

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

KAMYLA ALVES PESSOA

Tolerância de um isolado fúngico de *Trichoderma asperellum* ao zinco e o cobre

Uberlândia

2023

KAMYLA ALVES PESSOA

Tolerância de um isolado fúngico de *Trichoderma asperellum* ao zinco e o cobre

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Professor Doutor Lucas Carvalho Basílio de Azevedo

Uberlândia - MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P475 Pessoa, Kamyla Alves, 1998-
2023 Tolerância de um isolado fúngico de *Trichoderma*
asperellum ao Zinco e o Cobre [recurso eletrônico] /
Kamyla Alves Pessoa. - 2023.

Orientador: Lucas Carvalho Basílio de Azevedo.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em
Engenharia Ambiental.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia ambiental. I. Azevedo, Lucas Carvalho
Basílio de, 1980-, (Orient.). II. Universidade Federal
de Uberlândia. Graduação em Engenharia Ambiental. III.
Título.

CDU: 628.5

KAMYLA ALVES PESSOA

Tolerância de um isolado fúngico de *Trichoderma asperellum* ao zinco e o cobre

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental.

Uberlândia, 2023

Banca Examinadora:

Lucas Carvalho Basilio de Azevedo – Doutor - UFU
Orientador

Tatiane Pereira Santos Assis – Doutora - UFU
Membro da banca

Luciana Alves de Sousa – Doutora - UFU
Membro da banca

Uberlândia – MG

2023

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas, por ter sido tão solícito e atencioso ao longo desses anos. Obrigada por compartilhar o seu conhecimento.

À Dra. Luciana, pela dedicação, paciência e carinho ao transmitir seus conhecimentos e me ajudar nessa etapa tão importante.

À Larissa, agradeço a amizade, o incentivo, a boa disposição e espírito de ajuda no decorrer de todo o curso.

À Prof.^a Dra. Tatiane, agradeço pelos conselhos e por compartilhar o seu conhecimento.

Ao meu cunhado e concunhada, Lucas e Marcela, por toda amizade e ajuda.

Aos meus pais, Ana Paula e José Eduardo, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Enzo, por sempre estar presente e me fazer sorrir.

E ao meu esposo, Matheus, agradeço por estar o tempo todo ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis, que não foram raros nos últimos três anos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por cada gesto carinhoso, cada sorriso, pelo permanente incentivo e preocupação. Obrigada meu amor.

O meu muito obrigada a todos, inclusive aqueles que contribuíram indiretamente para minha formação e para execução deste trabalho.

Agradeço a DEUS por colocar todas estas pessoas em minha vida.

RESUMO

A propagação de metais pesados no ambiente prejudica os seres vivos e os processos ecossistêmicos. Ainda que, certa quantidade de cobre e zinco seja exigida por seres vivos, em alta quantidade eles afetam o funcionamento celular, acarretando graves complicações à saúde. Por essa razão, é necessário o uso de técnicas eficientes para remoção da contaminação do meio. Dentre as formas de despoluição, pode-se fazer o uso combinado de técnicas como por exemplo o uso de fungos associados à processos de fitorremediação. Os fungos do gênero *Trichoderma* são bons promotores do crescimento vegetal, visto que eles são versáteis na colonização do meio, melhorando o crescimento vegetal e eliminando patógenos. A tolerância do fungo é uma característica importante para os processos de fitorremediação assistidos por microrganismos. Diante disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar a tolerância de um isolado fúngico de *Trichoderma asperellum* ao zinco e o cobre, visando melhorar as condições de biodegradabilidade desses metais. Para essa avaliação as cepas fúngicas foram expostas a concentrações crescentes de zinco (360 mg·L⁻¹, 720 mg·L⁻¹, 1080 mg·L⁻¹, 1440 mg·L⁻¹, 1800 mg·L⁻¹) e de cobre (200 mg·L⁻¹, 400 mg·L⁻¹, 600 mg·L⁻¹, 800 mg·L⁻¹, 1000 mg·L⁻¹) em meio de cultura sólido durante 5 dias. O efeito do Cu e Zn sobre o *T. asperellum* foi estimado através do percentual de redução no crescimento e nas diferenças de cada tratamento. O *T. asperellum* sobreviveu até 1000 mg·L⁻¹ de cobre com uma redução de 69,11% a 800 mg·L⁻¹, já para o zinco, o *T. asperellum* foi capaz de sobreviver até 1800 mg·L⁻¹, com uma redução de 71,36% a 720 mg·L⁻¹. A aplicação de fungos do gênero *Trichoderma* aumenta o potencial de fitorremediação, visto que, melhoram o sistema de defesa vegetal e controlam patógenos, estimulando o crescimento das plantas e melhorando as condições de remoção desses metais.

Palavras-chave: metais pesados; resistência; biorremediação; fungo promotor do crescimento vegetal; microrganismos.

ABSTRACT

The spread of heavy metals in the environment harms living beings and ecosystem processes. Although a certain amount of copper and zinc is required by living beings, in high amounts they affect cellular functioning, causing serious health complications. For this reason, it is necessary to use efficient techniques to remove contamination from the medium. Among the forms of depollution, one can make the combined use of techniques such as the use of fungi associated with phytoremediation processes. Fungi of the genus *Trichoderma* are good promoters of plant growth, as they are versatile in colonizing the environment, improving plant growth and eliminating pathogens. Fungal tolerance is an important feature for microorganism-assisted phytoremediation processes. Therefore, this work aimed to evaluate the tolerance of a fungal isolate of *Trichoderma asperellum* to zinc and copper, aiming to improve the conditions of biodegradability of these metals. For this evaluation, the fungal strains were exposed to increasing concentrations of zinc (360 mg·L⁻¹, 720 mg·L⁻¹, 1080 mg·L⁻¹, 1440 mg·L⁻¹, 1800 mg·L⁻¹) and copper (200 mg·L⁻¹, 400 mg·L⁻¹, 600 mg·L⁻¹, 800 mg·L⁻¹, 1000 mg·L⁻¹) in solid culture medium for 5 days. The effect of Cu and Zn on *T. asperellum* was estimated through the percentage of reduction in growth and the differences of each treatment. *T. asperellum* survived up to 1000 mg·L⁻¹ of copper with a reduction of 69.11% at 800 mg·L⁻¹, whereas for zinc, *T. asperellum* was able to survive up to 1800 mg·L⁻¹, with a reduction of 71.36% at 720 mg·L⁻¹. The application of fungi of the genus *Trichoderma* increases the phytoremediation potential, since they improve the plant defense system and control pathogens, stimulating plant growth and improving the conditions for removing these metals.

Keywords: heavy metals; resistance; bioremediation; plant growth promoting fungus; microorganisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Crescimento do fungo <i>Trichoderma asperellum</i> na presença do $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de : Controle ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ após 5 dias.....	18
Figura 2 - Crescimento do fungo <i>Trichoderma asperellum</i> na presença do ZnCl_2 nas concentrações de : Controle ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $360 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $720 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1080 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1440 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ após 5 dias.....	18
Figura 3 - Área de crescimento do fungo <i>Trichoderma asperellum</i> , na presença de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em meio BDA, em função da concentração de cobre após cinco dias. As barras de erro indicam o desvio padrão.....	19
Figura 4 - Área de crescimento do fungo <i>Trichoderma asperellum</i> , na presença de ZnCl_2 em meio BDA, em função da concentração de zinco após cinco dias. As barras de erro indicam o desvio padrão.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Método de preparo da solução sulfato de cobre nas concentrações de 200 mg·L ⁻¹ ; 400 mg·L ⁻¹ ; 600 mg·L ⁻¹ ; 800 mg·L ⁻¹ e 1000 mg·L ⁻¹	15
Tabela 2 - Método de preparo da solução cloreto de zinco nas concentrações de 360 mg·L ⁻¹ ; 720 mg·L ⁻¹ ; 1080 mg·L ⁻¹ ; 1440 mg·L ⁻¹ e 1800 mg·L ⁻¹	16
Tabela 3 – Percentual de redução no crescimento do <i>Trichoderma asperellum</i> e teste de médias, nas quais seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Metais pesados	10
2.2	Cobre.....	11
2.3	Zinco.....	12
2.4	Biorremediação	12
2.5	Concentração inibitória mínima para cobre e zinco	13
2.6	<i>Trichoderma asperellum</i>.....	14
3	METODOLOGIA.....	15
3.1	Manutenção do fungo	15
3.2	Solução de sulfato de cobre	15
3.3	Solução de cloreto de zinco	16
3.4	Ensaio em meio sólido	16
3.5	Análise estatística.....	17
4	RESULTADOS	17
5	DISCUSSÃO	20
6	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A industrialização e a urbanização intensificam a liberação de metais no ambiente, incluindo solos, lagos, rios, águas subterrâneas e oceanos (MUDHOO; GARG; WANG, 2012). Esses metais, em especial o cobre e zinco, são encontrados naturalmente na crosta terrestre e estão sendo cada vez mais liberados no meio ambiente a partir de águas residuais industriais e outras atividades humanas, aumentando o fluxo de substâncias metálicas no ambiente aquático e terrestre (GAUTAM et al., 2016; BRIFFA; SINAGRA; SINAGRA, 2020).

Embora alguns metais como o Fe, Cu, Mn, Zn e o Ni componham-se nutrientes essenciais e necessários para várias funções fisiológicas e bioquímicas, onde a carência pode resultar em deficiência, doenças ou síndromes, em alta quantidade eles afetam o funcionamento celular, produzindo toxicidade (ANAND et al., 2006; ENGWA et al., 2019). Por essa razão, tecnologias eficientes são necessárias para diminuir as concentrações de metais para níveis toleráveis com custo mínimo e baixa manutenção (LIU et al., 2020). Portanto, ao se constatar uma contaminação, deve-se identificar o poluente e sua respectiva concentração para posteriormente saber qual técnica de remediação utilizar. A biorremediação é um processo de tratamento que usa microrganismos para remover, reduzir, imobilizar ou transformar contaminantes, presentes tanto em águas subterrâneas quanto em solos, em substâncias de menor toxicidade, consistindo em uma técnica promissora para tratar a poluição por metais (BRAUN et al., 2019).

Assim como a biorremediação, a fitorremediação é uma técnica de descontaminação classificadas como biológica, na qual consiste no uso de plantas como agente de purificação dos ambientes aquáticos e terrestres (COUTINHO et al., 2015). Entretanto, para ocorrer eliminação dos metais pesados pelas plantas, esses íons metálicos precisam estar na solução do solo, o que pode reduzir a eficiência devido o aumento da toxicidade, inibindo o crescimento vegetal (FARIAS, 2018). Com isso, foi observado que alguns fungos conseguem colonizar os tecidos das plantas trazendo benefícios a mesma, sendo nomeados como fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) (BARELLI et al., 2016). Os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os FPCV, uma vez que ele melhora o sistema de defesa vegetal e elimina diversos patógenos, impulsionando o crescimento das plantas (LORITO et al., 2010; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2011).

Entre as técnicas de biorremediação encontra-se a possibilidade de incluir não apenas tratamentos físicos e químicos nos processos biológicos, mas também o uso de bactérias e fungos tolerantes a metais pesados, associadas à processos de biodegradação, bioacumulação e

biossorção (AYAD et al., 2018). Considerando que a biorremediação é mediada por processos metabólicos realizados por seres vivos, é necessário que os organismos remediadores sejam capazes de resistir ao agente contaminante e sobreviver mesmo em condição de estresse (SIDDIQUEE et al., 2015). Alguns fungos são versáteis na colonização do meio, pois podem se adaptar e crescer sob várias condições extremas de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e uma alta concentração de metais (ANAND et al., 2006).

Considerando o potencial de se utilizar microrganismos na biorremediação de metais a identificação de isolados microbianos tolerantes é importante para se estabelecer novos métodos de descontaminação ambiental. Uma das formas de se atestar a tolerância é pela determinação das concentrações mínimas de metal que impedem o crescimento perceptível das cepas fúngicas, ou seja, é necessário definir os valores de concentração inibitória mínima (CIM). Nesse contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar quais concentrações de zinco e cobre o fungo *Trichoderma asperellum* tolera, visando melhorar as condições de remoção desses metais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metais pesados

Nos últimos anos percebeu-se a importância do gerenciamento da poluição ambiental e seu controle devido aos materiais perigosos (FARIAS, 2016). Metal pesado é um conceito muito utilizado, sendo associado como uma substância tóxica, geralmente proveniente de um descarte inadequado de um rejeito no meio ambiente (LIMA, 2011). Para Duffus (2002), o conceito metal pesado tem sido utilizado como um grupo de metais e semimetais associados com contaminações e potencial de toxicidade e ecotoxicidade.

Os metais estão presentes naturalmente em solos, rochas, sedimentos, águas e em seres vivos geralmente como componentes naturais (FARIAS, 2016). Entretanto, quando ultrapassam os limites da essencialidade no ambiente, comprometem não apenas a qualidade da água e do solo, mas também, processos de equilíbrio ambiental (GONÇALVES et al., 2015).

Desde o século XX, foram necessárias maiores quantidades de diferentes metais para suprir as demandas impostas pelo desenvolvimento, intensificando o uso de metais pesados (GUSMÃO, 2004). Conseqüentemente, o aumento da concentração desses metais no ambiente torna-se um problema ambiental e de saúde pública da atualidade (SEREMETA, 2019).

A forma como o metal está presente no ambiente influencia diretamente na sua toxicidade, sendo a mais tóxica quando esse se encontra como cátion ou ligado a cadeias carbônicas (LIMA, 2011). Essas formas ocorrem principalmente em queima de combustíveis fósseis, mineração e fundição de minérios metalíferos, resíduos municipais, fertilizantes, pesticidas, aditivos de lodo de esgoto, efluentes de indústrias como galvanoplastia, curtumes, fabricação de aço (CONGEEVARAM et al., 2007)

Por essa razão, é importante novos estudos em busca explorar novos microrganismos tolerantes a metais potencialmente tóxicos, visando sua possível aplicação para a biorremediação de áreas contaminadas (SAÊTA, 2021).

2.2 Cobre

Acredita-se que o cobre foi o primeiro metal a ser descoberto e trabalhado pelo homem há mais de 7000 anos (RODRIGUES, 2012). O cobre possui o símbolo Cu, é um metal marrom avermelhado no estado reduzido, apresenta quatro estados de oxidação: metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^+), íon cúprico (Cu^{+2}) e o menos encontrado o íon trivalente (Cu^{+3}) (QUINÁGLIA, 2006). Na natureza o cobre é um elemento traço que pode estar presente como sulfeto, arsenito, cloreto, carbonato e na forma elementar, podendo ser encontrado na água, no solo e nas rochas principalmente nos minerais cuprita, calcocita, calcopirita, malaquita e bornita (QUINÁGLIA, 2006; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012; FARIAS, 2016).

Para os seres vivos, o íon cobre(II) é um elemento químico essencial (RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012). Um homem adulto necessita de 2 mg de cobre por dia, sendo que o corpo possui cerca de 100 a 150 mg do elemento (LEMOS et al., 2008). Já a ingestão excessiva leva a graves complicações à saúde, podendo causar câncer e até mesmo a morte (ANDREAZZA et al., 2013).

Devido a suas propriedades como maleabilidade, ductilidade, condutividade e resistência à corrosão o cobre é um metal utilizado principalmente na indústria elétrica, linhas de transmissão, enrolamento de motores, como veneno agrícola e algicida (GUSMÃO, 2004; QUINÁGLIA, 2006). Desse modo, os resíduos dessas atividades assim como a produção de fertilizantes e esgotos domésticos e industriais são as principais fontes de poluição do meio ambiente por cobre (MASUTTI, 2004).

2.3 Zinco

O zinco é um metal de símbolo Zn sendo utilizado pela humanidade há mais de 2500 anos (QUINÁGLIA, 2006). Ele se apresenta como um metal brilhante de cor branco-azulada (PINO, 2005). Na natureza, está presente basicamente como acetato de zinco, cloreto de zinco, estearato de zinco, sulfato de zinco, sulfeto de zinco, óxido de zinco, carbonato de zinco e como silicato (QUINÁGLIA, 2006).

O zinco é um elemento essencial e benéfico ao crescimento de plantas e animais, sua privação pode levar ao nanismo, anorexia (falta de apetite), alopecia (queda de cabelos e barba) e dificuldades de cicatrização (QUINÁGLIA, 2006). Além disso, esse metal é muito utilizado na indústria, principalmente em revestimento para prevenir a corrosão, fabricação de pinturas, borracha, tintas e fabricação de ligas de latão e bronze (PINO, 2005).

Apesar de estar presente naturalmente no ar, no solo e na água e em quase todos os alimentos (PINO, 2005). A maior liberação de Zn ocorre por atividades humanas como a mineração, a produção de aço, a queima de derivados do petróleo e a incineração de resíduos (ROCHA, 2017). Em sua forma metálica, o Zn apresenta uma limitada biodisponibilidade (LEMOS et al., 2008). Apesar disso, ao reagir com outras substâncias químicas, como ácidos e oxigênio, formam-se compostos potencialmente tóxicos (RADHIKA; SUBRAMANIAN; NATARAJAN, 2006).

A disposição inadequada do Zn nos corpos hídricos além de, reduzir o pH provoca a retenção desse elemento no fundo, aumentando a possibilidade de absorção e retenção de substâncias químicas no organismo das espécies aquáticas (QUINÁGLIA, 2006). Em sedimentos geralmente ocorre com a adsorção sobre o ferro, óxidos de manganês, argila mineral e materiais orgânicos, conseguindo formar rejeitos perigosos como, por exemplo, o cloreto de zinco, o óxido de zinco e o sulfato de zinco (QUINÁGLIA, 2006; ROCHA, 2017).

2.4 Biorremediação

A biorremediação é uma técnica em que organismos vivos, geralmente plantas ou microrganismos, são utilizados em um processo biotecnológico de remoção da poluição ou redução da toxicidade do poluente (GAYLARDE, 2005). Várias técnicas de biorremediação têm sido aperfeiçoadas e classificadas segundo o tratamento e a fase utilizada (MOREIRA, 2013). Entretanto, essas metodologias demandam monitoramento eficaz para determinar se a

técnica de tratamento implementada está se mostrando eficiente ou se está comprometendo, de forma negativa, o ecossistema local (CUNHA et al., 2008).

De acordo com Boopathy (2000), a biorremediação oferece diversas vantagens entre elas, a possibilidade de tratamento no local, baixo custo comparado a outras técnicas e maior aceitação pública. Visto que, os problemas ambientais estão progressivamente mais relevantes para a humanidade, em função da compreensão de que os recursos naturais estão cada vez mais escassos, decorrentes da urbanização e poluição (CUNHA et al., 2008).

Existem certos microrganismos, que podem sobreviver em altas concentrações de metais e têm o potencial de acumular diferentes metais (ANAND et al., 2006). O uso de fungos, apresenta algumas vantagens sobre as bactérias, como a capacidade de adsorção, acumulação e imobilização de metais pesados sofrendo pouca ou nenhuma ação tóxica, principalmente devido a sua alta capacidade metabólica, em vista disso, são excelentes agentes para biorremediação de solo e água (DAVIS et al., 1993; COELHO, 2019). O convívio dos fungos na presença de metais pesados dependem do metal, organismo e ambiente (COELHO, 2019).

Quanto maior o período dos metais pesados no ambiente, mais custoso pode ser a sua remediação (D'ANNIBALE et al., 2005). Neste cenário, a pressão que os metais pesados exercem nos microrganismos refletem nos mecanismos adquiridos por eles para remediar o seu potencial tóxico (FARIAS, 2016).

2.5 Concentração inibitória mínima para cobre e zinco

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM), ou MIC (Minimum Inhibitory Concentration) em inglês, significam as concentrações mínimas de metal que impedem o crescimento perceptível das cepas fúngicas (LIAQUAT et al., 2021). Ou seja, o CIM é definido como a concentração mais baixa sem crescimento visível após um período de incubação prescrito e pode ser um indicador de toxicidade (JASPERS et al., 2014).

Os valores da CIM são influenciados por diversos fatores, entre eles, a natureza do microrganismo testado, a quantidade de inóculo, o tempo de incubação, a composição do meio de cultura e a condições ambientais, tais como a temperatura, o pH e o arejamento (MONTEIRO, 2011). Segundo Ostrosky et al. (2008), os meios de cultura devem promover um crescimento conveniente aos organismos e não conter substâncias adversas à atividade antimicrobiana em estudo, sendo o método de diluição em ágar é o mais utilizado, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo.

Esse teste é um método físico, onde um microrganismo é estimulado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido, logo é correlacionado o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al., 2008).

2.6 *Trichoderma asperellum*

Os fungos do gênero *Trichoderma* destacam-se entre os ascomicetos filamentosos devido à sua alta adaptabilidade a diversas condições ecológicas, desempenhando um papel importante na saúde do ecossistema (MUKHERJEE et al., 2013; ZEILINGER et al., 2016). Esses fungos são considerados seguros ao ambiente e não agressivos ao homem e demais organismos não-alvos (LONGA; SAVAZZINI; PERTOT, p. 174).

O *Trichoderma* tem amplo potencial de aplicação industrial e ecológico já que eles não apenas protegem as plantas eliminando outros fungos, pela produção de enzimas que degradam a parede celular, mas também induzem resistência contra patógenos de plantas (SHARMA et al., 2011; SILVA et al., 2016). Além disso, esse fungo melhora o crescimento e o vigor das plantas, solubilizando os nutrientes (MUKHERJEE et al., 2013).

Em consequência, as espécies de *Trichoderma* são benéficas no controle de doenças em plantas, em razão de sua função na atividade de biocontrole, como tolerância ao estresse biótico e abiótico, crescimento de hifas e aporte a remoção de metais pesados e poluentes ambientais presentes em águas residuais e solos (SHARMA et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2013).

Segundo Farias (2018), o Jacarandá Mimoso (*Jacaranda mimosifolia* D. Don) em conciliação com o fungo tem maior potencial de fitorremediação, condicionando maior crescimento de raízes, maior acúmulo de metais na planta e melhor translocação de metais das raízes para a parte aérea

Datta (2015), observou que o *Trichoderma F14* apresentou MIC de $1635 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (25 mM) para Zn. Liaquat et al. (2021), também observaram uma MIC do *Tichoderma citronoviride* ao Cu de $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (600 ppm) e uma MIC do *Trichoderma reesei* ao Cu de $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (800 ppm). Errasquin e Vázquez (2003), observaram que o *Trichoderma atroviride* sobreviveu em concentrações entre 0 e $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre com níveis de biomassa quase constantes. No entanto, o crescimento diminuiu drasticamente a $350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, onde foi observada uma redução de 80%, enquanto nenhum crescimento foi detectado a $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Além disso, este microrganismo conseguiu sobreviver até $750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zinco.

3 METODOLOGIA

Realizam dois ensaios utilizando isolado fúngico de *Trichoderma asperellum* em meio de cultura com concentrações de Cu (200 mg·L⁻¹, 400 mg·L⁻¹, 600 mg·L⁻¹, 800 mg·L⁻¹, 1000 mg·L⁻¹) e Zn (360 mg·L⁻¹, 720 mg·L⁻¹, 1080 mg·L⁻¹, 1440 mg·L⁻¹, 1800 mg·L⁻¹). O isolado fúngico foi fornecido pela empresa H.T.M. Comercio e Laboratórios de Corretivos do Solo LTDA e repicado duas vezes.

3.1 Manutenção do fungo

O meio de cultura foi preparado adicionando-se 39g do produto BDA (Sigma Aldrich) em 1 litro de água destilada em um béquer. Este foi disposto no agitador magnético com aquecimento a fim de dissolver completamente. Após esse processo, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos e posteriormente vertidos nas placas de Petri em câmara de fluxo e mantido até a solidificação do meio ocorrer.

A partir do inóculo de *Trichoderma asperellum*, foram realizadas duas repicagens em novas placas de Petri com meio BDA. As placas foram submetidas a temperatura de 27°C por 11 dias obtendo a colonização do meio de cultura com porções jovens e esporulantes.

3.2 Solução de sulfato de cobre

Foi preparada uma solução estoque de sulfato de cobre na concentração 7,86 g L⁻¹ e a partir dela foram realizadas diluições, com a finalidade de obter soluções de sulfato de cobre nas concentrações de 200 mg·L⁻¹; 400 mg·L⁻¹; 600 mg·L⁻¹; 800 mg·L⁻¹ e 1000 mg·L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1 - Método de preparo da solução sulfato de cobre nas concentrações de 200 mg·L⁻¹; 400 mg·L⁻¹; 600 mg·L⁻¹; 800 mg·L⁻¹ e 1000 mg·L⁻¹.

Concentração (mg·L ⁻¹)	Solução estoque (ml)	Água destilada (ml)
200	18	162
400	36	144
600	54	126
800	72	108
1000	90	90

Fonte: A autora.

3.3 Solução de cloreto de zinco

Foi preparada uma solução estoque de cloreto de zinco na concentração $7,50 \text{ g L}^{-1}$ e a partir dela foram realizadas diluições, com a finalidade de obter soluções de cloreto de zinco nas concentrações de $360 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $720 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1080 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1440 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. (Tabela 2).

Tabela 2 - Método de preparo da solução cloreto de zinco nas concentrações de $360 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $720 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1080 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $1440 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Solução estoque (ml)	Água destilada (ml)
360	18	162
720	36	144
1080	54	126
1440	72	108
1800	90	90

Fonte: A autora.

3.4 Ensaio em meio sólido

Para o preparo do meio de cultura contendo metais pesados, foi utilizado o produto Agar Batata Dextrose (BDA) e as soluções de zinco e cobre, essas foram autoclavadas à $121 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 min. Após a esterilização, o meio foi vertido nas placas de Petri em câmara de fluxo e mantidos até a solidificação do meio ocorrer. Todas as concentrações foram preparadas em quadruplicatas. Após a solidificação, as culturas foram inoculadas com discos de 9mm do *Trichoderma asperellum* e incubadas à 27°C durante cinco dias.

O efeito do Cu e Zn sobre o crescimento do *T. asperellum* foi estimado medindo-se a área de extensão da colônia (cm^2) em relação ao controle (meio sem metal), por fotografias das placas de Petri, no programa AutoCAD. Ao inserir a imagem da placa de Petri no programa, utilizou o comando dist medindo o diâmetro da placa de Petri na imagem. Sabido que as placas de Petri possuem 9 cm de diâmetro, divide-se esse diâmetro pelo encontrado no comando dist, resultando o fator de escala. Com o comando scale, seleciona a imagem e identifica o fator de escala. Posteriormente, com a fotografia padronizada, utiliza o comando área obtendo o resultado da área de extensão da colônia (cm^2) do *T. asperellum*.

A partir da área de extensão da colônia (cm²) do *T. asperellum*, foi determinado o percentual de redução no crescimento e se um tratamento difere de outro com base em análises estatísticas.

3.5 Análise estatística

Com a área de extensão da colônia (cm²) foram realizados a análise de variância, o teste de médias ((Tukey (p≤0,05)) e a análise de regressão dos dados no programa RStudio.

4 RESULTADOS

Neste estudo foi possível observar que a menor concentração de zinco reduziu o crescimento do *T. asperellum* em 34,40% e em 32,31% para a menor concentração de cobre (Tabela 3).

Tabela 3 – Percentual de redução no crescimento do *Trichoderma asperellum* e teste de médias, nas quais seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

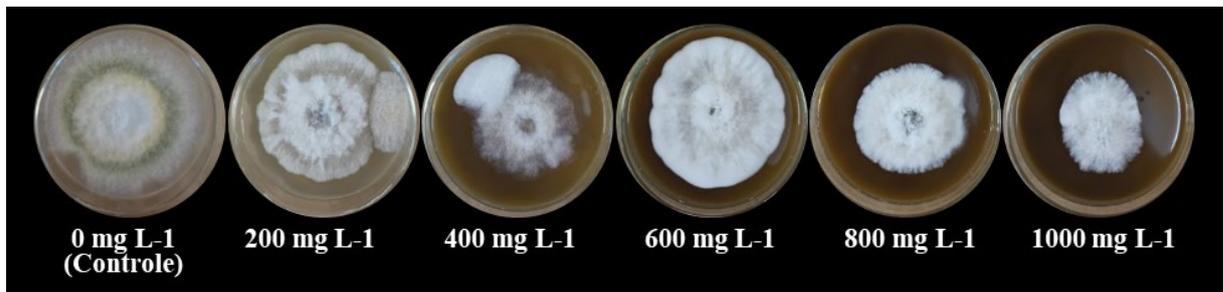
[Cu] (mg·L ⁻¹)	% de redução do <i>T. asperellum</i>	Teste de Tukey	[Zn] (mg·L ⁻¹)	% de redução do <i>T. asperellum</i>	Teste de Tukey
0	0	a	0	0	a
200	32,31	b	360	34,40	b
400	53,85	bc	720	71,36	c
600	36,05	b	1080	89,63	cd
800	69,11	c	1440	87,42	cd
1000	76,60	c	1800	86,31	d

Fonte: A autora.

Com base no teste de Tukey é possível observar que para o cobre, nas concentrações de 200 mg·L⁻¹, 400 mg·L⁻¹ e 600 mg·L⁻¹, temos uma diferença entre médias estatisticamente insignificante, ou seja, as médias dos tratamentos são iguais. O mesmo pode ser observado para as concentrações 400 mg·L⁻¹, 800 mg·L⁻¹ e 1000 mg·L⁻¹. Já para o zinco, é possível observar que a média da concentração 360 mg·L⁻¹ difere tanto do controle quanto das demais concentrações, entretanto, as concentrações de 720 mg·L⁻¹, 1800 mg·L⁻¹ e 1440 mg·L⁻¹ tem as médias iguais, assim como, as concentrações 1800 mg·L⁻¹, 1440 mg·L⁻¹ e 1080 mg·L⁻¹.

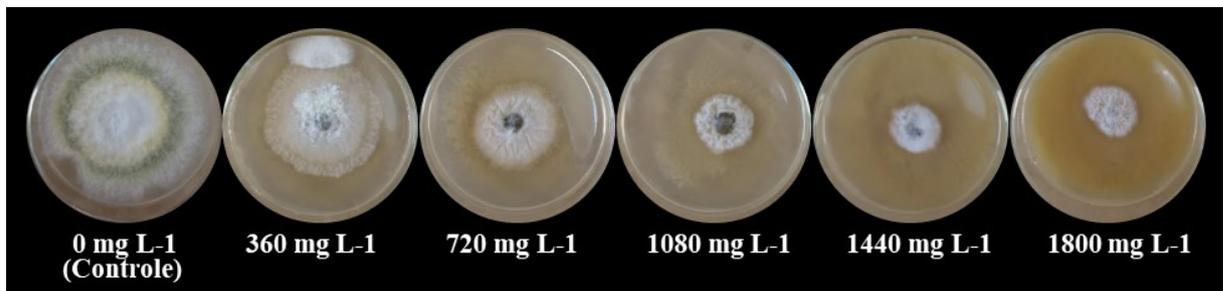
Em relação ao controle as áreas de crescimento do fungo *T. asperellum* na presença do cobre e zinco encontram-se nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1 - Crescimento do fungo *Trichoderma asperellum* na presença do $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de : Controle ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ após 5 dias.



Fonte: A autora.

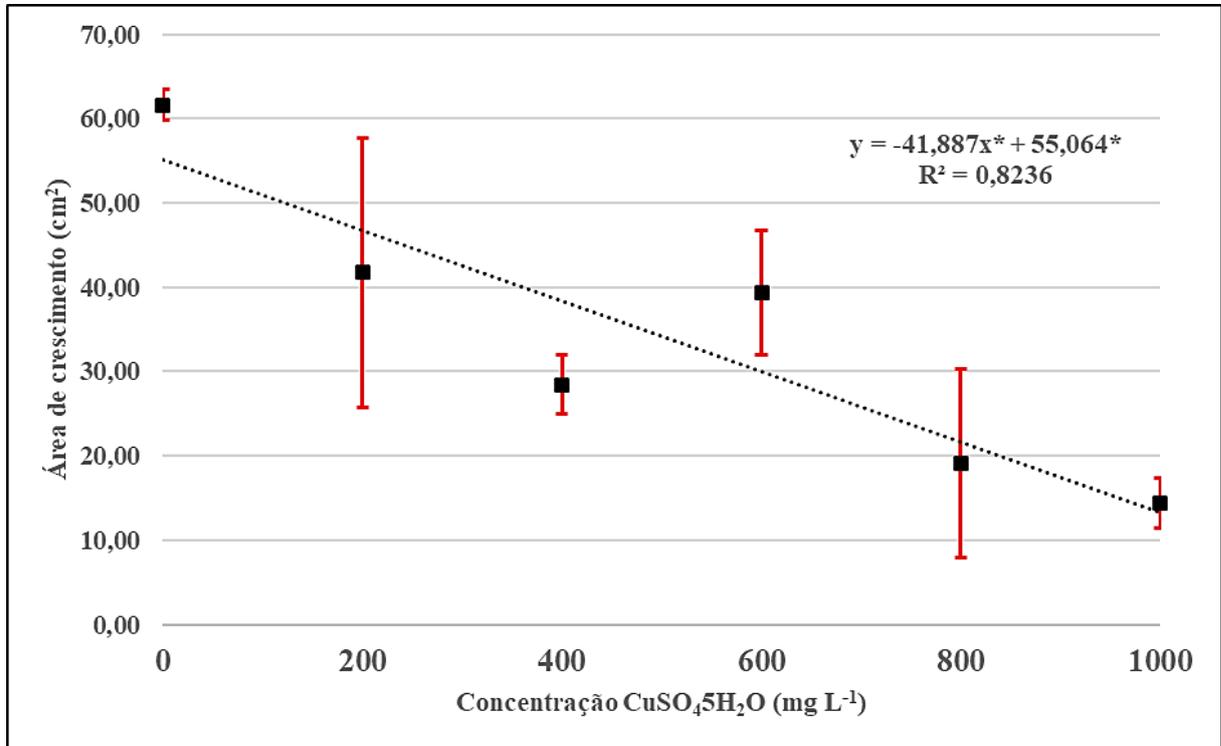
Figura 2 - Crescimento do fungo *Trichoderma asperellum* na presença do ZnCl_2 nas concentrações de : Controle ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); $360 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $720 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $1080 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $1440 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $1800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ após 5 dias.



Fonte: A autora.

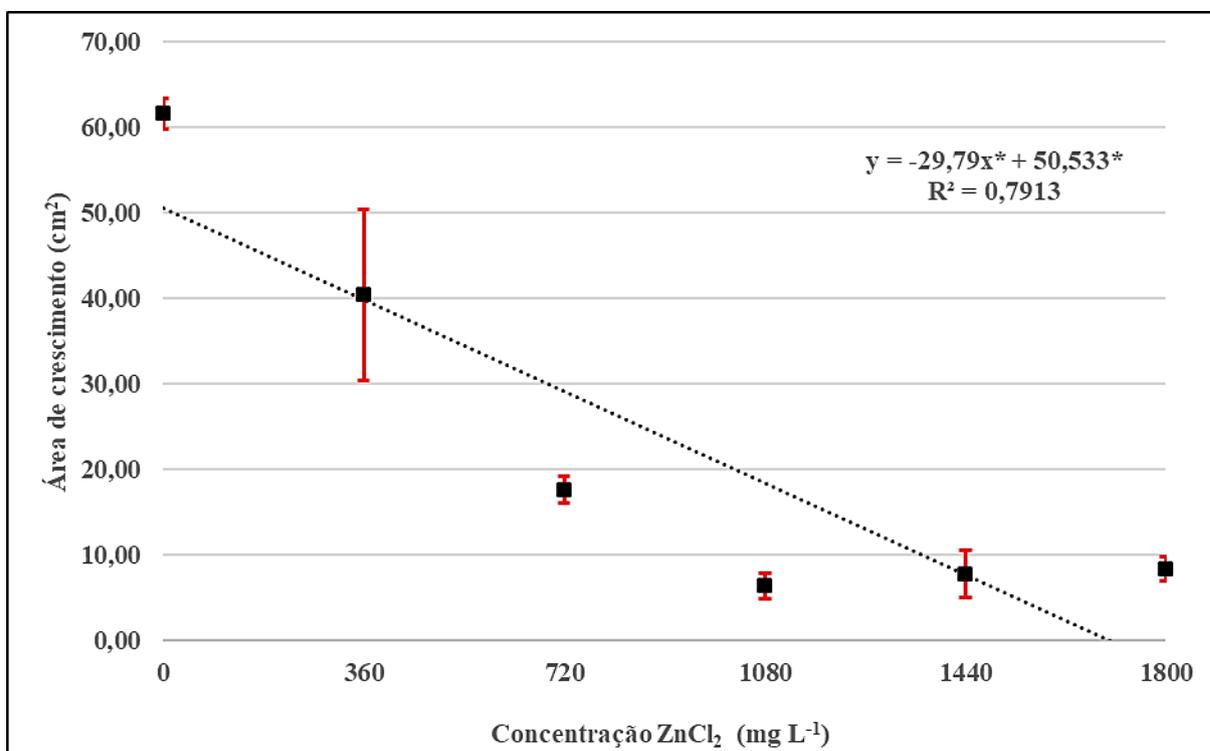
Na Figura 3 é possível observar que a área de crescimento do *T. asperellum* é dependente da concentração de cobre, ou seja, quanto maior a concentração, menor é a área de crescimento. De modo igual ocorre no Figura 4, onde a área de crescimento do *T. asperellum* é dependente da concentração de zinco. Para ambos os gráficos o coeficiente angular da reta foi significativo ($p \leq 0,05$).

Figura 3 - Área de crescimento do fungo *Trichoderma asperellum*, na presença de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em meio BDA, em função da concentração de cobre após cinco dias. As barras de erro indicam o desvio padrão.



Fonte: A autora.

Figura 4 - Área de crescimento do fungo *Trichoderma asperellum*, na presença de $ZnCl_2$ em meio BDA, em função da concentração de zinco após cinco dias. As barras de erro indicam o desvio padrão.



Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, o *Trichoderma asperellum* foi submetido a um experimento para avaliar sua capacidade de crescimento em meio BDA na ausência e presença de metais pesados zinco e cobre, nas concentrações de $360\ mg\cdot L^{-1}$, $720\ mg\cdot L^{-1}$, $1080\ mg\cdot L^{-1}$, $1440\ mg\cdot L^{-1}$, $1800\ mg\cdot L^{-1}$ e $200\ mg\cdot L^{-1}$, $400\ mg\cdot L^{-1}$, $600\ mg\cdot L^{-1}$, $800\ mg\cdot L^{-1}$, $1000\ mg\cdot L^{-1}$, respectivamente.

O presente estudo descreveu a tolerância *T. asperellum* ao cobre e zinco, indicando a capacidade de ser utilizado em ambientes de descontaminação desses metais. Apesar de não encontrarmos a CIM devido a diminuição do crescimento desde a primeira dose de Cu e Zn, a expansão do *T. asperellum* revela uma capacidade de crescimento em metais pesados em concentrações altas e variadas. São fungos de crescimento rápido e competidores bem-sucedidos por espaço e nutrientes (ZEILINGER et al., 2016).

O *T. asperellum* sobreviveu em concentrações de até $1000\ mg\cdot L^{-1}$ de cobre. No entanto, o crescimento diminuiu drasticamente a $800\ mg\cdot L^{-1}$, com uma redução de 69,11%. Para o zinco,

o *T. asperellum* foi capaz de sobreviver em concentrações mais elevadas, ou seja, até 1800 mg·L⁻¹, com uma redução de 71,36% a 720 mg·L⁻¹.

Outros autores relataram níveis de tolerância semelhantes aos relatados aqui. Por exemplo, Errasquin e Vázquez (2003) observaram que o *T. atroviride* sobreviveu em concentrações entre 0 e 300 mg·L⁻¹ com níveis de biomassa quase constantes. No entanto, o crescimento diminuiu drasticamente a 350 mg·L⁻¹, onde foi observada uma redução de 80%, enquanto nenhum crescimento foi detectado a 400 mg·L⁻¹. Além disso, este microrganismo foi capaz de sobreviver em concentrações mais elevadas de zinco, ou seja, até 750 mg·L⁻¹, com uma redução mais gradual no crescimento, por exemplo, uma redução de 50% a 200 mg·L⁻¹.

Segundo Datta (2015) o *Trichoderma F14* apresentou CIM de 25 mM para Zn. Já Liaquat et al. (2021), observaram uma CIM do *T. citronoviride* ao Cu de 600 ppm e uma CIM do *Trichoderma reesei* ao Cu 800 ppm. Entretanto, podemos observar que para o *T. asperellum*, tanto a concentração de 360 mg·L⁻¹ de zinco quanto a concentração de 200 mg·L⁻¹ de cobre já inibiram o crescimento do *T. asperellum*, não sendo possível encontrar a CIM.

Ayad et al. (2018) demonstraram que o *Trichoderma sp.* reduziu o crescimento em 43,85% a 200 mg·L⁻¹ de cobre e nenhum crescimento foi observado a 800 mg·L⁻¹ de cobre. Já para o zinco o *Trichoderma sp.* cresceu até 4000 mg·L⁻¹. Anand et al. (2006) relataram que o *Trichoderma viride* teve biomassa constante até 3000 mg·L⁻¹ de Cu(II), enquanto apenas 55% e 14% de crescimento foi observado a 4000 e 5000 mg·L⁻¹ de Cu(II), respectivamente.

O gênero *Trichoderma* é capaz de modificar a rizosfera de plantas, e produz uma importante substância de ácido orgânico, como ácido glucônico, ácido furâmico e cítrico (AYAD et al., 2018). Além disso, os fungos do gênero *Trichoderma* utiliza alguns mecanismos de ação no controle de patógenos de plantas, como competição, antibiose, parasitismo e indução de resistência, podendo ser utilizados um ou mais mecanismos ao mesmo tempo (LUCON; CHAVES; BACILIERI, 2014).

6 CONCLUSÃO

Em consequência da contaminação do ambiente por metais, causados principalmente por práticas de disposição inadequadas de resíduos e atividades industriais, verifica-se a necessidade da remediação desses contaminantes. O isolado fúngico de *Trichoderma asperellum* têm a capacidade de resistir a altas concentrações de cobre e zinco, 1000 mg·L⁻¹ e 1800 mg·L⁻¹, respectivamente. A aplicação de fungos do gênero *Trichoderma* aumenta o potencial de fitorremediação, visto que, melhoram o sistema de defesa vegetal e controlam

patógenos, estimulando o crescimento das plantas e melhorando as condições de remoção desses metais. É necessário ainda encontrar a CIM, uma vez que, esse estudo apresentou diminuição no crescimento desde a primeira dose de Cu e Zn.

REFERÊNCIAS

- ANAND, Purnima et al. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 8, p. 1018-1025, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.046>
- ANDREAZZA, Robson et al. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de ciências agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013. <https://doi.org/10.19084/rca.16290>
- AYAD, Farah et al. Tolerance of *Trichoderma sp.* to heavy metals and its antifungal activity in algerian marine environment. **Journal of Marine Biology & Oceanography**, v. 7, n. 3, p. 2, 2018. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.2.48>
- BARELLI, Larissa et al. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 6, p. 657-664, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0413-z>
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)
- BRAUN, Adeli et al. Biorremediação como alternativa de tratamento de solos contaminados com metais tóxicos. **Revista CIATEC-UPF**, v. 11, n. 2, p. 73-87, 9 jul. 2019. <https://doi.org/10.5335/ciatec.v11i2.8971>
- BRIFFA, Jessica; SINAGRA, Emmanuel; BLUNDELL, Renald. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. **Heliyon**, v. 6, n. 9, p. e04691, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- COELHO, Ednei da Assunção Antunes. **Isolamento de fungos com potencial para biorremediação na mina de urânio Osamu Utsumi**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. <https://doi.org/10.11606/T.42.2019.tde-09122021-104030>
- CONGEEVARAM, Shankar et al. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of hazardous materials**, v. 146, n. 1-2, p. 270-277, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.017>
- COUTINHO, Pablo Wenderson Ribeiro et al. Alternativas de remediação e descontaminação de solos: biorremediação e fitorremediação. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 59-68, 2015. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1400>
- CUNHA, Claudia Duarte da et al. Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. 2008.
- D'ANNIBALE, Alessandro et al. Degradation of Aromatic Hydrocarbons by White-Rot Fungi in a Historically Contaminated Soil. **BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING**, v. 90, n. 6, 2005. <https://doi.org/10.1002/bit.20461>
- DATTA, Bejoysekhar. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from metal-contaminated soil. **Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci**, v. 17, n. 4, p. 965-968, 2015.

DAVIS, Mark W. et al. Field evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. **Environmental science & technology**, v. 27, n. 12, p. 2572-2576, 1993. <https://doi.org/10.1021/es00048a040>

DUFFUS, John H. " Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and applied chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>

ENGWA, G. Azeh et al. Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. **Poisoning in the modern world-new tricks for an old dog**, v. 10, p. 70-90, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82511>

ERRASQUIN, E. López; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere**, v. 50, n. 1, p. 137-143, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00485-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00485-X)

FARIAS, Christyan Paiva. Fungos promotores do crescimento vegetal e da fitorremediação de metais pesados em combinação com biochar. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2018.713>

FARIAS, Tuanny Fernanda Gonçalves. Seleção de *Enterococcus* sp. resistente a cobre e a mercúrio com potencial aplicação na biorremediação. 2016. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12101>

GAUTAM, Pavan Kumar et al. Heavy metals in the environment: fate, transport, toxicity and remediation technologies. **Nova Sci Publishers**, v. 60, p. 101-130, 2016.

GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASSO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GONÇALVES, P. E. R. S. et al. Distribuição espacial de metais potencialmente tóxicos em água superficial nas bacias dos rios Cuiabá e São Lourenço – MT. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, Porto Alegre, v.20, n.1, p.157-168, 2015. <https://doi.org/10.21168/rbrh.v20n1.p157-168>

GUSMÃO, Luiz Felipe Mendes de. **Efeitos do cobre e cromo na comunidade zooplanctônica: um estudo experimental em mesocosmos**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. <https://doi.org/10.11606/D.18.2004.tde-14102004-165206>

JASPERS, Stijn et al. A new semi-parametric mixture model for interval censored data, with applications in the field of antimicrobial resistance. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 71, p. 30-42, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2013.01.024>

LEMOS, Judith Liliana Solórzano et al. Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contando metais pesados. 2008.

LIAQUAT, Fiza et al. Efficient recovery of metal tolerant fungi from the soil of industrial area and determination of their biosorption capacity. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101237, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101237>

LIMA, Verônica Ferreira; MERÇON, Fábio. Metais pesados no ensino de química. **Química nova na escola**, v. 33, n. 4, p. 199-205, 2011.

LIU, Jing et al. Novel red mud/polyacrylic composites synthesized from red mud and its performance on cadmium removal from aqueous solution. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 213-222, 2020. <https://doi.org/10.1002/jctb.6223>

LONGA, Claudia Maria Oliveira; SAVAZZINI, Federica; PERTOT, Ilaria. Monitoramento de *Trichoderma atroviride* SCI em um Vinhedo no Nordeste da Itália: Considerações sobre Impacto Ambiental e Controle Biológico de *Armillaria mellea*. **Biocontrole de Doenças de Plantas**, p. 173.

LORITO, Matteo et al. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 395-417, 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114314>

LUCON, Cleusa Maria Mantovanello; CHAVES, Alexandre Levi Rodrigues; BACILIERI, Simone. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. **São Paulo: Instituto Biológico**, 2014. <http://repositoriobiologico.com.br/jspui/handle/123456789/177>

MARTÍNEZ-MEDINA, Ainhoa et al. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. **Phytochemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 223-229, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.008>

MASUTTI, Mariana Beraldo. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos**: uma análise laboratorial e "in situ" (experimentos em micro e mesocosmos). 2004. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2004. <https://doi.org/10.11606/T.18.2004.tde-23042012-102116>

MONTEIRO, Ana Sofia Lameira. **Avaliação da actividade antimicrobiana: exemplos de aplicação**. 2011. Tese de Doutorado. <https://doi.org/10400.15/1327>

MOREIRA, M. Identificação de consórcio bacteriano com potencial biotecnológico para biorremediação de arsênio e sulfato. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013. <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/3453>

MUDHOO, Ackmez; GARG, Vinod K.; WANG, Shaobin. Removal of heavy metals by biosorption. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 2, p. 109-117, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10311-011-0342-2>

MUKHERJEE, Prasun K. et al. *Trichoderma* research in the genome era. **Annu Rev Phytopathol**, v. 51, n. 1, p. 105-129, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

PINO, Gabriela Alejandra Huamán. Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (*Cocos nucifera*). **Pontifícia Universidade Católica-PUC**, 2005. <https://doi.org/10.17771/PUCRio.acad.7596>

QUINÁGLIA, Gilson Alves. **Caracterização dos níveis basais de concentração de metais nos sedimentos do sistema estuarino da baixada santista**. 2006. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. <https://doi.org/10.11606/T.46.2006.tde-09022007-133741>

RADHIKA, V.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. **Water research**, v. 40, n. 19, p. 3628-3636, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.013>

ROCHA, Jennifer Fernandes. **Biorremediação de zinco utilizando fungos filamentosos**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

RODRIGUES, Mônica Aparecida; SILVA, Priscila Pereira; GUERRA, Wendell. Cobre. **Química nova na escola**, v. 34, n. 3, p. 161-162, 2012.

SAÊTA, Venine Prado. **Bactérias tolerantes a metais**. 2021. 12 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021. <http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/19738>

SEREMETA, Daniele Cristina Hass. **Remoção de metais utilizando composto húmico proveniente do tratamento de lodo de esgoto industrial e tabaco de cigarro contrabandeado em reator**. 2019. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019. <http://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/2964>

SHARMA, Pratibha et al. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19898-19907, 2011. <https://doi.org/10.5897/AJBX11.041>

SIDDIQUEE, S. et al. Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: a review. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, n. 6, p. 384-93, 2015. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000243>

SILVA, Jessica Caroline Araujo et al. **Produção de enzimas holocelulolíticas acessórias pelo fungo mutante *Trichoderma atroviride* 102C1 em subprodutos agrícolas**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA ENZITEC, 7., 2016, Caxias do Sul. . **Anais eletrônicos** [...] Rio Grande do Sul: Caxias do Sul, 2016. Disponível em: <https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4415-enzitec2016.pdf>

ZEILINGER, Susanne et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. **Fungal biology reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>