,5 g de espuma e 50 mL de cultura de meio mínimo, com KH₂PO₄ na concentração de 1,0 g foram esterilizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL a 121 °C em 1 atm por 15 min. Em seguida as biomassas foram inoculadas a partir de quatro discos (5 mm diâmetro) de cultura ativa em meio BDA dos fungos *A. flavus*, *A. niger*, *T. pinophilus* e *T. asperellum*. As culturas foram incubadas em um agitador tipo shaker 200 rpm a 28 °C, por 14 dias. Durante esse período, os blocos de espuma foram tornando-se esverdeados nas culturas de *A. flavus*, *T. asperellum*, *T. pinophilus* e pretas para *A. niger*.

A partir da incubação, ao longo de 15 dias, foram coletadas amostras para determinação da atividade enzimática, conforme planejamento fatorial descrito no item 4.6. A cada amostragem, o conteúdo dos frascos foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, centrifugado durante 15 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram cobertas e enxaguadas por três vezes usando 20 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH = 4,0). As células do meio de cultura foram cobertas novamente em 20 mL do mesmo tampão e

5 mL de p-NPP a 1mM, e após 15 min de reação enzimática em um agitador rotatório a reação foi paralisada com a adição de 20 mL de NaOH 100mM.

2.5 Planejamento fatorial

Os sistemas imobilizados pelas quatro espécies de fungo foram investigados empregando-se um planejamento composto central rotacional (DCCR). Utilizou-se três níveis para cada fator, sendo que o valor α representa o valor extremo (Tabela 2). Um total de 14 experimentos para cada espécie fúngica foi conduzido de maneira aleatória.

Tabela 2. Valores naturais e codificados assumidos pelos fatores investigados em durante o processo de imobilização de células de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Talaromyces pinophilus* e *Trichoderma asperellum*.

Fatores	Níveis codificados		
	-1	0	1
Tempo	72	96	120
Espuma	6	9	12

Foram utilizados tubos Falcon de 50 mL, preenchidos com os paralelepípedos de espumas, 20 mL de tampão acetato com pH 4,8 e 5 mL de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) a 5 mM. As amostras permaneceram em um agitador rotatório a 30 rpm. Após 15 min, os blocos de espuma foram removidos e a reação foi interrompida com 20 mL de NaOH a 0,1 mM e a absorbância foi lida a 405 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

A análise de variância e a análise de regressão múltipla pelo método dos mínimos quadrados foram utilizadas para a obtenção de modelos polinomiais de segunda ordem ajustadas aos resultados. Para as análises foi utilizado o software STATISTICA 7.0.

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{12}X_1X_2$$

Em que Y representa as respostas previstas, β_0 é uma constante, β_1 , β_2 , e β_3 são os coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} , e β_{33} são os coeficientes quadráticos, e β_{12} é o coeficiente de interação. X_1 , X_2 são as variáveis independentes codificadas. Para todos os modelos, após a análise estatística os efeitos não significativos ($p > 0,05$) foram desconsiderados e os coeficientes recalculados.

2.6 Tratamento do efluente doméstico

2.6.1 Coleta do efluente

O efluente doméstico utilizado no experimento foi obtido na ETE Dr. Hélio Seixo de Brito (ETE Goiânia), localizado na cidade de Goiânia, capital do estado de Goiás, Brasil (Figura 1). A ETE é responsável pela coleta e tratamento de 61% do esgoto produzido na cidade. Atualmente, opera com uma vazão máxima de 2799 L/s, a média de 1410 L/s e a mínima de 494 L/s. O efluente tratado é liberado posteriormente no rio Meia Ponte, pertencente à bacia do rio Paranaíba. Na ETE são tratados, além de parte do esgoto doméstico gerado pela cidade, material lixiviado de aterro sanitário e os resíduos de fossas e tanques sépticos (RFTS) da região metropolitana.

Foram coletados 2 L de amostra de efluente na ETE, à jusante e à montante, em recipientes de vidro, na cor âmbar, em triplicatas em cada ponto. Todas as amostras foram armazenadas à temperatura ≤ -80 °C, por um período máximo de 28 dias até a análise, conforme recomendado por Severiche et al. (2013).

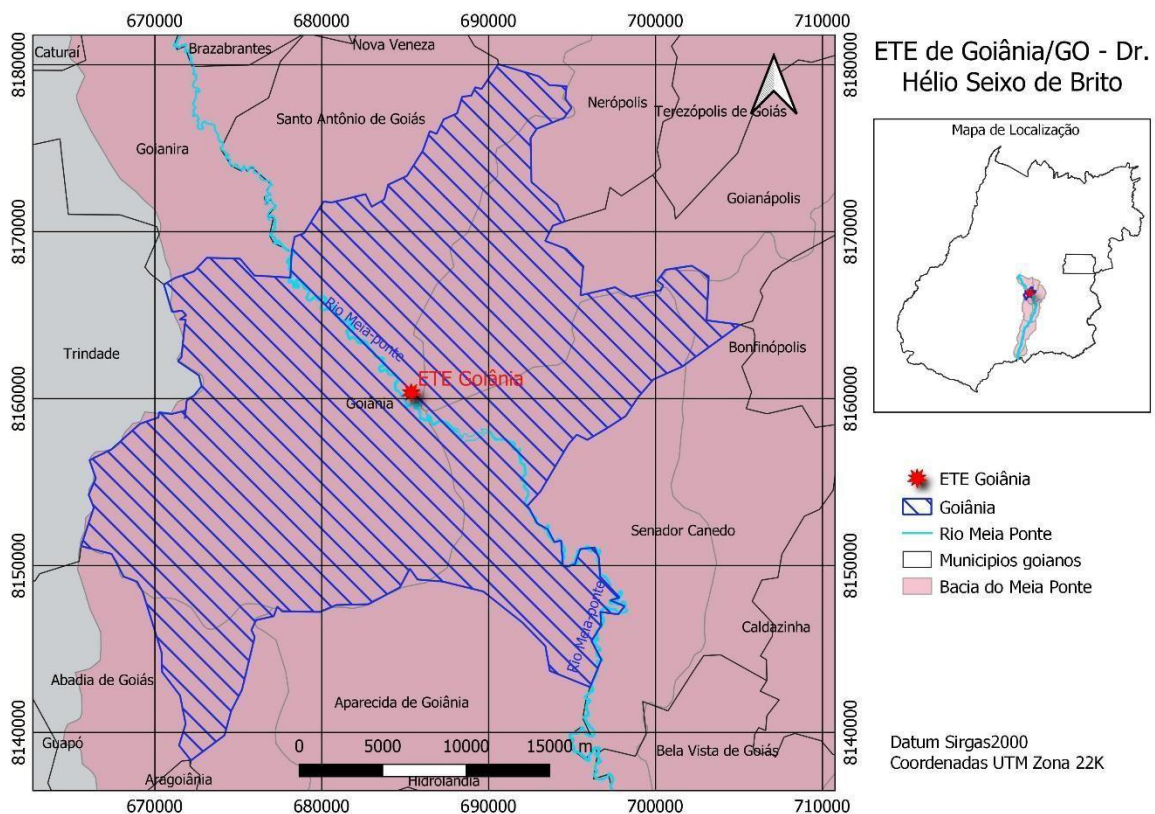


Figura 1. Localização da ETE Dr. Hélio Seixo de Britto (ETE Goiânia), com Rio Meia Ponte, sua bacia e municípios vizinhos. Precisa mencionar na figura menor que se trata do estado de Goiás. *Fonte: Rodrigo da Costa Andrade (2022).*

2.6.2 Efeito do sistema imobilizado sobre a remoção de fósforo de efluentes domésticos

A remoção de fósforo de amostras de efluentes pelos sistemas imobilizados pelas quatro espécies de fungo foram investigados empregando-se um planejamento composto central rotacional (DCCR). Utilizou-se cinco níveis para cada fator, sendo que o valor α representa o valor extremo. Um total de 13 experimentos para cada espécie fúngica foi conduzido de maneira aleatória (Tabela 3).

Após o período de imobilização, o sistema imobilizado foi transferido para tubos tipo Falcon de 50 mL, e a quantidade de cubos foi conduzida de acordo com os resultados obtidos da otimização da OE no item 4.5. Os tubos contendo o sistema imobilizado foi centrifugado durante 15 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram cobertas e enxaguadas por três vezes usando 20 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH = 4,8). Durante o tempo de reação, os tubos permaneceram em agitador rotatório a 30 rpm. As amostras de efluentes não foram esterilizadas porque a esterilização em larga quantidade de efluentes em aplicação real não é economicamente viável (YE et al., 2015). O controle foi conduzido com a adição dos blocos de espuma em efluente sem células fúngicas aprisionadas, autoclavado previamente conforme descrito no item 4.4.

Tabela 3. Valores naturais e codificados assumidos pelos fatores investigados em durante o processo de incubação de células de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Talaromyces pinophilus* e *Trichoderma asperellum* em amostras de efluentes.

Fatores	Níveis codificados				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Volume de efluente	0,86	5	15	25	29,14
Tempo de reação	1:10	2	5	6	6:50

O teor de fósforo foi determinado antes e após o tratamento segundo o método de Murphy e Riley (1962). Para isso, foi preparado o reagente combinado, composto por 20 g de

molibdato de amônio, dissolvido em 500 mL de água destilada; 0,2743g de tartarato de antimônio e potássio, dissolvido em 100 mL de água destilada; 70 mL de ácido sulfúrico diluído em 500 mL de água destilada e 1,32g de ácido ascórbico dissolvido em 75 mL de água destilada. Em seguida, foram misturados 125 mL da solução de ácido sulfúrico, 37,5 mL da solução de molibdato de amônio, 75 mL da solução de ácido ascórbico e 12,5 mL da solução de tartarato de antimônio potássio. Posteriormente, foram transferidos 40 mL de amostra de efluente para um balão volumétrico de 50 mL e, em seguida, foram adicionados 8 mL do reagente combinado. Após 10 min a 25 °C a absorbância foi lida a 880 nm.

O controle foi conduzido com amostras de efluente e blocos de espuma sem o isolado fúngico imobilizado, e autoclavado previamente conforme o item 4.4. Os ensaios para a modelagem para produção enzimática no sistema imobilizado e remoção de fósforo de efluentes foram realizados randomicamente, com duplo-cego, sendo um pesquisador responsável pela inoculação das biomassas fúngicas e outro responsável pela realização de ensaios, sem conhecimento do conteúdo das amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *Screening* qualitativo de fosfatase

Foram testados 12 isolados fúngicos da coleção de culturas do FungiLab: *Cunninghamella echinulata*, sv1 -zi, tha 47, tha 50, 60, 69, 80, 84, *A. niger*, *A. flavus*, *T. pinophilus*. e *T. asperellum*. Somente *T. pinophilus*. e *A. niger* foram capazes de solubilizar o fosfato tricálcico, que foi observado por meio da zona clara formada ao redor da colônia, a partir do segundo dia após a inoculação. O índice enzimático mais alto foi observado por *T. pinophilus* (2,5) (Figura 2a), seguido por *A. niger* (2,4) (Figura 2b).

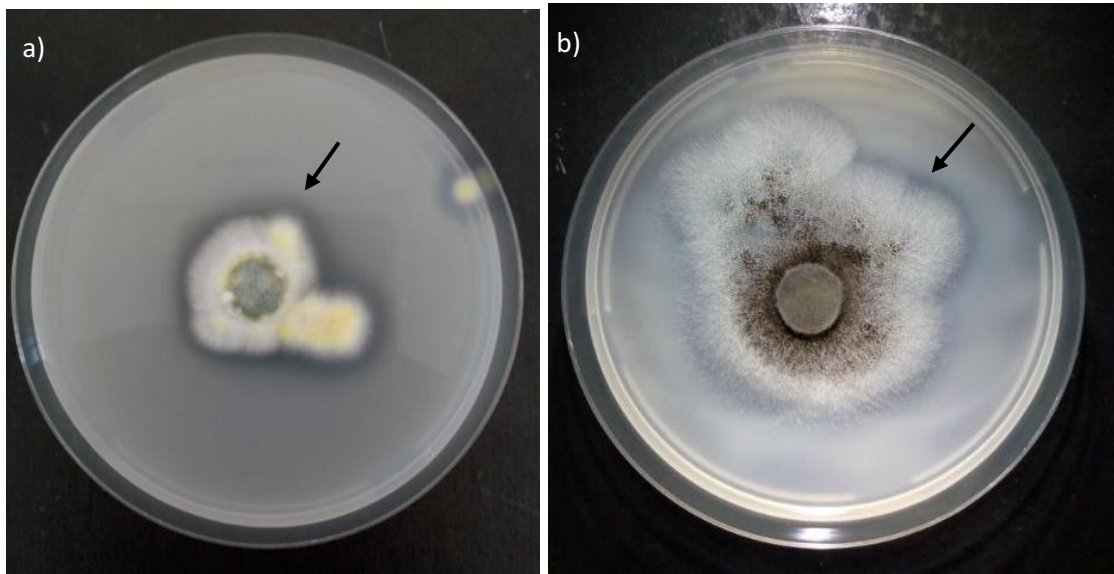


Figura 2. Zona clara em meio Pikovskaya, indicado pela seta, por *Talaromyces pinophilus*.(a) e *Aspergillus niger* (b).

3.2 Screening quantitativo de fosfatase

No intervalo de 48 h foi verificada baixa atividade enzimática para todos os isolados. *Trichoderma asperellum* apresentou maior atividade enzimática (29,58 $\mu\text{mol/h}$) com menor concentração de KH_2PO_4 (1,0 gL^{-1}) e no intervalo de 96 h (Tabela 4). Com o aumento da concentração ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 4,0 \text{ gL}^{-1}$), a máxima atividade para este isolado foi no intervalo de 72 h (20,66 $\mu\text{mol/h}$) e decaiu em 96 hs (11,03 $\mu\text{mol/h}$), como descrito por Kapri e Tewari (2010) (Tabela 4).

Para *A. flavus*, reduzir a concentração do indutor no meio de cultura (de 4,0 gL^{-1} para 1,0 gL^{-1}) fez com que a atividade enzimática diminuísse demasiadamente, de 3,24; 21,01 e 24,27 para 0; 5,22 e 1,33 $\mu\text{mol/h}$ nos períodos de 48, 72 e 93 h, respectivamente (Tabela 4). Alguns trabalhos relatam a inibição de fosfatases por fósforo, explicando que quando a oferta de fósforo é aumentada, a fosfatase é inibida (SHIEH et al., 1969; OLANDER; VITOUSEK, 2000). Neste trabalho, o aumento da oferta de fósforo induziu a maior atividade enzimática para os isolados *T. pinophilus*. (20,38 $\mu\text{mol/h}$) e *A. flavus* (24,27 $\mu\text{mol/h}$) após 96 h de incubação

(Tabela 4). O sobrenadante do meio TLE não apresentou atividade de fosfatase para nenhum isolado, exceto para *T. asperellum*, com valores baixos comparados ao efeito do crescimento no meio mínimo (5,93; 11,74; 1,61 $\mu\text{mol/h}$ em 48, 72 e 96h).

Tabela 4. Efeito do período de cultivo sobre a produção de fosfatase ácida.

fúngico	Meio de inoculação	<i>p</i> -Nitrofenol em $\mu\text{mol/h}$ Isolado		
		48 h	72 h	96 h
<i>Aspergillus flavus</i>	MM - KH_2PO_4 - 4,0 gL^{-1}	3,24	21,01	24,27
	MM - KH_2PO_4 - 1,0 gL^{-1}	0	5,22	1,33
	TLE	0	0	1
<i>Aspergillus niger</i>	MM - KH_2PO_4 - 4,0 gL^{-1}	0	0	0
	MM - KH_2PO_4 - 1,0 gL^{-1}	2,96	2,68	0
	TLE	0	0	0
<i>Talaromyces pinophilus</i>	MM - KH_2PO_4 - 4,0 gL^{-1}	3,1	2,25	20,38
	MM - KH_2PO_4 - 1,0 gL^{-1}	3,53	2,61	17,12
	TLE	0	0	0
<i>Trichoderma asperellum</i>	MM - KH_2PO_4 - 4,0 gL^{-1}	1,68	20,66	11,03
	MM - KH_2PO_4 - 1,0 gL^{-1}	1,83	13,08	29,58
	TLE	5,93	11,74	1,61

*Meio mínimo (MM)

3.3 Imobilização de células fúngicas em espuma de poliuretano

Todos os isolados fúngicos cresceram somente em espuma de poliuretano com porosidade média de $0,71 \text{ mm}^3$, da marca Ortobom, não selada (Figura 3). Em espumas de porosidade média igual a $0,63$ e $0,25 \text{ mm}^3$ de diâmetro, a mudança de coloração indicando o crescimento visual das células fúngicas não foi observado. Resultados descritos por Haapala et al. (1994) corroboram com este trabalho, pois a AE por células de *T. asperellum* imobilizadas em espumas foi obtida em suporte de maior porosidade.

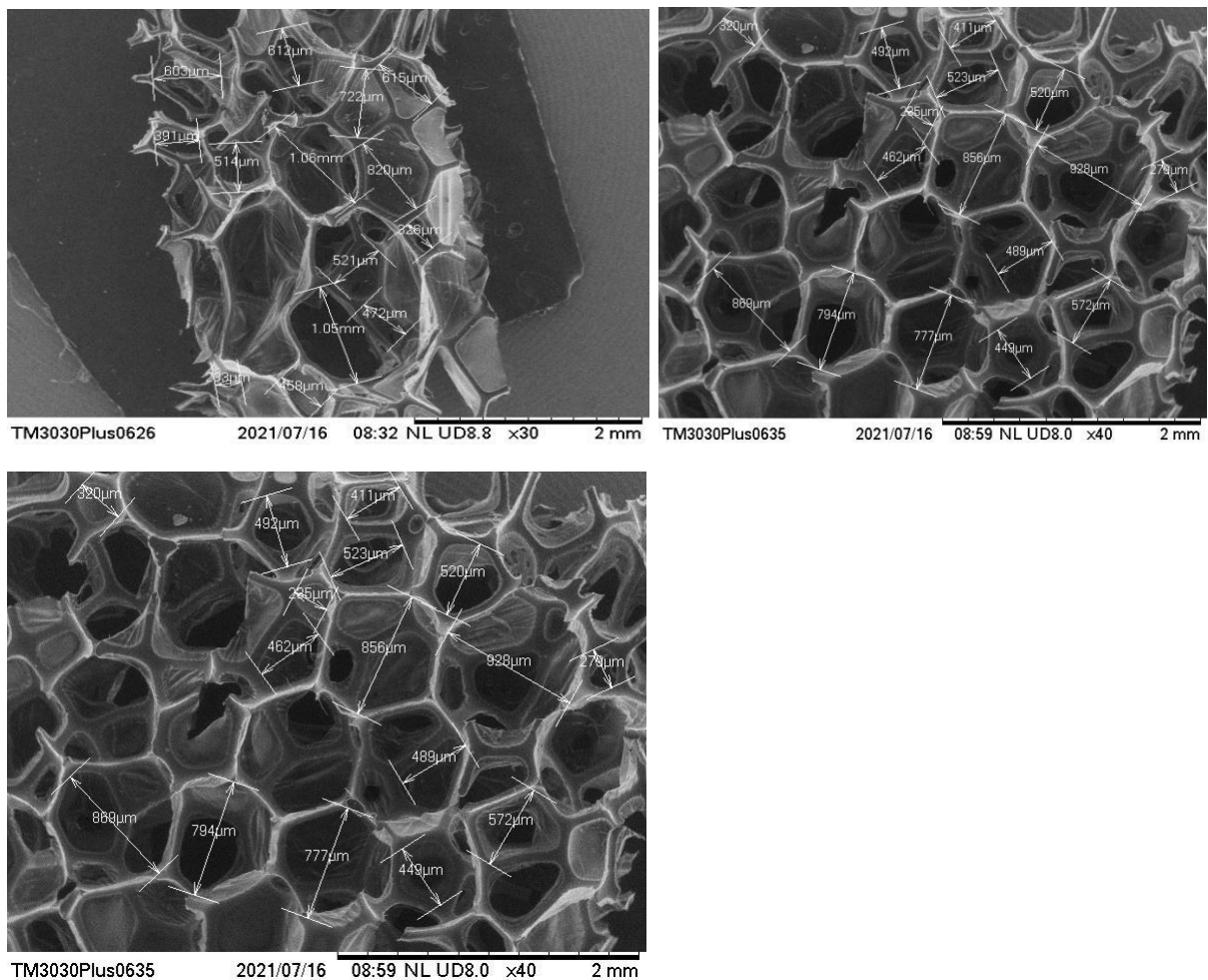


Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura apresentando as medidas de diâmetro dos poros de espuma comercial de poliuretano a) Porosidade média de $0,71 \text{ mm}^3$; b) $0,63 \text{ mm}^3$; c) $0,25 \text{ mm}^3$.

Após 48 h já é possível visualizar a mudança de cor nos blocos de espuma, indicando o crescimento fúngico no interior da matriz polimérica. A fotografia foi obtida após 96 h porque o crescimento do fungo na matriz torna-se visualmente mais evidente (Figura 4). Os isolados *T. pinophilus* e *A. flavus* produziram fosfatase durante 7 dias, a partir de 48 h. *A. niger* e *A. flavus* apresentaram maior atividade de fosfatase ácida ($229 \mu\text{mol/h}$), nos períodos de 192 e 96 h,

respectivamente (Figura 5). Esses resultados são semelhantes àqueles observados por Aleksieva et al. (2003) para o fungo *Humicola lutea*, que produziu fosfatase ácida durante 12 dias com máxima atividade foi de 230 $\mu\text{mol/h}$. *T. pinophilus* e *T. asperellum* apresentaram atividade mais alta no período de 72 h, sendo *T. pinophilus* (36,72 $\mu\text{mol/h}$) e *T. asperellum* (78,07 $\mu\text{mol/h}$) (Figura 5).

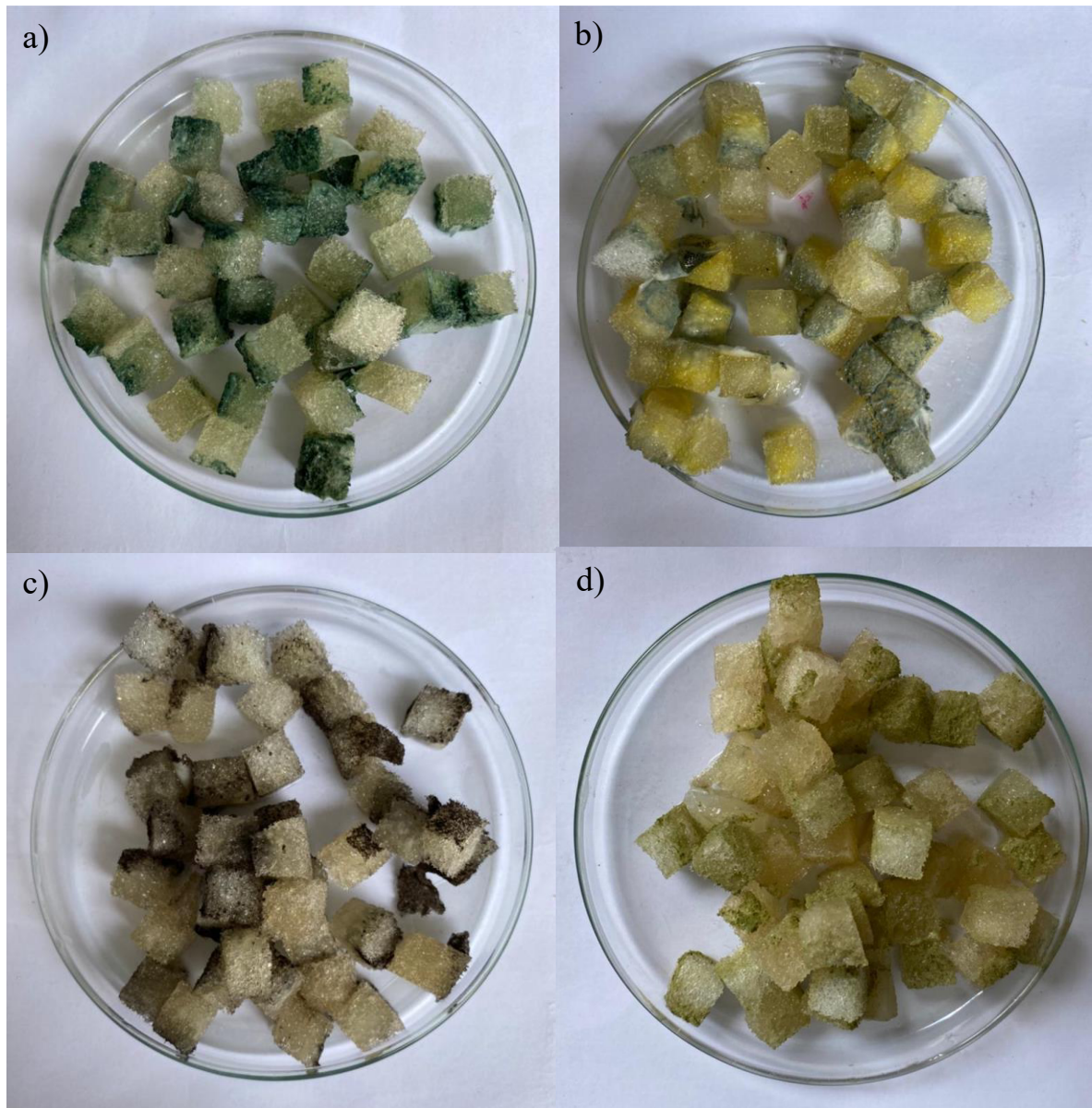


Figura 4. Sistema de imobilização do micélio fúngico em blocos de espuma de poliuretano, a 96 h de cultivo. a) *Trichoderma asperellum*, b) *Talaromyces pinophilus*. c) *Aspergillus niger* e d) *Aspergillus flavus*.

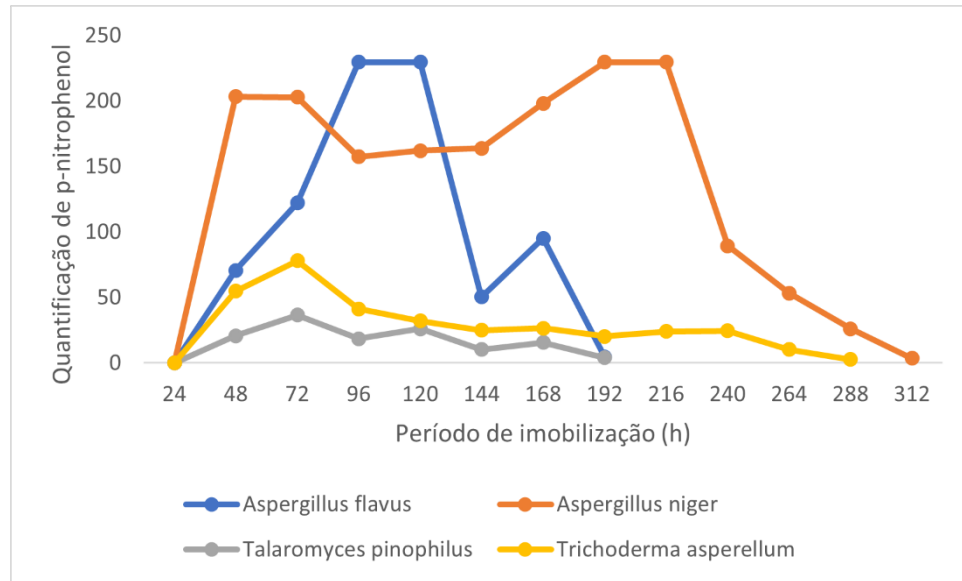


Figura 5. Efeito do tempo de imobilização sobre a atividade enzimática de fosfatase ($\mu\text{mol/h}$ de p-nitrofenol) por biomassa fúngica imobilizada em espuma comercial de poliuretano.

3.4 Otimização do sistema imobilizado empregando desenho fatorial composto central rotacional (DCCR)

3.4.1 *Aspergillus flavus*

Para o isolado de *A. flavus*, os efeitos das variáveis Ti e a OF foram fatores significativos para a AE ($p < 0,05$) (Tabela 5). O resultado do planejamento fatorial apontou que o período entre 90 e 120 h de imobilização celular e a oferta de 9 blocos de espuma promoveu maior AE (Figura 6). O modelo obtido para este planejamento apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,938 e R^2_{ajustado} de 0,910.

Tabela 5. Efeito estimado das variáveis usadas no design rotacional composto central para otimização da produção de fosfatase produzida por *Aspergillus flavus* em sistema imobilizado de células aprisionadas em espuma de poliuretano.

Efeito	Efeito estimado	p
Média	1,429	<0,001
Tempo (L)	-0,366	0,002
Tempo (Q)	0,164	0,025
Oferta de espuma (L)	0,324	0,004
Oferta de espuma (Q)	0,478	<0,001

*Linear (L); Quadrático (Q).

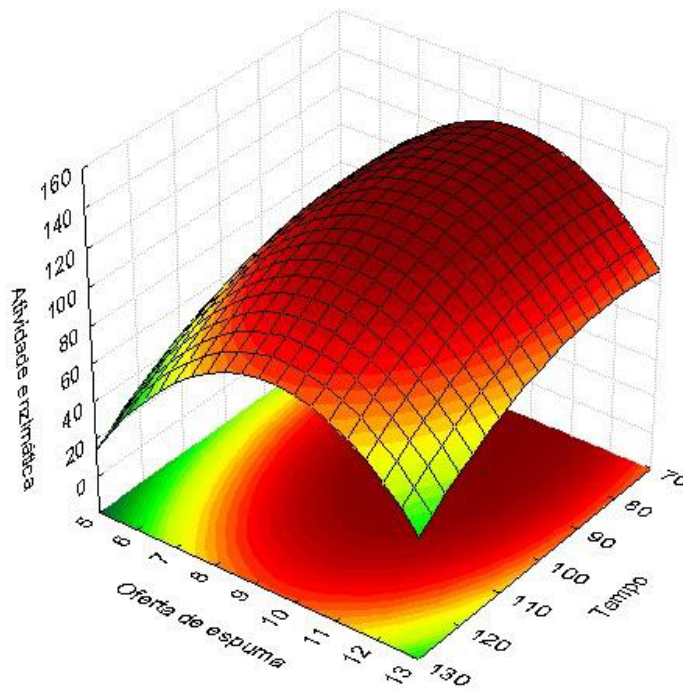


Figura 6. Superfície de resposta da atividade de fosfatase máxima ($\mu\text{mol/h}$ de p-nitrofenol) em função da variação da oferta de espuma de poliuretano (und. de blocos) e tempo de imobilização celular (h) para *Aspergillus flavus*.

3.4.2 *Aspergillus niger*

Para o isolado de *A. niger*, a OE não apresentou efeito significativo sobre a produção de fosfatase ($p > 0,05$). Já o TI foi significativo ($p < 0,05$) (Tabela 6). O período ótimo de imobilização para maior produção enzimática é 72 h (Figura 7). Os resultados indicaram que o aumento da AE é obtido com o aumento da OE, em torno de 15 paralelepípedos (Figura 5-b). O modelo obtido para este planejamento apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,867 e R^2 ajustado de 0,842.

Tabela 6. Efeito estimado das variáveis usadas no design rotacional composto central para otimização da produção de fosfatase produzida por *Aspergillus niger* em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano.

Efeito	Efeito estimado	p
Média	2,103	<0,001
Tempo (L)	-1,012	<0,001
Oferta de espuma (L)	0,328	0,074

*Linear (L); Quadrático (Q).

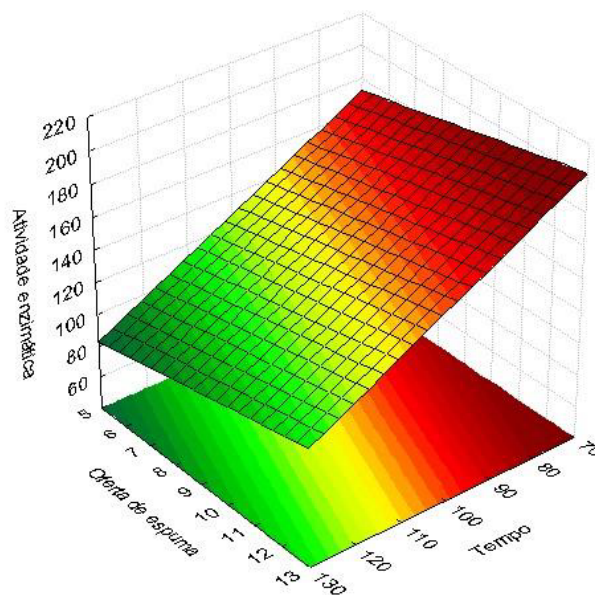


Figura 7. Superfície de resposta da atividade de fosfatase máxima ($\mu\text{mol/h}$ de p-nitrofenol) em função da variação da oferta de espuma de poliuretano (und. de blocos) e tempo de imobilização celular (h) para *Aspergillus niger*.

3.4.3 *Talaromyces pinophilus*

Para o isolado de *T. pinophilus* o efeito do TI e OE, foram significativas para a produção de fosfatases ($p < 0,05$) (Tabela 7). O período ótimo de imobilização foi 72 h e a oferta de 12 paralelepípedos de espumas para a produção enzimática (Figura 8). O modelo obtido para este planejamento apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,997 e R^2_{ajustado} de 0,994.

Tabela 7. Efeito estimado das variáveis usadas no design rotacional composto central para otimização da produção de fosfatase produzida por *Talaromyces pinophilus*. em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano.

Efeito	Efeito estimado	p
Média	0,993	<0,001
Tempo (L)	-1,495	<0,001
Tempo (Q)	-0,560	<0,001
Oferta de espuma (L)	0,145	0,007
Oferta de espuma (Q)	0,133	0,001

*Linear (L); Quadrático (Q).

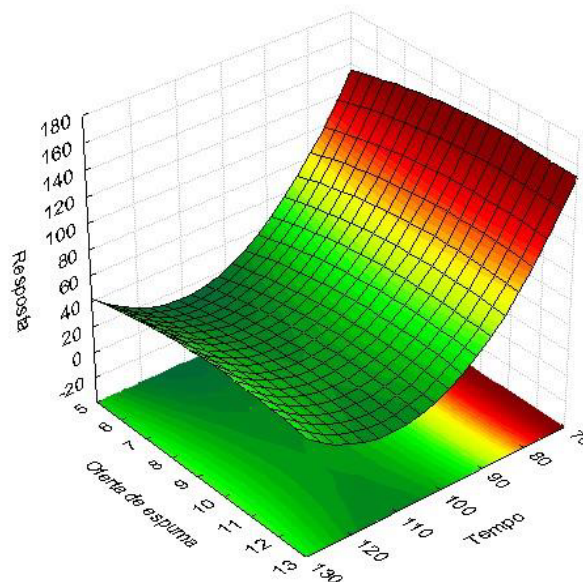


Figura 8. Superfície de resposta da atividade de fosfatase máxima ($\mu\text{mol/h}$ de p-nitrofenol) em função da variação da oferta de espuma de poliuretano (und. de blocos) e tempo de imobilização celular (h) para *Talaromyces pinophilus*.

3.4.4 *Trichoderma asperellum*

Para o isolado de *T. asperellum*, o TI e a OE foram significativos para produção de fosfatases ($p < 0,05$) (Tabela 8). O resultado do planejamento fatorial apontou que o TI de 72 h e a OE entre 12 e 13 blocos promoveram maior AE (Figura 9). O modelo obtido para este planejamento apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,955 e R^2_{ajustado} de 0,941.

Tabela 8. Efeito estimado das variáveis usadas no planejamento rotacional composto central para otimização da produção de fosfatase produzida por *Trichoderma asperellum* em sistema imobilizado de células aprisionadas em espumas de poliuretano.

Efeito	Efeito estimado	p
Média	0,483	<0,001
Tempo (L)	-0483	<0,001
Tempo (Q)	-0,337	<0,001
Oferta de espuma (L)	0,230	0,006

*Linear (L); Quadrático (Q).

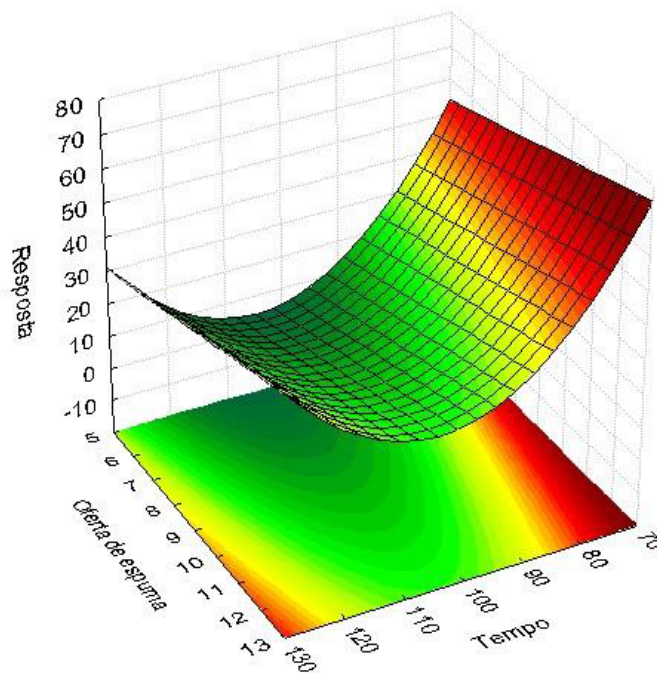


Figura 9. Superfície de resposta da atividade de fosfatase máxima ($\mu\text{mol/h}$ de p-nitrofenol) em função da variação da oferta de espuma de poliuretano (und. de blocos) e tempo de imobilização celular (h) para *Trichoderma asperellum*.

Os resultados do modelo de planejamento fatorial para os fungos *A. niger*, *T. pinophilus*, *T. asperellum* são semelhantes aos resultados descritos por Aleksieva et al. (2003), em que foi verificado, para o fungo *Humicola lutea*, que o aumento da OE aumentou a produção de fosfatase ácida. Skowronek et al. (2011) também descreveram a imobilização de *A. niger* em discos de espumas de poliuretano, porém, para investigar outra enzima, inulinase. A influência do TI sobre a AE foram testados e o melhor TI foi em 96h, um pouco diferente dos resultados obtidos para o mesmo fungo neste trabalho (72h).

3.5 Otimização do processo da remoção de fósforo empregando planejamento fatorial composto central rotacional (DCCR)

Não foram encontrados valores significativos para *A. flavus*, *A. niger* e *T. asperellum*. Para *A. flavus*, o modelo obtido para este planejamento apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,46 e $R^2_{ajustado}$ de 0,08, para *A. niger*, (R^2) de 0,55 e $R^2_{ajustado}$ de 0,23 e para *T. asperellum*, (R^2) de 0,29 e $R^2_{ajustado}$ de 0,23.

Para *T. pinophilus*, apenas o TI foi significativo ($p < 0,05$). O modelo obtido para este planejamento apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,76 e $R^2_{ajustado}$ de 0,71. É possível que o modelo não foi significativo porque trabalhamos em uma faixa de tempo de reação elevada. Ensaio com intervalos de tempo de reação menores poderiam promover um modelo significativo, como foi proposto por Zeng et al. (2021) e Dalecka et al. (2020).

3.6 Remoção de fósforo de efluentes domésticos

O período de incubação e volume de sistema imobilizado seguiu os melhores resultados de otimização do planejamento fatorial. Os resultados indicaram que todos os fungos selecionados como potencialmente produtores de fosfatases foram capazes de remover eficientemente o fósforo de efluentes domésticos, sem ajustamento do pH. *A. flavus*, *A. niger* e *T. asperellum* foram capazes de remover 99,9% do fósforo em 1h10min e *T. pinophilus*, 99,9% em 2 h de incubação (Tabela 9).

Em outros trabalhos com o objetivos semelhantes, a biomassa de *T. harzianum* CBS 226.95 reduziu 39,5% de fósforo no décimo terceiro dia, de efluentes de cervejaria sintético (HULTBERG; BODIN, 2017). Dalecka et al. (2020) verificaram que *pellets* de *Trametes versicolor* removeram 99,9% de fósforo de efluentes domésticos após 6 h e *Aspergillus luchuensis* após 24 h. Os autores acrescentaram ainda que *T. versicolor* foi capaz de reduzir o teor de fósforo de 2,6 mg/mL para 0,7 mg/mL imediatamente após a incubação. Em outro trabalho, a biomassa de *Mucor circinelloides* removeu 40,1 %, em 5 dias (YE et al., 2015).

O efeito do volume do efluente sobre a remoção de fósforo, variando entre 0,86, e 29,14 mL, mostrou que para todos os isolados fúngicos, os resultados máximos de remoção de fósforo foram com volumes de efluentes variando entre 5 e 25 mL. Dentre esses isolados

fúngicos, *A. niger* apresentou 99,9% de remoção em todos os volumes de efluentes testados (Tabela 10).

Tabela 9. Efeito do tempo de imobilização sobre a remoção de fósforo de efluentes domésticos por fungos imobilizados em espumas comerciais de poliuretano.

.Isolados fúngicos	Período de paralelepípedos do (h)	Quantidade de imobilização sistema imobilizado (Und.)	Período de incubação nas amostras de efluentes (h)	
			1:10	2
<i>Aspergillus flavus</i>	96	9	99,9%	99,9%
<i>Aspergillus niger</i>	72	15	99,9%	99,9%
<i>Talaromyces pinophilus.</i>	72	12	80,00%	99,9%
<i>Trichoderma asperellum</i>	72	12	99,9%	99,9%

Tabela 10. Efeito do volume de efluente doméstico sobre a capacidade de remoção de fósforo por fungos imobilizados em espumas comerciais de poliuretano.

Isolados fúngicos	Volume (mL)				
	0,86	5	15	25	29,14
<i>Aspergillus flavus</i>	89,10%	99,9%	99,9%	99,9%	50,80%
<i>Aspergillus niger</i>	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%
<i>Talaromyces pinophilus.</i>	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	68,60%
<i>Trichoderma asperellum</i>	78,40%	99,9%	99,9%	99,9%	89,30%

Em relação a proporção entre volume de OE e o tratamento do efluente, *A. flavus*, com menor quantidade de paralelepípedos de espuma (9), promoveu o tratamento de grande volume de efluente (25 mL) em pouco tempo de reação (1h10min), exigindo pouca quantidade material suporte e gerando menor volume de resíduos, embora sua desvantagem seja o TI mais prolongado (95h). Em contrapartida, *A. niger* promoveu eficiência em todos os volumes de efluentes testados, em também em pouco tempo de reação (1h10min), apesar de exigir a maior

quantidade de material. Apesar disso, em menor TI (72h) pode ser eficientemente aplicado (Tabela 11).

Em outros trabalhos, *A. niger* foi aplicado para remover fósforo de água residuária sintética têxtil (RODRIGUES et al., 2010). O isolado fúngico foi inoculado em reatores aeróbios removeu somente 23% do fósforo em 24 h, o que difere demasiadamente dos resultados obtidos neste trabalho. Provavelmente, o sucesso dos isolados fúngicos em remover o fósforo das amostras de efluentes em menor período estão relacionados com o desenvolvimento do produto imobilizado, que permitiu maior densidade celular, além do planejamento fatorial, que permite entender as melhores condições de AE.

Em relação aos efluentes domésticos, amostras de efluentes coletados em uma ETE na China, fungos em consórcio com bactérias presentes em sistemas de infiltração removeram 98% do fósforo (WANG et al., 2010). Em Shanghai, China, fungos também presentes em poros de um tanque de sistema de infiltração, juntamente com actinobactérias e bactérias removeram 85% em 30 dias (MA et al., 2009). Em amostras de outra ETE, localizada em Estocolmo, Suécia, *Trametes versicolor* e *Aspergillus luchuensis* removeram 99,9% em 6 horas (DALECKA et al., 2020). *Mucor circinelloides* removeu 40,1 % em 5 dias em uma ETE na St. Paul, Minnesota, EUA (YE et al., 2015).

Na literatura científica o trabalho semelhante a este foi o de Ramalingam e Prasanna, (2006) que obtiveram alta quantidade de fosfatase com a cianobactéria *Nodularia* sp. imobilizada em espumas de poliuretano, descrevendo que tal sistema poderia ser efetivamente aplicado para remoção de fósforo em ecossistemas de pântano e de águas residuais. Embora não tenha sido testado com cianobactérias, ficou comprovado neste presente trabalho a atuação das fosfatases, produzida por fungos, em sistema imobilizado com espumas de poliuretano, que foi eficiente em processos biorremediativos.

Tabela 11. Proporção entre quantidade de paralelepípedos do sistema imobilizado para volume de efluente tratado eficientemente, em menor período.

Isolados fúngicos	Quantidade de paralelepípedos do sistema imobilizado (Und.: 1,0 x 1,0 x 0,7 cm)	Efluente tratado (mL)	Período (h)
<i>Aspergillus flavus</i>	9	25	1h10min
<i>Aspergillus niger</i>	15	29,14	1h10min
<i>Talaromyces pinophilus</i>	12	25	2h00min
<i>Trichoderma asperellum</i>	12	25	1h10min

4 CONCLUSÕES

A. niger, *A. flavus*, *T. asperellum* e *T. pinophilus* são isolados fúngicos potencialmente produtores de fosfatase. A otimização da produção de fosfatase por células imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano foi possível através do uso de planejamento composto central rotacional. As condições otimizadas mostraram que o tempo de imobilização e a quantidade de espuma ofertada são fatores significativos na atividade enzimática.

Todos os isolados removeram eficientemente o fósforo das amostras de efluentes doméstico. *A. flavus*, *A. niger* e *T. asperellum* foram capazes de remover 99,9% do fósforo em 1h10m e *T. pinophilus.*, 99,9% em 2 h. O sistema imobilizado, com a otimização realizada neste trabalho, poderia ser aplicado para remoção de metais pesados (U, Ni²⁺ e Co²⁺) de águas residuais, como foi proposto por Paterson-Beedle e Macaskie (2005) com a bactéria *Serratia* sp. E, finalmente, após a aplicação em tratamentos biorremediativos, o sistema imobilizado pode ser reutilizado em processos de fertilização de solo.

REFERÊNCIAS:

- ALEKSIEVA, P. et al. Improvement of acid phosphatase production by immobilization of *Humicola lutea* mycelium in polyurethane sponge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 247-253, 2003.
- BALI, M.; GUEDDARI, M. Removal of phosphorus from secondary effluents using infiltration ercolation process. *Appl. Water Sci.*, v. 9, n. 3, p. 1-8, 2019.
- BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2021.
- CHU, L.; WANG, J. Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio. *Chemosphere*, v. 83, n. 1, p. 63-68, 2011.
- DALECKA, B. et al. Constructive use of filamentous fungi to remove pharmaceutical substances from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, v. 33, p. 100992, 2020.
- DIAS, M.A. et al. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Letters in applied microbiology*, v. 34, n. 1, p. 46-50, 2002.
- FENG, Q. et al. Effects of packing rates of cubic-shaped polyurethane foam carriers on the microbial community and the removal of organics and nitrogen in moving bed biofilm reactors. *Bioresource technology*, v. 117, p. 201-207, 2012.
- HULTBERG, M.; BODIN, H. Fungi-based treatment of brewery wastewater—biomass production and nutrient reduction. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 101, n. 11, p. 4791-4798, 2017.
- KAPRI, A; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 787-795, 2010.
- LE MOAL, M. et al. Eutrophication: a new wine in an old bottle?. *Science of the Total Environment*, v. 651, p. 1-11, 2019.
- LEITÃO, V. O. et al. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*, 32(8), 1083–1088, 2010.
- LI, N. J. et al. Soluble microbial products from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as the bioflocculant for municipal wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 780, 146662, 2021.

LOGANATHAN, P et al.. Removal and recovery of phosphate from water using sorption. *Crit.*

Rev. Environ. Sci. Technol. v. 44, p. 847-907, 2014.

LUO, W. et al.. Phosphorus and water recovery by a novel osmotic membrane bioreactor–reverse osmosis system. *Bioresource technology*, v. 200, p. 297-304, 2016.

MA, L. et al. Biological nitrogen removal by nitrification-denitrification in constructed rapid infiltration land system to treat municipal wastewater. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 7, n. 3/4, p. 795-798, 2009.

MOHAMMED, SAM; SHANSHOOL, HA. Phosphorus removal from water and waste water by chemical precipitation using alum and calcium chloride. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering*, v. 10, n. 2, p. 47-52, 2009.

MURPHY, J.; RILEY J.P. A modified single method for determination of phosphates in natural waters. *Chim. Acta*, 27:31-36, 1962.

PENG, L. et al.. A comprehensive review of phosphorus recovery from wastewater by crystallization processes. *Chemosphere*, v. 197, p. 768-781, 2018.

QUEZADA, M. A. et al. *Monascus kaoliang* CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso-propanol as co-substrate: optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 6, p. 2018-2025, 2009.

QUEZADA M.A. et al. *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 immobilized in polyurethane foam. An efficient biocatalyst for stereoselective reduction of ketones. *Bioresource technology*, v. 112, p. 18-27. 2012.

RAMALINGAM, N.; PRASANNA, B. Gowtham. Effect of aluminum phosphate on alkaline phosphatase activity of polyurethane foam immobilized cyanobacteria. *Current microbiology*, v. 53, n. 3, p. 194-197, 2006.

RODRIGUES, K. et al. Viability of the synthetic textile wastewater treatment in a fixed-bed aerobic reactor. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 15, n. 1, p. 99-106, 2010.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro-and microplastics biodegradation. *Biotechnology advances*, v. 40, p. 107501, 2020.

SHIEH, T.R. et al. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *Journal of Bacteriology*, v. 100, n. 3, p. 1161-1165, 1969.

SINGH, H. Mycoremediation: fungal bioremediation. Wiley Interscience, New York, NY, USA John Wiley & Sons, 2006.

SKOWRONEK, M. et al. Inulinase production by *Aspergillus niger* mycelium immobilized on polyurethane foam in a bioreactor with alternative oxygenation. *Int J Biotechnol Appl*, v. 3, n. 2, p. 80-88, 2011.

SOUZA, A. A. Production and biochemistry characterization of the acid phosphatase *Trichoderma harzianum* (ALL42). 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

WANG, H. LI, T. Sun and J. Pan, "Pilot Study on the Performance and Microbial Structure of a Subsurface Wastewater Infiltration System," *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, pp. 1-9, 2010.

WANG, L. et al. In-situ growth of graphene on carbon fibers for enhanced cell immobilization and xylitol fermentation. *Applied Surface Science*, v. 527, p. 146793, 2020.

ZENG, X. Efficient phosphorus removal by a novel halotolerant fungus *Aureobasidium* sp. MSP8 and the application potential in saline industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 334, p. 125237, 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo cienciométrico sobre biorremediação de águas residuais por fungos permitiu traçar o perfil das pesquisas, sua tendência temporal e entre países, bem como o foco das pesquisas, permitindo identificar tendências e lacunas na exploração da área temática. Foi possível constatar o crescimento de publicações nas últimas décadas, em que os corantes e os compostos fenólicos são objetos de estudos da maior parte das pesquisas. Essas tendências apontam o aumento do interesse desta área entre a comunidade científica e fica evidente que terão maiores números de publicações nos próximos anos. Índia e Espanha são os países que mais trabalham com águas residuais reais nos últimos anos.

A. niger, *A. flavus*, *T. asperellum* e *T. pinophilus* são isolados fúngicos potencialmente produtores de fosfatase. A otimização da produção de fosfatase por células imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano foi possível através do uso de planejamento composto central rotacional. As condições otimizadas mostraram que o tempo de imobilização e a quantidade de espuma ofertada são fatores significativos.

Todos os isolados removeram eficientemente o fósforo das amostras de efluentes doméstico. *A. flavus*, *A. niger* e *T. asperellum* foram capazes de remover 99,9% do fósforo em 1h10m e *T. pinophilus.*, 99,9% em 2 h. O sistema imobilizado, com a otimização realizada neste trabalho, poderia ser aplicado para remoção de metais pesados (U, Ni²⁺ e Co²⁺) de águas residuais, como foi proposto por Paterson-Beedle e Macaskie (2005) com a bactéria *Serratia* sp. E, finalmente, após a aplicação em tratamentos biorremediativos, o sistema imobilizado pode ser reutilizado em processos de fertilização de solo.