

**EDNEI DA ASSUNÇÃO ANTUNES COELHO**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA  
BIORREMEDIAÇÃO NA MINA DE URÂNIO OSAMU UTSUMI**

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências.

**SÃO PAULO**

2019

**EDNEI DA ASSUNÇÃO ANTUNES COELHO**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO  
NA MINA DE URÂNIO OSAMU UTSUMI**

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

SÃO PAULO

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Coelho, Ednei  
ISOLAMENTO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA  
BIORREMEDIAÇÃO NA MINA DE URÂNIO OSAMU UTSUMI /  
Ednei Coelho; orientador Benedito Corrêa. -- São  
Paulo, 2019.  
90 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biorremediação. 2. Mina de urânio. 3. Fungos.  
4. Osamu Utsumi. I. Corrêa, Benedito, orientador.  
II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidato: Ednei da Assunção Antunes Coelho

Título da TESE: Isolamento de fungos com potencial para biorremediação na mina de urânio  
Osamu Utsumi.

Orientador: Prof. Dr. Bendito Corrêa

A comissão julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública  
realizada \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, considerou o(a)

**Aprovado**                       **Reprovado**

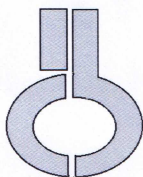
**Examinador(a):** Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Examinador(a):** Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Examinador(a):** Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Examinador(a):** Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Presidente:** Assinatura: .....  
Nome: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **699/14** referente ao projeto intitulado: "*Fungos com potencial para biorremediação de metais pesados em mina de urânio desativada*" sob a responsabilidade de **Ednei Assunção Antunes Coelho**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 13 de novembro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esse trabalho ao meu querido pai Nelson Coelho (in memoriam) e a minha mãe Leonice Assunção, aos meus irmãos, amigos e a minha namorada Denise, essas são as pessoas que sempre acreditaram nos meus sonhos e objetivos.

Obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa, por sua confiança, amizade, apoio e principalmente por acreditar no meu potencial para a elaboração de um projeto de pesquisa tão importante.

À Tatiana Alves dos Reis, pela amizade, compreensão, apoio técnico e por ser uma excelente pesquisadora e funcionária do Laboratório de Micotoxinas, obrigado pelos ensinamentos e trocas de experiências que foram cruciais para a elaboração de todos os meus experimentos e tese.

Ao amigo Rodrigo Cardoso pelo seu apoio e amizade durante todos esses anos de elaboração do projeto de pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Micotoxinas Lorena Carnielli, Karim Piacentini, Livia Fontes, Vinicius Schievano, Luciana Gimenez pela amizade e parceria durante o trabalho.

Ao Instituto de química e meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, pelo suporte nas análises de urânio.

À Marycel Cotrim pelo apoio dado durante a elaboração do projeto de pesquisa, disponibilizando todos os materiais para a realização dos testes de bio-sorção.

À Fernanda e a Professora Márcia Rizutto do Instituto de física da USP, pela ajuda com os testes de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Walter, funcionário da mina de urânio Osamu Utsumi, pelo apoio técnico durante a coleta das amostras.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À Deus, por tudo.

“Se vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton.



## RESUMO

COELHO, E. A. A. Isolamento de fungos com potencial para biorremediação na mina de urânio Osamu Utsumi. 2019. 90p. Tese (Doutorado em: Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A mina Osamu Utsumi das indústrias nucleares do Brasil (INB), localizada no município de Caldas/MG, foi a primeira mina de extração de urânio no Brasil e teve suas atividades encerradas em 1995. Desde então apresenta problemas de reabilitação das áreas contaminadas devido aos elevados níveis de contaminação de urânio. Neste sentido, a biorremediação surgiu como tecnologia alternativa para a remediação de locais contaminados com metais pesados. Assim, a presente investigação teve como objetivo geral isolar e caracterizar espécies fúngicas resistentes ao urânio de solo, água e sedimento da mina de urânio Osamu Utsumi e avaliar a capacidade de remoção de urânio por esses microrganismos. O pH das amostras de água foi entre 3,16 e 3,48. A concentração de urânio nas amostras foi de 58 a 268 mg/kg (solo), 1,05 a 4,46 mg/L (água) e 283 a 488 mg/kg (sedimento). A média de atividade de água ( $A_w$ ) das amostras de solo foi de 0,97. Das amostras analisadas, foram isolados e identificados 57 fungos, sendo o gênero *Penicillium* o mais prevalente. Nos testes de tolerância, 38 % (22) dos isolados fúngicos foram considerados tolerantes ao urânio, com destaque para 5 isolados de *Penicillium piscarium*. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) revelou crescimento de 48 fungos em elevadas concentrações de urânio (2000mg/L). A Análise da concentração inibitória mínima (CIM) demonstrou o crescimento de 25 fungos em concentrações de 8000 mg/L. Os testes de bioabsorção, com biomassa viva dos fungos, demonstraram que 11 espécies fúngicas foram consideradas com alto potencial para biorremediação do metal. Ao compararmos os testes de resistência/tolerância com capacidade de bioabsorção do metal, concluímos que os fungos isolados da mina Osamu Utsumi com alto potencial para biorremediação de urânio foram *Gongronella butleri*, *Penicillium piscarium*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium ludwigii*, *Talaromyces amestolkiae*.

**Palavras-chave:** Mina de urânio. Fungos. Biorremediação. Osamu Utsumi.

## ABSTRACT

COELHO, E. A. A. Isolation of fungi with potential for bioremediation from Osamu Utsumi uranium mine. 2019. 90p. Ph. D. Thesis (Department of Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The Osamu Utsumi mine from Industrias Nucleares do Brasil (INB), located in the city of Caldas/MG, was the first uranium extraction mine in Brazil and closed its activities in 1995. Since then, it has problems in rehabilitating contaminated areas due to high levels of uranium contamination. In this regard, bioremediation emerged as an alternative technology for the remediation of sites contaminated with heavy metals. The aim of the present investigation was to isolated and characterized fungal species resistant to uranium from soil, water and sediment from Osamu Utsumi uranium mine and evaluated the uranium removal capacity from these microorganisms. The pH of the water samples was between 3.16 and 3.48. The uranium concentration from the samples was 58 to 268 mg/kg (soil), 1.05 to 4.46 mg/L (water) and 283 to 488 mg/kg (sediment). The mean water activity ( $W_a$ ) of the soil samples was 0.98. From the samples, 57 fungi were isolated, with *Penicillium* being the most frequent species. In the tolerance tests, 38% (22) of the fungal isolates were considered tolerant to uranium, with emphasis on 5 *Penicillium piscarium* isolates. The mycelial growth rate revealed growth of 48 fungi at high concentrations of uranium tested (2000mg/L). Minimal inhibitory concentration (MIC) analysis showed growth of 25 fungi at concentrations of 8000 mg/L. Biosorption tests with live fungal biomass showed that 11 species were considered as having high potential for bioremediation of the uranium. When comparing the resistance/tolerance tests with uranium biosorption capacity, we concluded that the fungi isolated from the Osamu Utsumi mine with the best potential for uranium bioremediation were *Gongronella butleri*, *Penicillium piscarium*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium ludwigii*, *Talaromyces amestolkiae*.

**Keywords:** Uranium mine. Fungi. Bioremediation. Osamu Utsumi.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Vista panorâmica da cava da mina Osamu Utsumi.....   | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Vista parcial da pilha de rejeitos Bota-fora 4.....  | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Ilustração mostra como ocorre a drenagem ácida de mina.....  | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Bacia BIA localizada na mina de urânio Osamu Utsumi.....   | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Estação de tratamento de águas da mina de urânio Osamu Utsumi.....   | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Colunas de troca iônica na estação de tratamento da mina Osamu Utsumi.....   | 23 |
| <b>Figura 7.</b> Mina Osamu Utsumi, locais de coleta das amostras estão indicados por pontos escuros.....   | 34 |
| <b>Quadro 1.</b> Locais de coleta e número de amostras coletadas na mina de urânio.....   | 35 |
| <b>Tabela 1.</b> Localização por GPS dos pontos de coleta e tipo de amostras.....   | 36 |
| <b>Quadro 2.</b> Caracterização química (pH e concentração de urânio) das amostras de solo, água e sedimento da mina de urânio Osamu Utsumi.....  | 46 |
| <b>Figura 8.</b> Concentração de urânio nas amostras de solo, água e sedimento. O gráfico indica o possível efeito da drenagem ácida de mina..... | 47 |
| <b>Figura 9.</b> Escadouros (valas) construídos ao redor das pilhas de rejeitos na mina de urânio Osamu Utsumi.....                               | 48 |
| <b>Figura 10.</b> Efluente proveniente da pilha de rejeitos bota-fora 4.....  | 49 |
| <b>Figura 11.</b> Água ácida proveniente da pilha de rejeitos bota-fora 4 captada na bacia BNF.....   | 50 |
| <b>Quadro 3.</b> Identificação de fungos isolados da mina Osamu Utsumi.....   | 52 |
| <b>Figura 12.</b> Árvore filogenética dos fungos isolados na mina Osamu Utsumi (ITS).....   | 54 |
| <b>Figura 13.</b> Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Penicillium</i> isoladas da mina Osamu Utsumi (beta-tubulina).....                | 56 |
| <b>Figura 14.</b> Índice de tolerância ao urânio (U-IT) dos 57 fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi.....                                | 59 |
| <b>Figura 15.</b> Relação entre os 22 fungos tolerantes (U-IT) com o tipo de amostra de onde foram isolados.....                                  | 59 |
| <b>Tabela 2.</b> Velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos 57 fungos isolados da mina Osamu Utsumi.....                                       | 60 |
| <b>Figura 16.</b> Fungo código 42 ( <i>Talaromyces amestolkiae</i> ), crescendo em meio PDA suplementado com 0, 1000 e 2000 mg/L de urânio.....   | 62 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17.</b> Isolados fúngicos da mina de urânio Osamu Utsumi apresentaram mudanças na morfologia e produção de pigmentos.....  | 63 |
| <b>Figura 18.</b> Teste de bioissorção dos 57 isolados fúngicos da mina de urânio Osamu Utsumi.....  | 65 |
| <b>Quadro 4.</b> Resultados dos testes de resistência e tolerância com os testes de bioissorção de urânio, realizados com 57 fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi..... | 67 |
| <b>Figura 19.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa viva do fungo <i>Penicillium piscarium</i> .....   | 69 |
| Figura 20. Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) identifica os elementos existentes nas hifas do fungo (biomassa não exposta ao urânio.....                                 | 71 |
| <b>Figura 21.</b> Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) identifica os elementos existentes nas hifas do fungo (biomassa exposta ao urânio.....                              | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BIA – Bacia de captação de água ácida BIA
- CAVA – Cava da mina
- BF-8 – Pilha de rejeitos bota fora-8
- BF-4 – Pilha de rejeitos bota fora-4
- BNF – Bacia de captação de água ácida BNF
- DUCA – Diuranato de cálcio (resíduo)
- U<sub>3</sub>O<sub>8</sub> – Octóxido de triurânio
- INB – Indústrias Nucleares do Brasil
- PRAD – Plano de Recuperação de Áreas Degradadas
- DAM – Drenagem Ácida de Mina
- FeS<sub>2</sub> – Pirita
- U – Urânio
- UO<sub>2</sub> – Dióxido de urânio
- GPS – Global Positioning System
- Aa – Atividade de água
- PDA – Potato Dextrose Agar (ágar batata)
- ITS – Internal Transcribed Spacer
- BenA* – Gene beta-tubulina
- U-IT – Índice de tolerância ao urânio
- CIM – Concentração inibitória mínima
- IVCM – Índice de velocidade de crescimento micelial
- WDXRF - Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de onda
- ICP OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma de Argônio
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 16 |
| <i>1.1 Mineração</i> .....  | 16 |
| <i>1.2 Mina Osamu Utsumi, a primeira mina de extração de urânio do Brasil</i> ..... | 17 |
| <u>1.2.1 Drenagem ácida de mina</u> .....   | 19 |
| <i>1.3 Metais pesados</i> .....   | 23 |
| <u>1.3.1 Urânio</u> .....   | 24 |
| <b>1.3.1.1 Dispersão de urânio no ambiente</b> .....                                | 25 |
| <b>1.3.1.2 Toxicidade do urânio</b> .....   | 26 |
| <b>1.3.1.3 Contaminação de urânio na mina Osamu Utsumi</b> .....                    | 27 |
| <i>1.4 Biorremediação</i> .....   | 28 |
| <i>1.5 Fungos com potencial para biorremediação de metais pesados</i> .....         | 30 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 33 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 34 |
| <i>3.1 Coleta de amostras</i> .....   | 34 |
| <i>3.2 Caracterização química das amostras</i> .....                                | 37 |
| <i>3.3 Atividade de água do solo (Aa) e pH das amostras de água</i> .....           | 37 |
| <i>3.4 Isolamento de fungos de solo, água e sedimento</i> .....                     | 37 |
| <i>3.5 Identificação dos fungos isolados</i> .....                                  | 38 |
| <u>3.5.1 Identificação morfológica dos fungos</u> .....                             | 38 |
| <u>3.5.2 Identificação molecular das espécies fúngicas</u> .....                    | 38 |
| <b>3.5.2.1 Extração de DNA ribossomal (DNAr)</b> .....                              | 38 |
| <b>3.5.2.2 Diluição do DNA</b> .....  | 39 |
| <b>3.5.2.3 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)</b> .....                           | 39 |
| <b>3.5.2.4 Purificação do produto da PCR</b> .....                                  | 40 |
| <b>3.5.2.5 Reação de sequenciamento</b> .....                                       | 40 |

|   |    |
|---|----|
| <b>3.5.2.6 Separação eletroforética</b> .....   | 40 |
| <b>3.5.2.7 Análise dos dados e árvore filogenética</b> .....  | 41 |
| <i>3.6 Índice de tolerância ao urânio (U-IT), concentração inibitória mínima (CIM) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)</i> .....    | 41 |
| <i>3.7 Teste de bioSORÇÃO com biomassa viva</i> .....   | 42 |
| <u>3.7.1 Preparação de biomassa viva</u> .....  | 42 |
| <u>3.7.2 Contato da biomassa viva com o urânio</u> .....  | 43 |
| <u>3.7.3 Identificação de urânio na célula fúngica</u> .....  | 43 |
| <i>3.8 Análise estatística</i> .....  | 43 |
| <i>3.9 Fluxograma de atividades</i> .....   | 44 |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 45 |
| <i>4.1 Caracterização química das amostras</i> .....  | 45 |
| <u>4.1.2 Efeitos da drenagem ácida de mina</u> .....  | 47 |
| <i>4.2 Diversidade fúngica</i> .....  | 51 |
| <u>4.2.1 Identificação dos isolados fúngicos</u> .....  | 51 |
| <i>4.3 Índice de tolerância (U-IT), Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados</i> ..... | 58 |
| <u>4.3.1 Índice de tolerância ao urânio (U-IT)</u> .....  | 58 |
| <u>4.3.2 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)</u> .....  | 60 |
| <u>4.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)</u> .....   | 62 |
| <i>4.4 Teste de bioSORÇÃO</i> .....   | 64 |
| <u>4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u> .....  | 68 |
| <i>4.5 Considerações finais</i> .....   | 71 |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....   | 73 |
| <b>6 REFERÊNCIAS</b> .....  | 75 |

# 1 INTRODUÇÃO

## *1.1 Mineração*

As atividades de mineração, realizadas de forma sustentável, ainda são de extrema importância para o desenvolvimento econômico. Oferecendo diversas fontes de matéria prima para as indústrias, a mineração foi essencial para o processo interiorização do país. A extração de minérios ajuda no equilíbrio financeiro do Brasil, fazendo parte de mais de 5% do produto interno bruto (PIB) e, conseqüentemente, a geração de milhares de empregos de maneira direta e indireta (IBRAM, 2015). Entretanto, as atividades de mineração ainda são marcadas negativamente por apresentarem impactos na saúde pública, com danos locais, regionais e globais ao meio ambiente (SUH et al., 2017). De forma geral, a extração de minérios causa impactos negativos como: supressão da vegetação, exposição do solo aos processos de erosão, contaminação por metais pesados de solo, água, inundações, desmatamento entre outros problemas relacionados a essas atividades (FERRARI, 2010).

Para redução de impactos causados pela atividade de mineração é necessário a realização de estudos levando em consideração todo o ciclo do processo de mineração, com a exploração mineral (pesquisa da jazida), desenvolvimento da mina, lavra e exaustão da jazida (onde se encerra o empreendimento) (CIPRIANI, 2002).

Só a partir dos anos 1970, após a identificação de problemas relacionados às escavações desenfreadas, que começaram a surgir regulamentações das atividades de mineração em vários países do mundo (AGI, 2018). No Brasil, várias minas já estavam em atividade quando passou a vigorar o decreto nº 97.632 de 10 de abril de 1989, que criou a obrigatoriedade na recuperação de áreas degradadas, realizando o estudo do impacto ambiental e apresentando o relatório ao órgão ambiental competente (LIMA; FLORES; COSTA, 2006), porém várias empresas não seguiram essas regras.

A falta de regulamentações no passado e de fiscalizações por órgãos competentes dos processos de extração de minérios, podem estar diretamente relacionadas aos problemas que enfrentamos atualmente com os rejeitos de mineração. Temos como exemplo as tragédias ambientais de Mariana e Brumadinho em Minas Gerais, onde após a destruição das barragens de contenção, toneladas de rejeitos de mineração acabaram provocando destruição de locais e danos imensuráveis à vida e ao meio ambiente.



No Brasil, problemas relacionados à disposição e tratamento de rejeitos são muito frequentes, destacando-se entre as técnicas convencionais utilizadas para remediação a remoção do rejeito para um aterro ou simplesmente “tampar” e conter as áreas contaminadas no local. Essas alternativas apresentam desvantagens, na primeira podem ocorrer problemas nas áreas de escavação com o manuseio e disposição do material perigoso além dos custos do processo, já a segunda alternativa é uma solução provisória, visto que o material permanece no ambiente, o que exige monitoramento e manutenção das barreiras de isolamento entre outros custos e perigos (VIDALI, 2001).

Portanto, devemos considerar que as atividades de mineração apresentam prós e contras, sendo necessários estudos prévios sobre os impactos da extração de minérios, adequada disposição e tratamento de rejeitos, visando reduzir os danos relacionados ao extrativismo mineral.

### *1.2 Mina Osamu Utsumi, a primeira mina de extração de urânio do Brasil*

Após a segunda guerra mundial e início da chamada guerra fria, iniciou-se uma corrida visando deter o comércio de tecnologia e minerais provenientes da indústria nuclear (FETTUS; MCKINZIE, 2012). Durante o conselho de segurança das nações unidas (ONU), o Brasil deixou claro a possibilidade de atuar em conjunto com os Estados Unidos, porém o representante do Brasil no conselho Almirante Álvaro Alberto da Mota, entendeu que o plano Baruch (Propostas dos EUA para regulamentação e gestão internacional das atividades atômicas) era uma restrição a soberania e segurança nacional, assim, através da aliança entre militares e cientistas surgiu o Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), marcando o início da história da energia nuclear no Brasil (MARIA; ANDRADE, 2012)

Em 1959, iniciou-se a construção da mina de urânio Osamu Utsumi, com as reservas calculadas em aproximadamente 17.200 toneladas de octóxido de triurânio ( $U_3O_8$ ) ou “yellow cake” (SOUZA; SILVEIRA; PEREIRA, 2013). Localizada na região do planalto do município de Caldas/MG, a mina Osamu Utsumi das Indústrias Nucleares do Brasil (INB), a primeira mina de extração de minério de urânio do Brasil, esteve em operação de 1982 a 1995, com produção total de 1.030 toneladas de urânio, bem abaixo do que se esperava extrair (CIPRIANI, 2002; NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008).

Estima-se que os custos totais da implantação da mina foram de U\$ 230 milhões, sendo a escavação realizada pelo processo de decapagem. O formato circular da cava da mina é de

aproximadamente 1200 metros de diâmetro por 176 de profundidade (Figura 1) (CIPRIANI, 2002; FAGUNDES, 2008).

Figura 1 – Vista panorâmica da cava da mina Osamu Utsumi. (Foto: Ednei Coelho).



Com o esgotamento das jazidas de Caldas e o descobrimento das reservas de Caetité/BA, a mina Osamu Utsumi encontra-se desde 1995 em fase de descomissionamento. A obrigação fundamental imposta aos titulares de concessão de lavra no Brasil, com relação ao fechamento da mina, é que eles promovam a reabilitação das áreas impactadas pelas atividades de mineração de acordo com o PRAD (Plano de Recuperação de Áreas Degradadas) previamente elaborado e aprovado pelo órgão governamental competente, porém, no caso da mina Osamu Utsumi, isso não aconteceu pois a legislação só entrou em vigor após a mina estar em funcionamento (DUTRA et al. 2013).

Depois de identificado o problema causado pela extração de urânio na área da mina, em fevereiro de 2004, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) juntamente com a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) firmou um termo de referência para elaboração e apresentação do PRAD para o complexo minero-industrial da cidade de Caldas/MG, operação voltada para tentar deixar as condições da região da mina o mais próximo possível da existente antes do início da sua implantação, com a remediação, reflorestamento, restauração do local (LIMA; FLORES; COSTA, 2006; NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008).

Com a ausência de legislações rigorosas sobre a exploração do minério no Brasil, na época da implantação da mina de urânio, não houve um controle adequado na disposição de rejeitos (SOUZA; SILVEIRA; PEREIRA, 2013).

Durante a exploração da jazida de urânio, o material oriundo da decapagem da mina, caracterizado inicialmente como estéril, era encaminhado aos locais conhecidos como “bota-foras” (BFs), esses são chamados de BF-4 e BF-8 com volume de 12,4 e 14,8 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos, respectivamente, e altura de 90 metros (Figura 2) (CIPRIANI, 2002; SOUZA; SILVEIRA; PEREIRA, 2013).

Figura 2 – Vista parcial da pilha de rejeitos Bota-fora 4. (Foto: Ednei Coelho).



A disposição das pilhas de rejeitos originou a formação de montanhas de rochas que podem estar diretamente relacionados a formação de drenagem ácida de mina (DAM), aumentando a concentração de metais pesados e radionuclídeos em rios e lagos na área da mina e proximidades (FAGUNDES, 2008).

### 1.2.1 Drenagem ácida de mina

O principal problema enfrentado pela INB-Caldas para recuperação na região onde funcionava a mina é a drenagem ácida de mina (DAM).

A DAM, é basicamente causada pela exposição de rochas ao oxigênio. Quando a água da chuva, por exemplo, invade as pilhas de rejeitos de mineração, ocorre a interação entre oxigênio, água e sulfetos metálicos, esse processo leva a formação de ácido sulfúrico. O ácido

sulfúrico então dissolve os metais pesados das rochas, e a água ácida com metais (efluentes) se espalha por toda parte contaminando rios, lagos e lençóis freáticos, causando a morte de animais e plantas (Figura 3) (AKCIL; KOLDAS, 2006; FAGUNDES, 2008).

Figura 3 – Ilustração mostra como ocorre a drenagem ácida de mina (DAM)



Os microrganismos ambientais podem também causar a oxidação dos sulfetos metálicos (MARTINS et al. 2004). Na área da mina Osamu Utsumi, a grande concentração de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) nos Bota-foras é a principal responsável pela acidez da água (SOUZA; SILVEIRA; PEREIRA, 2013).

A DAM pode gerar efluentes com altas concentrações de metais pesados, a formação de ácido sulfúrico eleva a acidez da água com pH entre 2 e 3, solubilizando metais pesados e radionuclídeos, comprometendo a qualidade dos recursos hídricos da região afetada (LYEW; SHEPPARD, 1997; NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008). Os BFs da mina Osamu Utsumi tem contribuição importante na geração de DAM (NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008).

Todo o processo de DAM pode causar mudanças na coloração da água, devido aos processos de oxidação, impossibilitando o consumo por animais e seres humanos. Quando o pH da água está entre 3,5 e 4 o  $\text{Fe}^{3+}$  é precipitado em hidróxido de ferro  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , o que causa

a coloração alaranjada da água (ROYCHOWDHURY; SARKAR; DATTA, 2015), esse processo pode ser observado nas bacias formadas na área da mina Osamu Utsumi (Figura 4) .

Figura 4 – Bacia BIA localizada na mina de urânio Osamu Utsumi. (foto: Ednei Coelho).



Após constatado o problema com a DAM na mina, o CNEN determinou que o tratamento das águas fosse obrigatório. Atualmente o tratamento químico é executado na estação de tratamento de águas marginais da mina (Figura 5), elevando o pH da água é utilizado hidróxido de cálcio, os floculantes auxiliam a etapa de separação sólido-líquido, esse tratamento gera um precipitado de lama alcalina e escura conhecida como diuranato de cálcio (DUCA), que é depositado na cava da mina há mais de 20 anos, a cava, por sua vez, encontra-se inundada de água ácida (FAGUNDES, 2008; FERRARI, 2010; GOMES; LADEIRA, 2011). Segundo os técnicos da mina o gasto anual com o tratamento de água contaminada é de R\$ 2 milhões.

Na área da mina outros tipos de tratamento vêm sendo estudados e implantados, com o objetivo de controlar a contaminação do ambiente pelos metais. Uma das ideias é a utilização de ozônio para descontaminação de solo e água, sendo o ozônio um gás que pode oxidar os metais pesados existentes na água, e no solo a ideia é injetar ozônio nas montanhas de rejeitos (bota-foras) eliminando as bactérias que oxidam os sulfetos metálicos. Porém, a viabilidade desses processos é bastante discutida, pois poderia gerar um alto consumo muito alto de energia na produção de ozônio e não se sabe se seria possível injetar ozônio nas imensas pilhas de rejeitos.

Figura 5 – Estação de tratamento de águas da mina de urânio Osamu Utsumi. (Foto: Ednei Coelho).



O tratamento da água utilizando resinas no sistema de coluna de troca iônica também está sendo estudado e implantado (Figura 6), neste caso, o sulfato de urânio se adere a resina porosa que possuem cargas eletrostáticas, quando ocorre a saturação da resina é realizada a eluição do urânio com amônia ou sódio, formando diuranato de amônio ou sódio, que são colocados em tambores e enviados para a INB Caetité/BA, onde o urânio é purificado. Esse processo pode gerar até 13 toneladas de urânio por ano, isso não é interessante, pois o objetivo é o fechamento total da mina.

Figura 6 – Colunas de troca iônica na estação de tratamento da mina Osamu Utsumi. (Foto: Ednei Coelho).



De acordo com Elbaz-Poulichet et al. (1999) e Poston et al. (1984), as atividades de mineração podem levar ao aumento de metais pesados e radionuclídeos, como o urânio, em águas naturais.

### *1.3 Metais pesados*

Dentre os vários agentes poluentes do ambiente de mineração, os metais pesados recebem atenção especial, uma vez que alguns são extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos, mesmo em quantidades muito baixas, pois são elementos muito reativos e bioacumuláveis nos organismos vivos (ELDERFIELD; UPSTILL-GODDARD; SHOLKOVITZ, 1990; GOMES; MENDONCA-HAGLER; SAVVAIDIS, 1998; NIES, 1999; RAHMAN et al. 2002; SILVA, 2009; VALDMAN; LEITE, 2000).

O termo “metal pesado” é arbitrário e impreciso. Raskin et al. (1994), por uma questão de simplicidade, definiram como metal pesado qualquer elemento com propriedade metálica (ductilidade, densidade, condutividade) e um número atômico maior que 20.

Em muitos casos, os metais pesados são definidos como aqueles que apresentam uma alta densidade, superior a  $5 \text{ g/cm}^3$ , e que mesmo em baixas concentrações são tóxicos (JÄRUP,

2003). Essa definição atualmente ainda é muito discutida, pois alguns metais “leves” ou metaloides também são tóxicos, assim como alguns com alta densidade não apresentam toxicidade, por exemplo o ouro não é considerado tóxico, mas apresenta um número atômico 79 e densidade 19,32 g/cm<sup>3</sup>. Uma classificação biologicamente relevante de metais pesados, conforme sua toxicidade e propriedades químicas precisa ser proposta (DUFFUS, 2002).

Em alguns metais, a toxicidade vai depender do seu estado alotrópico ou oxidativo, por exemplo, o cromo hexavalente é altamente letal, principalmente por suas propriedades cancerígenas, enquanto o cromo trivalente é significativamente nutricional para vários organismos, inclusive para os humanos (WUNDERLIN, 2018).

Em alguns casos, vários metais pesados são micronutrientes, e assim essenciais para sistemas biológicos e devem estar presentes em baixas concentrações (níveis adequados), assim fornecem cofatores essenciais para proteínas e enzimas, como por exemplo o ferro. Porém, em concentrações elevadas ou se ingeridos a longo prazo, os metais pesados podem se tornar tóxicos, bloqueando grupos funcionais, deslocando outros íons metálicos ou modificando a atividade biológica das moléculas (BHAT; KHAN, 2011; COLLINS; STOTZKY, 1989; GARBISU; ALKORTA, 2003).

### 1.3.1 Urânio

O urânio (U) é um metal denso (19,1 g/cm<sup>3</sup>) que possui baixa radioatividade e é naturalmente encontrado em rochas, solo, água, ar, plantas e animais. O U apresenta um número atômico 92, sendo encontrado na natureza em pequenas concentrações em partes por milhão, porém quando a quantidade encontrada é grande suficiente o metal é então comercialmente extraído (ROBERTS, 2012).

Após a remoção do urânio do solo, as rochas são trituradas e, dependendo de como será o processo, soluções químicas (como solventes) são utilizadas para separação do metal de outras substâncias indesejadas (SPOON, 2019). O metal é inicialmente separado em dióxido de urânio (UO<sub>2</sub>), ou em outras formas químicas, através de uma série de processos químicos conhecidos como “moagem do minério”, esses processos buscam a obtenção do “yellow cake” ou urânio concentrado, os remanescentes da moagem, chamados de rejeitos, são coletados e armazenados (USNRC, 2017).

O urânio natural (UO<sub>2</sub>) é amplamente distribuído na natureza, está presente em cerca de 160 minerais como a uranita, cleveite, becquerelite, autunita, carnotita e pechblenda, e é



constituído por três isótopos alfa:  $^{238}\text{U}$  (99,2745%),  $^{235}\text{U}$  (0,7200%) e  $^{234}\text{U}$  (0,0054%) (OLSZEWSKI; BORYŁO; SKWARZEC, 2015).

Devido à alta capacidade de mobilização do metal no ambiente por carbonatos e fosfatos o teor de urânio presente na natureza pode variar. Em rochas, solo e sedimento O  $^{238}\text{U}$  e  $^{234}\text{U}$  estão relativamente em equilíbrio, ou seja, no ambiente natural não estão em seu estado radioativo (MEINRATH; SCHNEIDER; MEINRATH, 2003; OLSZEWSKI; BORYŁO; SKWARZEC, 2015).

Com a manipulação dos isótopos de U podem ser obtidas variações menos radioativas, como o  $^{238}\text{U}$  que podem ser utilizadas na produção de projéteis (munições) ou blindagens de tanques de guerra e aviões, sendo esse composto até 2 vezes mais pesado que o aço, ou a variação mais radioativa ( $^{235}\text{U}$ ) “fissil” que é utilizada na produção de armas e em usinas nucleares (HARDER, 2019).

A concentração de urânio no ambiente pode ser também elevada devido às atividades humanas, como utilização de fertilizantes fosfatados na agricultura, resíduos industriais ou utilização para fins militares (OHJI, 2012).

### **1.3.1.1 Dispersão de urânio no ambiente**

A proximidade do urânio com fontes de água é o principal fator responsável pela dispersão do metal pesado no ambiente, sua dispersão depende do seu estado oxidativo, o qual pode ser hexavalente U(VI) ou tetravalente U(IV). O U(VI) apresenta alta solubilidade em água, principalmente em condições ácidas, já em seu estado reduzido o U(IV) é basicamente “imóvel” e insolúvel e com baixa toxicidade, pois a sua disponibilidade para os organismos é reduzida (GAD, 2017).

Sob condições redutoras, o urânio é imobilizado, principalmente na presença de quantidades significativas de fosfato, cálcio, sulfato e potássio, onde ocorre a formação de compostos estáveis e complexos sendo o metal precipitado no meio (ELLESS; LEE, 1998).

Em solo, sedimento e água o urânio é sensível aos processos corrosivos, sendo transformado na sua forma solúvel U(VI), como por exemplo sulfato de urânio ( $\text{U}(\text{SO}_4)_2$ ). Os seres humanos são afetados através da ingestão de alimentos, consumo de água contaminada ou inalação, sendo a água a fonte de contaminação mais significativa (KURTTIO et al. 2002; SILVA; SOUZA; AMARAL, 2003).

### 1.3.1.2 Toxicidade do urânio

Devido à baixa radioatividade do urânio natural, os efeitos a saúde são geralmente atribuídos às suas propriedades químicas e não radioativas (NRC, 2012).

O U solúvel em água é caracterizado pelo seu potencial tóxico, é prejudicial aos organismos aquáticos, plantas e humanos, assim como todos os organismos expostos aos efluentes que são procedentes de minas de urânio (CUMBERLAND et al. 2016).

Os estudos sob os efeitos químicos do urânio em humanos ainda são escassos, porém sabe-se que a ingestão de 200 mL água contendo 1g de nitrato de urânio causa como efeito agudo náuseas, vômito e diarreia (BUTTERWORTH, 1955).

Estudos sugerem que os humanos são menos sensíveis aos efeitos do urânio, sendo indicada uma ordem de sensibilidade aos seus efeitos de: coelhos>camundongos>porcos>ratos>cães>gatos e humanos (VICENTE-VICENTE et al. 2010).

Na Índia, em vilarejos existentes próximos de áreas de mina de urânio, foram realizados estudos com crianças com idade entre 6-12 anos, essas crianças viviam expostas à água contaminada com urânio, os resultados revelaram alterações no esmalte dos dentes, atraso no crescimento dos dentes, comparado às crianças que não vivem em regiões próximas à mina (KAR; SHETTY; HEGDE, 2016; SHETTY; HEGDE; KAR, 2016).

Também na Índia, um paciente de 12 anos apresentou diminuição na produção de urina e fortes dores nas articulações, acreditava-se inicialmente que se tratava de diabetes, após serem esgotadas todas as hipóteses, foi diagnosticada uma intoxicação causada pela ingestão de água contaminada com urânio. Foi realizada cirurgia para a remoção dos rins, porém as dores nas articulações continuaram, foi detectado posteriormente um osteossarcoma, um tipo de câncer ósseo, possivelmente causado pelo acúmulo do U nos rins (PANNU; SUKHMANI; GILL, 2015).

Os seres humanos também podem ser contaminados por urânio através da ingestão de alimentos, principalmente raízes tuberosas como batata e nabo. A quantidade de urânio nesses dependerá da concentração do metal no local em que foram cultivados. Nestes locais, a ingestão humana diária de U é estimada em até 1 micrograma de U por dia ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) (ATSDR, 2019).

Na maioria das vezes, o urânio ingerido e inalado, não é absorvido, mais de 90% é eliminado do corpo através das fezes ou urina, em alguns casos, quando inalado, pode permanecer nos pulmões por longos períodos (VDH, 2016).

Quase 66% do U absorvido permanece depositado na superfície dos ossos, por até 200 dias, e vai sendo lentamente distribuído para a medula óssea, podendo causar leucemia e diminuição da resposta imune, também pode acumular-se no fígado (16%) e rins (8%) e causar danos nesses órgãos (ATSDR, 2019; CAPPELLO; MACARIO, 2019).

Estudos sugerem uma forte correlação entre os ambientes com altas concentrações urânio e a alta prevalência de leucemia em pessoas que vivem próximas destas áreas, principalmente por causa do consumo de água de poço, carne de animais e inalação de poeira (WINDE; ERASMUS; GEIPEL, 2017).

Alterações na histologia pulmonar foram observadas em camundongos expostos por 5 semanas a 10 mg/U/m<sup>3</sup> de nitrato de urânio (WHO, 2018). O urânio também pode afetar as funções o fígado alterando funções hepáticas, como o metabolismo de ácidos biliares (GUÉGUEN et al. 2006).

Através da alimentação, camundongos foram submetidos a baixas (0,05 mg U/kg/dia) e altas (7000 mg U/kg/dia) concentrações de urânio, em ambos os casos foram detectadas lesões nos rins. Em baixas concentrações ocorreram lesões microscópicas no epitélio tubular e nas altas, as lesões aumentaram e causaram necrose após 30 dias de experimento (MAYNARD; HODGE, 1949).

### **1.3.1.3 Contaminação de urânio na mina Osamu Utsumi**

Dados de monitoramento de água nas áreas próximas da mina Osamu Utsumi demonstraram aumento no teor urânio e outros metais pesados, como o ferro, em córregos e bacias hidrográficas os níveis de concentração estavam acima dos limites estabelecidos na resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA nº 357/05) alterada pela Resolução nº 410/2009 e 430/2011. Esta resolução dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes para seu enquadramento e condições padrões de lançamento de efluentes (CNEN, 2012; LADEIRA; GONÇALVES, 2007; NASCIMENTO; FATIBELLO-FILHO; TEIXEIRA, 2004; NÓBREGA; LIMA; LEITE, 2008).

De acordo com a resolução do CONAMA, a água proveniente dos rios próximos da área da mina são classificadas em classe II, podendo ser usada para recreação, agricultura, irrigação e consumo humano, após um tratamento simples, neste caso o limite máximo de urânio permitido é de 0,02 mg/L (PEDROBOM et al. 2017).

Atualmente o tratamento de urânio em ambientes contaminados é realizado através de métodos químicos e físicos, alguns exemplos são a extração cromatográfica, precipitação química, coluna de troca iônica. Esses métodos têm aplicações limitadas, pois não apresentam muita eficiência quando o urânio solúvel em água (VI) está em concentrações de 1 a 100 ppm (YANG et al. 2012).

A descontaminação dos ambientes aquáticos por metais pesados necessita de soluções alternativas, como a biorremediação. A utilização de fungos como agentes biorremediadores de contaminantes do solo e água vêm sendo estudada, os fungos apresentam alta capacidades metabólicas que podem ser aplicadas aos metais pesados poluentes do ambiente (HÖLKER; FAKOUSSA; HÖFER, 1995; PAOLETTI, 1999; PEINTNER; MOSER, 1996).

#### 1.4 Biorremediação

Em 1930 Tausz e Donath apresentaram ao mundo a ideia de utilizar microrganismos para a descontaminação de solos contaminados com petróleo, dando origem aos processos de biorremediação. Atualmente a biorremediação é utilizada para restauração de ambientes contaminados por substâncias xenobióticas (DZIOŃEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016).

A biorremediação é uma tecnologia ecologicamente correta, não invasiva e promissora que utiliza o potencial metabólico de microrganismos para a recuperação ou redução a níveis aceitáveis de metais pesados em locais contaminados. É considerada uma solução permanente que pode levar a degradação ou transformação de contaminantes ambientais em inofensivos ou menos tóxicos. O processo pode provocar modificações químicas, físicas, bioquímicas ou microbiológicas no ambiente (DZIOŃEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016; EPA, 2013; WATANABE, 2001).

Os processos de biorremediação, diferente dos tradicionais, apresentam baixo custo, baixas manipulação tecnológica, e geralmente alta aceitação da sociedade (VIDALI, 2001). Várias técnicas de biorremediação estão sendo estudadas e descritas, porém devido à natureza e variabilidade dos agentes contaminantes no ambiente, não há uma única tecnologia que sirva para todos os poluentes (VIDALI, 2001).

A biorremediação pode ser realizada *ex situ* ou *in situ*, o tratamento *ex situ* requer geralmente um custo um pouco maior, pois ocorre a retirada e transporte dos agentes contaminantes, que serão tratados (descontaminados) em outros locais como estações de tratamento. Os “wetlands” são exemplos de tecnologia *ex situ*, é uma tecnologia de baixo

investimento e ecologicamente correta, onde plantas e microrganismos presentes nesses locais ajudam no tratamento de água contaminada com metais pesados (CHENG et al. 2002).

O tratamento *in situ* é realizado no local da contaminação, ou seja, não requer transporte ou escavação do local, a baixa logística diminui os custos do processo o que o torna mais viável e com interferência mínima no local (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

Como mencionado anteriormente, uma alternativa tradicional é apenas “tampar e estocar” o resíduo, com essa atividade o resíduo continua no ambiente, mas os processos de biorremediação *in situ* estão sendo estudados para substituir essas técnicas tradicionais (GRÄFE; KLAUBER, 2011).

Existem 3 principais tipos de biorremediação *in situ* com microrganismos, que são atenuação natural, bioestimulação e bioaumento (SAFDARI et al. 2018).

A atenuação natural está relacionada às atividades dos microrganismos que estão naturalmente presentes no ambiente, permitindo que o ecossistema volte a sua condição original, ocorrendo assim a redução da mobilidade, massa ou mobilidade do agente tóxico, os exemplos são: biossorção, bioprecipitação e biodegradação (SCOW; HICKS, 2005). Entretanto, esse processo natural pode durar muitos anos, principalmente quando a população de microrganismos presentes naturalmente no ambiente não é grande suficiente, assim, visando potencializar a biorremediação ocorre a bioestimulação.

Na bioestimulação, ocorre a adição de nutrientes e/ou oxigênio que irão auxiliar no crescimento e desenvolvimento dos microrganismos no ambiente contaminado (VIDALI, 2001).

Alguns compostos nutrientes, como adubo, palha de arroz e espiga de milho ou receptores de elétrons como fosfatos, nitrogênio, carbono podem ser introduzidos ao ambiente e utilizados como bioestimuladores (HAMDY et al. 2007; PIMMATA; REUNGSANG; PLANGKLANG, 2013; SUJA et al. 2014).

No bioaumento, microrganismos isolados do próprio local contaminado ou de outros ambientes contaminados têm sua população aumentada, assim são reinjetados ou introduzidos na região contaminada como inóculos livres ou imobilizados. Para que esse processo seja efetivo o microrganismo precisa ser resistente ao agente contaminante, e conseguir competir com outras espécies no ambiente, principalmente por nutrientes, além é claro de ser capaz de degradar e/ou biorremediar o composto xenobiótico (JIANG et al. 2016; SCOW; HICKS, 2005).

Segundo Boopathy, (2000), a biorremediação tem a vantagem de ser relativamente simples, ter baixo custo e resultar na eliminação permanente ou diminuição dos contaminantes de águas subterrâneas, solos, lagos, além de que o mecanismo biológico evita o risco associado aos resíduos sintéticos perigosos (produtos químicos), proporcionando maior segurança e menos perturbações ao meio ambiente.

### *1.5 Fungos com potencial para biorremediação de metais pesados*

A maneira com que os fungos vão interagir com os metais pesados depende do tipo de metal, organismo e ambiente. Um exemplo é quando o metal pesado é transportado para o interior da célula e modifica seu metabolismo (ROSS, 1975). Em outros casos os metais pesados podem bloquear grupos funcionais de enzimas celulares (ANAHID; YAGHMAEI; GHOBADINEJAD, 2011). Porém, algumas espécies conseguem se tornar resistentes a esses estresses.

Os fungos são descritos como excelentes agentes para biorremediação de solo e água, pois apresentam alta capacidade metabólica que pode ser aplicada aos metais pesados como o urânio. A capacidade metabólica faz com que os fungos tenham a possibilidade de sobreviver aos ambientes ácidos e contaminados com urânio (HÖLKER; FAKOUSSA; HÖFER, 1995; PAOLETTI, 1999; PEINTNER; MOSER, 1996).

Os fungos apresentam alto potencial para a biorremediação, uma vez que possuem a capacidade de acumular e imobilizar, em altas concentrações, uma variedade de metais pesados como Cu, Zn, Fe, U, Ni, Cd e Hg (BISHNOI; GARIMA, 2005; GADD, 1986).

A superfície celular fúngica apresenta quitina e quitosana, que são considerados excelentes sequestradores de íons de metais pesados (DAS; VIMALA; KARTHIKA, 2008). Os gêneros *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Saccharomyces* spp. e *Fusarium* spp. se mostraram excelentes bioadsorventes de íons de metais pesados (SHENO MERRIN et al. 1998; VOLESKY; MAY; HOLAN, 1993). *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. e *Saccharomyces* spp. podem bioadsorver metais pesados U, Th, Sr, Ni, Zn, Pb, Cr, As (GALUN et al. 1983; TAN; CHENG, 2003; TSEZOS; GEORGOUSIS; REMOUDAKI, 1997).

Os estudos sobre biorremediação de urânio têm focado nos mecanismos de bioadsorção do metal pela biomassa fúngica, entretanto estudos recentes indicam que os fungos podem apresentar outras maneiras de biorremediar esses metais pesados do ambiente (LIANG; GADD, 2017; QIAN et al. 2017; VÁZQUEZ-CAMPOS et al. 2015).

Existem 4 tipos principais de biorremediação utilizando fungos, que são: Biossorção, biomineralização, biorredução e bioacumulação (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017).

A biossorção é um processo físico-químico onde ocorre a remoção de compostos da solução por organismos vivos ou mortos e seus derivados (MUSTAPHA; HALIMOON, 2015). Na biossorção de urânio ocorre a ligação físico-química do urânio com a biomassa fúngica, a biossorção inclui os mecanismos de adsorção e absorção, ou seja, após o processo o metal pode ser encontrado na porção interna ou externa da célula (GADD; FOMINA, 2011).

É importante salientar que nem todas as biomassas de microrganismos apresentam tais capacidades de biossorção, sendo indicado a realização de um “screening” para selecionar os fungos com melhor potencial (KOTA et al. 2014; OLSTORPE; SCHNÄRER; PASSOTH, 2009; TSEZOS; VOLESKY, 1982).

A biomineralização é o estudo dos processos sobre a interação entre estruturas orgânica-inorgânica mediada por microrganismos vivos. Por décadas surgiu a necessidade de serem identificadas moléculas envolvidas nesse processo e a interação entre elas (CRICHTON, 2012).

Em estudos com fungos do gênero *Aspergillus*, Liang et al. (2015), utilizando uma fonte de fosfato orgânico (glicerol 2-fosfato), observou que esses microrganismos foram capazes de liberar fosfato inorgânico no meio e assim precipitar o urânio em solução durante o crescimento.

Na biorredução, em ambientes onde o oxigênio ( $O_2$ ) é escasso, algumas espécies fúngicas facultativas são capazes de utilizar receptores de elétrons diferentes do  $O_2$ , como por exemplo os nitratos, neste caso acredita-se que o urânio solúvel (VI) pode ser utilizado como um receptor de elétrons alternativo e assim ser transformado em sua forma insolúvel U(IV) (GADD; FOMINA, 2011; NEWSOME; MORRIS; LLOYD, 2014). Os fungos podem também secretar uma alta quantidade de proteínas e outras enzimas que irão auxiliar os processos de biorredução (LLOYD, 2003).

Lovley & Phillips, (1992) utilizaram vários potenciais inibidores (ânions e metais) da biorredução de urânio, somente altas concentrações de cobre inibiram a redução de urânio. Espécies de *Aspergillus* vêm sendo descritas como excelentes redutoras de metais (ABD EL HAMEED et al. 2015).

No processo de bioacumulação os fungos podem acumular urânio dentro de suas estruturas celulares, por vias de “bioacumulação” (DUPRÉ DE BOULOIS et al. 2008), a hipótese é que a captação pode ocorrer porque o transporte do metal é similar ao de nutrientes essenciais ao funcionamento da célula, como o urânio não tem funções biológicas conhecidas, acredita-se que a sua captação ocorre devido à mudança na permeabilidade da membrana

celular, que acontece justamente por conta da sua toxicidade, o urânio é então armazenado no interior da célula em forma de grânulos de fosfato (NEWSOME; MORRIS; LLOYD, 2014).

A utilização de pó de rocha de fosfato, utilizado na agricultura como alternativa aos fertilizantes, pode ser um problema para muitos países em desenvolvimento, esse material pode conter altas concentrações de urânio, um exemplo é a área urano-fosfática existente no nordeste do Brasil, que compreende toda costa do estado de Pernambuco até a Paraíba (150 km de extensão) onde a concentração natural de urânio é de 150 a 200 ppm (MORAES et al. 2013). Algumas espécies fúngicas podem competir com plantas nesses ambientes e acumular urânio, isso é importante, pois a simbiose reduz o acúmulo do metal nos vegetais, os quais podem posteriormente ser consumidos por animais e humanos (DUPRÉ DE BOULOIS et al. 2008).

A realização da biorremediação de locais contaminados com a utilização de fungos, apresenta algumas vantagens sobre as bactérias, uma vez que são capazes de adsorver, acumular e imobilizar metais tóxicos sofrendo pouca ou nenhuma ação tóxica, principalmente devido a sua alta capacidade metabólica (DAVIS et al. 1993).

A maioria dos estudos em relação à captação de urânio por biomassa fúngica tem se concentrado em mecanismos de absorção e adsorção (ALI; HASHEM, 2007; GALUN et al. 1983; VÁZQUEZ-CAMPOS et al. 2015).

A remoção de metais pesados precisa ser feita o quanto antes, já que quanto maior o tempo dos poluentes no ambiente mais difícil pode ser a sua remediação (D'ANNIBALE et al. 2005,2006).

A área onde funcionava a mina encontra-se fechada para o acesso público devido aos riscos de contaminação, apenas pesquisadores e funcionários do IPEN e CNEN têm acesso ao local.



## 2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo geral isolar e caracterizar espécies fúngicas resistentes ao urânio do solo, da água e do sedimento da mina de urânio Osamu Utsumi assim como avaliar a capacidade de bioabsorção de urânio por esses microrganismos.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

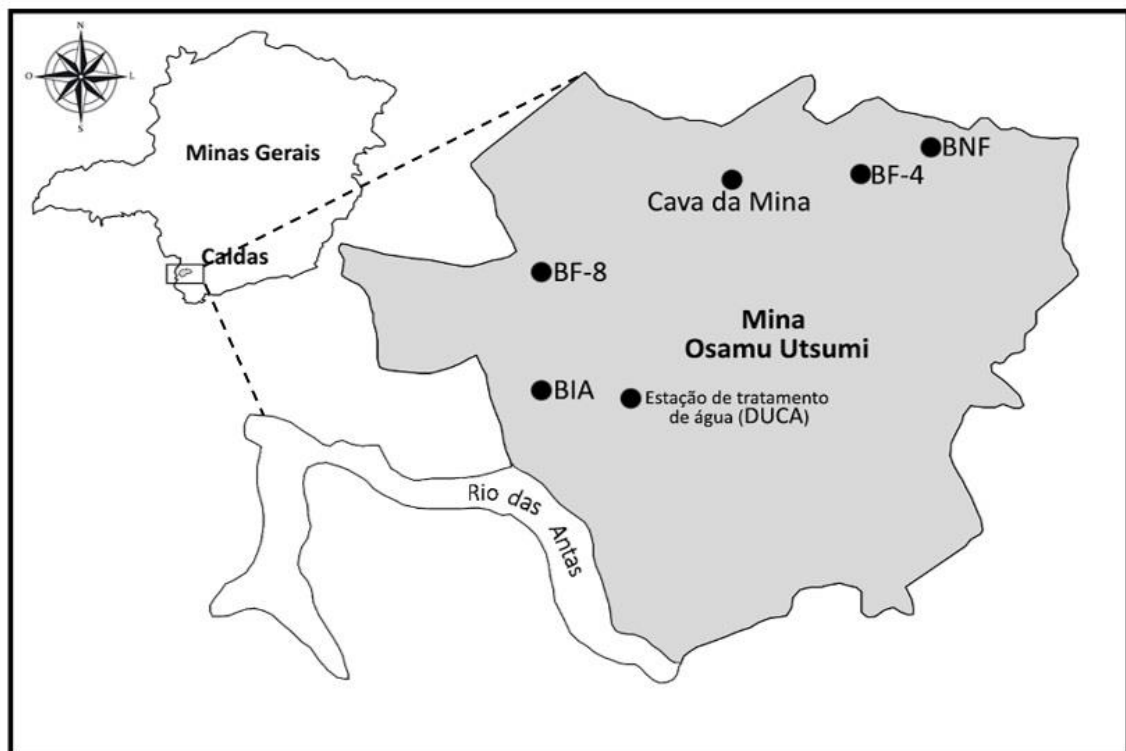
- 1- Isolar e identificar fungos de amostras do solo, da água e do sedimento na área mina de urânio Osamu Utsumi, em diferentes pontos de coleta;
- 2- Realizar a caracterização química das amostras do solo, da água e do sedimento;
- 3- Determinar o índice de tolerância dos fungos ao urânio;
- 4- Determinar a concentração inibitória mínima dos fungos isolados frente ao urânio;
- 5- Determinar o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM);
- 6- Selecionar e identificar os fungos quanto a sua resistência ao urânio;
- 7- Avaliar a distribuição do íon de metal pesado na superfície da célula fúngica;
- 8- Determinar e quantificar a retenção de íons do metal pesado pela biomassa fúngica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de amostras

Foram coletadas 20 amostras de solo, água e sedimento das principais bacias com água ácida e pilha de rejeitos da mina de urânio Osamu Utsumi localizada na cidade de Caldas, Minas Gerais, Brasil. A marcação dos pontos dos pontos de coleta foi realizada por GPS (Global Positioning System) (Tabela 1), e previamente definida em parceria com os técnicos responsáveis pela mina. As amostras foram coletadas em janeiro de 2015 e os pontos de coleta encontram-se indicados na figura 7 e Quadro 1.

Figura 7 – Mina Osamu Utsumi, locais de coleta das amostras estão indicados por pontos escuros.



Quadro 1 – Locais de coleta e número de amostras coletadas na mina Osamu Utsumi.

| Local de coleta | Identificação do local  | 20 Amostras                              |
|-----------------|---|--|
| <b>BIA</b>      | A bacia BIA foi construída na área da mina com o objetivo de impedir o espalhamento de água ácida, nela ocorre a captação de água ácida proveniente da pilha de rejeitos bota-fora 8. | 1 de água<br>1 de solo                   |
| <b>BF-8</b>     | Pilha de rejeitos bota-fora 8, montanha de rochas/solo que foi originada após os processos de escavação e mineração do urânio.  | 3 de solo                                |
| <b>DUCA</b>     | O DUCA é o resíduo proveniente da estação de tratamento de águas, o tratamento de água forma uma lama alcalina, essa lama é chamada de DUCA. O DUCA é descartado na cava da mina.     | 1 de sedimento                           |
| <b>CAVA</b>     | CAVA da mina, local onde ocorreu a escavação para extração do urânio. Atualmente a CAVA encontra-se inundada de água ácida (lago).  | 3 de solo<br>3 de água<br>3 de sedimento |
| <b>BF-4</b>     | Pilha de rejeitos bota-fora 4, é outra montanha de rochas/solo que também foi formada após os processos de escavação na mina.   | 3 de solo                                |
| <b>BNF</b>      | A bacia BNF também foi construída com o objetivo de impedir o espalhamento de água ácida, na bacia ocorre a captação de água ácida proveniente da pilha de rejeitos bota-fora 4.      | 2 de água                                |

Foram coletadas dez amostras do solo (500g cada), seis amostras da água (1 litro cada) e quatro amostras do sedimento (1 litro cada). Para a coleta de sedimento no fundo do lago foi utilizado um coletor tipo Van Veen.

Todas as amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno estéreis e transportadas para o laboratório sob refrigeração, sendo em seguida processadas em até 24 horas após as coletas.

Tabela 1 – Localização por GPS dos pontos de coleta e tipo de amostras coletadas na mina de urânio

| <b>Número</b> | <b>Local</b>             | <b>Tipo de amostra</b> | <b>Localização GPS</b>       |
|---------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| <b>1</b>      | BIA ponto 1              | água                   | 21°57'27.8S<br>46°30'37.3W   |
| <b>2</b>      | BIA ponto 2              | Solo                   | 27°57'28.2S<br>46°30'37.5W   |
| <b>3</b>      | BF-8 ponto 3             | Solo                   | 21°57'23.6S<br>46°30'33.8W   |
| <b>4</b>      | BF-8 ponto 4             | Solo                   | 21°57'14.4S<br>46°30'33.1W   |
| <b>5</b>      | BF-8 ponto 5             | Solo                   | 21°56'48.4S<br>46°30'21.5W   |
| <b>6</b>      | Duca ponto 6 (ET)*       | Sedimento              | 21°57'24.4S<br>46°30'29.9W   |
| <b>7</b>      | Duca ponto 7             | Solo                   | 21°56'55.8S<br>46°30'12.2W   |
| <b>8</b>      | Duca ponto 8             | Solo                   | 21°56'48.8S<br>46°30'13.2W   |
| <b>9</b>      | Cava (borda) ponto 9     | Solo                   | 21°56'48.9S<br>46°29'50.4W   |
| <b>10</b>     | Cava (lago) ponto 10     | Água                   | 21°56'44.1S<br>46°29'52.5W   |
| <b>11</b>     | Cava fundo lago ponto 11 | Sedimento              | Mesmo local da água ponto 10 |
| <b>12</b>     | Cava (lago) ponto 12     | Água                   | 21°56'46.4S<br>46°29'57.7W   |
| <b>13</b>     | Cava fundo lago ponto 13 | Sedimento              | Mesmo local da água ponto 12 |
| <b>14</b>     | Cava (lago) ponto 14     | Água                   | 21°56'50.0S<br>46°30'06.3W   |
| <b>15</b>     | Cava fundo lago ponto 15 | Sedimento              | Mesmo local da água ponto 14 |
| <b>16</b>     | BF4 ponto 16             | Solo                   | 21°56'32.7S<br>46°29'19.3W   |
| <b>17</b>     | BF4 ponto 17             | Solo                   | 21°56'27.0S<br>46°29'21.8W   |
| <b>18</b>     | BF4 ponto 18             | Solo                   | 21°56'27.5S<br>46°29'23.9W   |
| <b>19</b>     | BNF ponto 19             | Água                   | 21°56'27.6S<br>46°29'23.9W   |
| <b>20</b>     | BNF ponto 20             | Água                   | 21°56'25.4S<br>46°29'22.8W   |

\*ET= Estação de Tratamento

### *3.2 Caracterização química das amostras*

A análise qualitativa e quantitativa de urânio nas amostras foi realizada no Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CQMA/IPEN-SP).

A caracterização química foi realizada a fim de verificar em quais condições os fungos isolados da mina estariam crescendo.

As amostras de água foram analisadas pela técnica analítica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma de Argônio (ICP OES) e as de solo e por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de onda (WDXRF).

Os resultados foram confrontados com os valores máximos permitidos (VMP) pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357/2005).

### *3.3 Atividade de água do solo (Aa) e pH das amostras de água*

A determinação da atividade da água (Aa) das amostras de solo da área impactada foi realizada utilizando o aparelho AQUALAB CX-2, Decagon Devices Inc (Pullman WA, EUA). O pH das amostras de água foi verificado no momento da coleta por peagâmetro digital (Kasvi).

### *3.4 Isolamento de fungos de solo, água e sedimento*

Para isolamento de fungos da água e do sedimento, 1 mL de cada amostra foi diluído em 9 mL de água destilada estéril, obtendo-se assim, a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foram preparadas diluições decimais sucessivas até  $10^{-5}$ . Para isolamento de fungos do solo foram diluídas 10g de cada amostra em 90 mL de água destilada estéril (diluição  $10^{-1}$ ), assim foi realizada a técnica de diluição seriada até  $10^{-5}$ .

Todas as diluições foram adicionadas em placas de Petri (90x15) contendo 2 tipos diferentes de meio de cultura, a saber: PDA (ágar batata dextrose) e PDA + Ácido tartárico 3,5% (para acidificar o meio). Todas as análises foram feitas em Triplicata. De cada diluição foi retirada, uma alíquota de 0,1 mL e realizada a inoculação na superfície do meio solidificado, com o espalhamento executado através da técnica de esgotamento em estrias. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 10 dias. Foi realizada a quantificação dos fungos expressa em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) para amostras sólidas e UFC/mL para

amostras líquidas (CLESCERI, 1998; SILVA; JUNQUEIRA, 1995). Os fungos isolados foram mantidos/cultivados em tubos com meio PDA.

### *3.5 Identificação dos fungos isolados*

#### 3.5.1 Identificação morfológica dos fungos

A identificação morfológica (macroscópica) dos fungos foi realizada pela técnica de colônia gigante, inoculando-se 10 µL de suspensão dos fungos no centro de placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura sólido (PDA) e em seguida mantidas em estufa a 25 °C. Após o crescimento dos fungos foram observadas as características de cor, tamanho e textura das colônias. A identificação microscópica dos fungos foi realizada pela técnica de microcultivo em lâmina proposta por Riddell (1950), descritas a seguir. No interior da placa de Petri forrada com papel de filtro, foi disposta uma lâmina de vidro sobre um bastão de vidro em “U”. Este conjunto foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Uma parte de 1 cm<sup>3</sup> do meio PDA foi depositada sobre a lâmina. Com auxílio de alça de níquel cromo em “L”, os fungos foram semeados em torno do meio de cultura e o papel de filtro umedecido com água destilada estéril, visando auxiliar no crescimento fúngico e na fixação dos órgãos vegetativos e reprodutivos dos fungos. As estruturas morfológicas microscópicas dos fungos foram então identificadas de acordo com os compêndios de Arx, (1974), Barron, (1972), Kozakiewicz, (1989), Pitt & Hocking, (2009).

#### 3.5.2 Identificação molecular das espécies fúngicas

##### **3.5.2.1 Extração de DNA ribossomal (DNAr)**

O DNAr foi extraído e purificado diretamente das colônias fúngicas a partir do cultivo em Yeast Extract Sucrose ágar (ágar YES) (ABDOLLAHI; BUCHANAN, 1981; DEGOLA et al. 2007), seguindo o protocolo do kit PrepMan Ultra® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Para tal, os isolados foram inoculados em ágar YES e cultivados por até 7 dias em estufa a 25 °C, em seguida, com o auxílio de um bisturi, um fragmento de micélio de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foi recortado da periferia da colônia. O ágar foi então removido e o micélio transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 300 µL de PrepMan Ultra®. O microtubo foi agitado

em vórtex por um minuto e colocado em banho maria a 100 °C por 15 minutos e centrifugado por 7 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente. Após o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL e armazenado a -4 °C para realização da quantificação e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

### 3.5.2.2 Diluição do DNA

Para os testes de quantificação, o DNA extraído foi diluído 1:50 em água Milli-Q e quantificado em NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific Waltham, MA, EUA) em comprimento de onda de 260 nm, foi então realizada a medida da absorbância no comprimento de onda de 280 nm para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA através da razão entre densidade óptica (DO) A260 nm e A280 nm (DO260/DO280) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989). O DNA foi diluído a 40 ng/μL para realização da PCR.

### 3.5.2.3 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a PCR foram utilizados microtubos de 0,2 mL. Os fragmentos da região ITS de rDNA e o gene beta-tubulina (*BenA*) foram amplificados com os primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT 3') e Bt2a (5' GGT AAC CCA ATC GGT GCT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTGACC CTT GGC 3'), respectivamente (VISAGIE et al. 2014; WHITE et al. 1990). A PCR foi realizada com 12,5 μL de PCR Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, EUA), 6,5 μL de água Milli-Q, 2 μL de DNA (40 ng) e 2 μL (20 pmol) de cada primer (Prodimol Biotecnologia, MG, Brasil) para um volume final de 25 μL.

O programa de amplificação incluiu uma denaturação inicial (94 °C por 3 min), seguido por 35 ciclos de denaturação (94 °C por 1 min), anelamento a 57 °C (ITS) e 55 °C (*benA*) por 1 min, e extensão a 72 °C 1 min (VISAGIE et al. 2014). Ao final da amplificação uma etapa de extensão 72 °C por 5 min foi incluída.

Após a realização da PCR, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificar a eficiência da amplificação. O gel de agarose foi preparado a uma concentração de 1,2% de agarose em solução de TAE 1x (Tris Acetato EDTA) acrescidos de Gel Red (Biotium, Hayward, CA, EUA) ou Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (1 μL a cada 10 mL de gel). Para aplicação das amostras nos poços do gel, 3 μL das amostras foram

previamente coradas com azul de bromofenol (2  $\mu$ L) e aplicados 3  $\mu$ L em cada poço. O gel foi submetido a 100 volts a 400 mA por 1 hora. Como referência, para confirmar o tamanho dos fragmentos, adicionamos 6  $\mu$ L de DNA Ladder 1000 pb (Invitrogen), preparados na proporção de 1:5 (DNA Ladder: corante que acompanha, v/v) no primeiro poço de cada linha.

#### **3.5.2.4 Purificação do produto da PCR**

A purificação do produto da reação de PCR tem como objetivo a remoção de iniciadores, dNTPs, enzimas e sais dos produtos de PCR que possam interferir na reação de sequenciamento. Para isso, utilizamos o kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, realizamos a quantificação dos produtos de PCR em NanoDrop™, onde também verificamos a pureza dos produtos de PCR purificados. Para a etapa de sequenciamento, utilizamos apenas amostras com valores de pureza maior ou igual a 1,80, caso contrário a etapa de PCR era repetida (BAQUIÃO et al. 2012).

#### **3.5.2.5 Reação de sequenciamento**

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados bidirecionalmente (forward e reverse) utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados na PCR. A reação foi realizada com a seguinte ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após a ciclagem de sequenciamento, o produto foi precipitado a fim de retirar o excesso de possíveis interferentes. Imediatamente antes de a placa ser colocada no sequenciador, os fragmentos foram denaturados com 10  $\mu$ L de formamida HiDi (Applied Biosystems) adicionados em cada poço da placa que foi então vedada, homogeneizada por 20 segundos em vórtex, seguido de spin e incubada a 94 °C por 3 minutos e choque térmico em gelo por 5 minutos (WHITE et al. 1990).

#### **3.5.2.6 Separação eletroforética**

Foi realizada a separação eletroforética em capilar por um sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), utilizando POP6 (Applied Biosystems) e tampão TAE 1x durante 54 °C por 30 minutos, 1300 volts, com laser de potência de 25%. Sequências consenso obtidas foram



editadas usando o programa Sequencher versão 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA). As sequências encontradas foram pesquisadas no BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e MycoBank (<http://www.mycobank.org/>) (ALTSCHUL et al. 1990) de forma a confirmar identificações preliminares. As sequências dos contigs foram depositadas no banco de dados GenBank.

### 3.5.2.7 Análise dos dados e árvore filogenética

Todas as sequências foram salvas em arquivo no formato FASTA e os nucleotídeos foram então alinhados no software MUSCLE incluído no programa MEGA 7.0.26. A árvore filogenética (algoritmo Neighbor-joining) foi construída com máxima verossimilhança utilizando a análise de bootstrap com 1000 réplicas e como modelo Kimura 2 parâmetros, para verificar a distância filogenética entre as sequências (YILMAZ et al. 2014). As árvores foram editadas utilizando o programa Adobe Photoshop CC 2018®.

### 3.6 Índice de tolerância ao urânio (U-IT), concentração inibitória mínima (CIM) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Inicialmente, os fungos isolados foram inoculados em placas com PDA e colocados em estufa a 25 °C por 7 dias, logo após foram realizados os testes de índice de tolerância (IT), concentração inibitória mínima (CIM) e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM).

A tolerância dos fungos ao urânio pode ser realizada através de dois testes, índice de tolerância ao metal pesado (U-IT), quando esse valor é reduzido indica diminuição de crescimento do organismo devido ao estresse causado pelo metal pesado; e concentração inibitória mínima (CIM) que verifica os fungos com melhor resistência ao urânio (ANAHID; YAGHMAEI; GHOBADINEJAD, 2011; ZAFAR; AQIL; AHMAD, 2007).

Para verificar o Índice de tolerância ao metal pesado (U-IT), após o crescimento dos fungos, uma alíquota de conídios do isolado foi retirada com uma alça de platina e inoculada em uma solução tampão fosfato-salino (PBS) e adicionado 0,1 mL de tween 80, com pH corrigido para 7,2. A contagem de conídios foi realizada em câmara de *Neubauer* e o número ajustado para  $1 \times 10^5$  conídios/mL (ASSUNÇÃO et al. 2015). Para os fungos que não apresentaram produção de conídios, retiramos de forma estéril discos de 5mm de diâmetro de micélios e utilizamos nos experimentos (JO et al. 2009).

O volume de 10 µL de suspensão de conídios foi inoculado no centro de placas contendo PDA, suplementadas separadamente na concentração de nitrato de urânio de 100 ppm e controle (sem o metal), as placas foram então colocadas em estufa a 25 °C durante 7 dias. Assim, o U-IT foi calculado medindo o raio de extensão da colônia submetida ao tratamento em cm e dividindo esse valor pelo raio de extensão da colônia controle (meio PDA sem o metal pesado).

Para a análise da concentração inibitória mínima (CIM), a suspensão de conídios de cada fungo foi inoculada em placas de PDA suplementadas com concentrações de 0, 100, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 mg/kg de urânio e placas controle (sem suplementação de metais), o pH do meio foi corrigido para 5,6. A CIM foi definida como a menor concentração do metal pesado que inibiu o crescimento visível do fungo analisado.

Para avaliar o Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), foi realizada a inoculação de 10µL da suspensão de conídios no centro das placas suplementadas com urânio nas concentrações de 0, 100, 500, 1000, 2000 mg/L de urânio, a medição do diâmetro das colônias foi realizada a cada 24 horas durante os 7 dias de incubação. Os valores obtidos foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (DIAS et al. 2005).

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D=diâmetro médio atual da colônia  
Da=diâmetro médio da colônia do dia anterior N=número de dias após a inoculação.

Todos os testes foram feitos em triplicata e adaptados de acordo com os trabalhos realizados por Akhtar et al. 2013; Anahid et al. 2011; Fazli et al. 2015; Reisinger et al. 2008).

### *3.7 Teste de bio sorção com biomassa viva*

O teste de bio sorção com biomassa viva foi realizado com objetivo de verificar se os fungos com melhor índice de tolerância e resistência ao urânio apresentavam também melhor capacidade de remoção de urânio das amostras de água. Assim, utilizamos os parâmetros de pH (3,5) e temperatura (25 °C) próximos aos encontrados nas bacias formadas na área da mina.

#### 3.7.1 Preparação de biomassa viva

Todos os fungos isolados em meio PDA foram também cultivados em meio líquido (caldo batata), visando a obtenção de biomassa viva. Para isso, frascos de erlenmeyers de 250 mL

contendo 150 mL de caldo batata (Kasvi), foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, em seguida 1 cm<sup>2</sup> dos micélios fúngicos foram transferidos para os frascos. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação em agitador orbital horizontal com incubadora, numa faixa de temperatura de 25 °C a 150 rpm por 7 dias. Após o crescimento da biomassa fúngica, os frascos foram centrifugados e a biomassa foi separada do meio líquido por filtração, foi utilizado um filtro de papel e a biomassa foi lavada 5 vezes com água Milli-q (AHMAD; ZAFAR; AHMAD, 2005; SANA; ROOSTAAZAD; YAGHMAEI, 2015; VOLESKY; MAY-PHILLIPS, 1995).

### 3.7.2 Contato da biomassa viva com o urânio

Após a obtenção da biomassa, uma solução estoque de 100 mg/L de nitrato de urânio foi preparada, o pH da solução foi ajustado para 3,5, próximos aos encontrados na área da mina, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl), a medição foi realizada com medidor de pH digital (Kasvi). A biomassa viva foi pesada (0,2 g) e adicionada a tubos cônicos tipo falcon estéreis de 50 mL com 10 mL da solução estoque. Os tubos foram colocados em agitador orbital horizontal a 150 rpm durante 1 hora a 25 °C. Após o processo de agitação, 10 mL da solução foram filtrados a vácuo através de membrana SFPES 0,2 µm (Allcrom) (SALVADORI et al. 2014; VOLESKY; MAY-PHILLIPS, 1995).

A concentração do metal na solução filtrada foi determinada pela técnica analítica de espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio (ICP OES) no Instituto de Química e Meio Ambiente/IPEN, todos os testes foram feitos em triplicata.

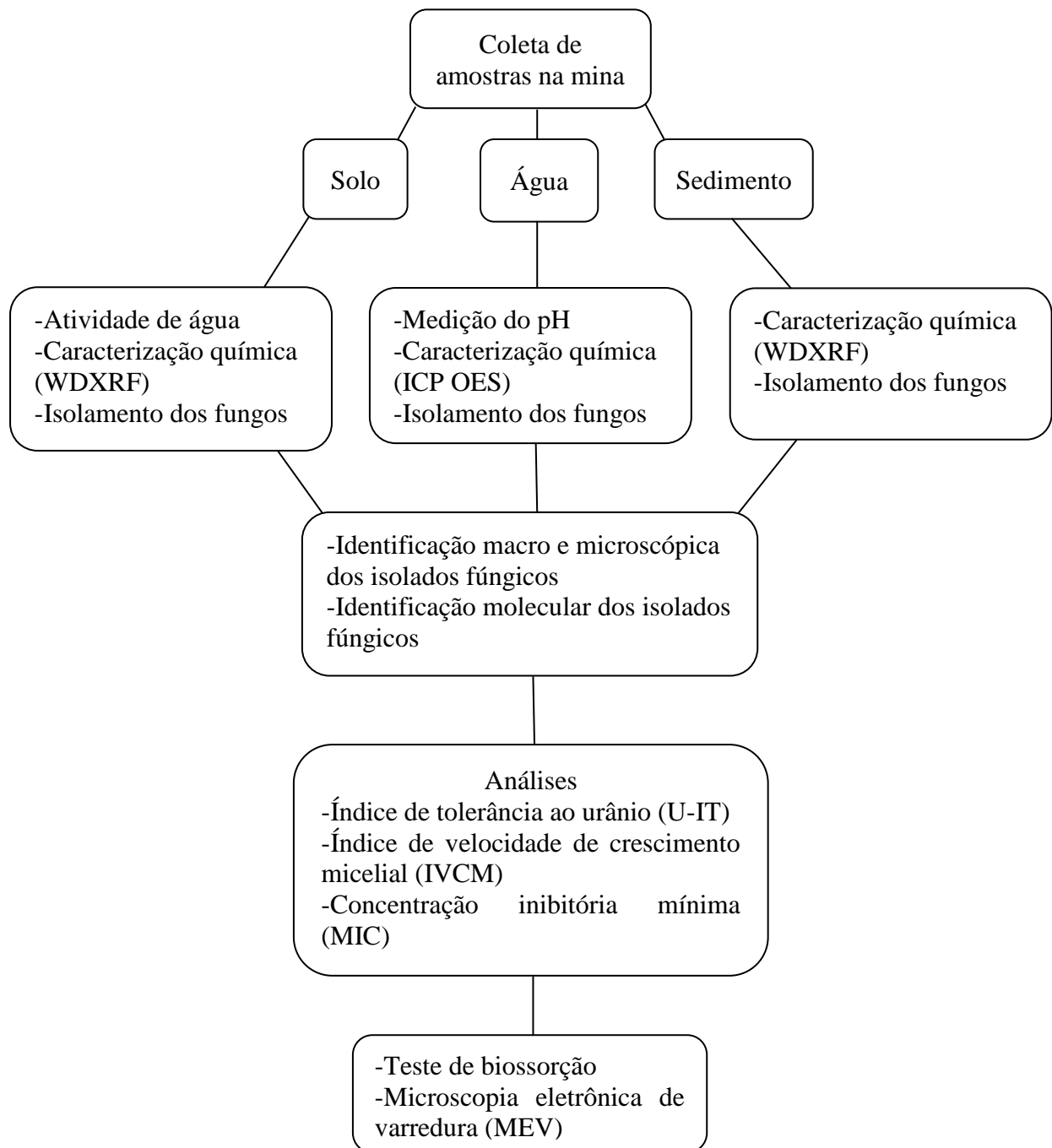
### 3.7.3 Identificação de urânio na célula fúngica

A identificação de urânio na superfície da célula fúngica foi realizada através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (BOZZOLA; RUSSELL, 1998).

## *3.8 Análise estatística*

Para análises dos resultados obtidos foram utilizados os programas Excel e OriginPRO 8, com Análises de Regressão, coeficientes de correlação e extensões dessas técnicas (PIMENTEL-GOMES, 2009).

### 3.9 Fluxograma de atividades



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização química das amostras

Os resultados obtidos nas análises do pH das amostras de água da CAVA e bacias BIA e BNF revelaram valores entre 3,16 e 3,48 (quadro 2), abaixo daqueles recomendados pelo CONAMA (resolução 430/11), sobre lançamentos de efluentes lançados por indústrias. Segundo o referido órgão, o pH muito ácido é um facilitador da solubilização dos metais pesados existentes nas pilhas de rejeitos.

Em relação as concentrações de Urânio nas amostras de solo, água e sedimento, nossos resultados demonstraram níveis entre 58 a 268 mg/kg (solo); 1,05 a 4,46 mg/L (água) e 283 a 488 mg/kg (sedimento) (Quadro 2).

No Brasil, em relação ao solo e sedimento, não existe até o momento qualquer resolução que estabeleça limites máximos para a concentração de urânio. Na literatura consta somente os limites aceitáveis de urânio no solo estabelecidos pelo Conselho Canadense do Meio Ambiente (CCME, 2007), que estabelece o limite máximo de urânio nas áreas agrícolas, residenciais e industriais de 23, 23 e 300 mg/kg, respectivamente. No Brasil, estudos realizados no Estado de Pernambuco, revelaram altas concentrações de urânio (300 mg/kg) no solo, porém trata-se de urânio natural, isto é, formação do complexo urânio-fosfato insolúvel (SILVA; SOUZA; AMARAL, 2003).

As amostras de água das bacias (BIA, CAVA e BNF) revelaram níveis de concentração de urânio até 200 vezes acima do valor máximo permitido (VMP) pela legislação brasileira (CONAMA nº 357/2005) que é 0,02 mg/L, para água doce (CONAMA, 2018). Comparando-se os níveis máximos estabelecidos pela legislação brasileira com as de outros países, constata-se que os valores são muito similares, variando de 0,01 a 0,03 mg/L no Canadá, Alemanha e Estados Unidos (BANNING et al. 2017; NAVRATIL, 2001; WEIR, 2004). Vale salientar que mesmo em pequenas concentrações o urânio pode ser tóxico aos organismos. Segundo o guia de diretrizes da qualidade de água potável da Organização Mundial da Saúde (OMS), para urânio o limite permitido em água potável é de 0,015 mg/L (WHO, 2016).

Quadro 2 - Caracterização química (pH e concentração de urânio) das amostras de solo, água e sedimento da mina de urânio Osamu Utsumi.

| Amostras          | Local | Concentração U<br>(mg/kg ou mg/L) <sup>a</sup> |
|-------------------|-------|--|
| Solo              | BIA   | 58±10  |
| Solo              | BF8   | <50 <sup>b</sup>                               |
| Solo              | BF4   | <50  |
| Solo              | CAVA  | 245±30   |
| Solo              | CAVA  | 157±20   |
| Solo              | CAVA  | 157±20   |
| Água<br>(pH 3,16) | BIA   | 3,69±0,03                                      |
| Água<br>(pH 3,39) | CAVA  | 1,05±0,02                                      |
| Água<br>(pH 3,38) | CAVA  | 1,05±0,02                                      |
| Água<br>(pH 3,34) | CAVA  | 1,05±0,02                                      |
| Água<br>(pH 3,48) | BNFs  | 4,46±0,08                                      |
| Sedimento         | DUCA  | 268±30   |
| Sedimento         | CAVA  | 488±30   |
| Sedimento         | CAVA  | 577±30   |
| Sedimento         | CAVA  | 283±30   |

a) A concentração de urânio está representada em média e desvio padrão.

b) <50= Limite de quantificação da técnica (50 mg/kg).

No Brasil, estudos recentes no rio das Antas, local onde é despejada a água proveniente do tratamento químico na mina Osamu Utsumi, revelaram, mesmo após o tratamento, níveis elevados de metais pesados. Em 2012, estudos realizados pelo CNEN, revelaram níveis de urânio 0,3 mg/L (CNEN, 2012). Posteriormente, Ferrari et al. (2017) detectaram níveis de Urânio, em análises realizadas em 2014, de 0,082 mg/L.

É bastante complicado relacionar os efeitos do urânio na saúde humana, pois a maioria dos estudos sobre toxicidade renal e valores de referência foram realizados em modelo animal, principalmente em camundongos. Em humanos os efeitos biológicos sugerem forte relação entre doenças e a exposição crônica ao U presente na água (FPTCD, 2017).

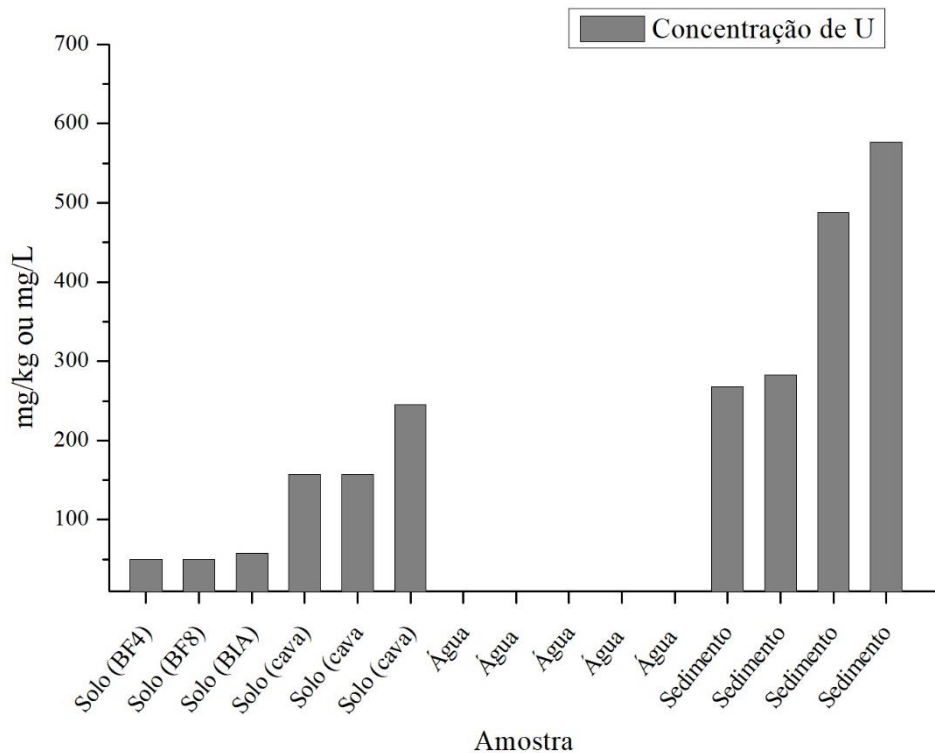
Pesquisas realizadas na Alemanha e nos Estados Unidos indicam uma forte relação entre o consumo de água com altas concentrações de urânio e o aumento na incidência de vários tipos de câncer como de pulmão, colorretal, rins, próstata, tireoide assim como leucemia (BANNING et al. 2017; RADESPIEL-TRÖGER; MEYER, 2013; WAGNER et al. 2011).

#### 4.1.2 Efeitos da drenagem ácida de mina

Em nossos estudos, a análise de caracterização química das amostras demonstrou claramente os efeitos da drenagem ácida de mina e lixiviação. O processo pode ser observado na figura 8.

As amostras de solo, provenientes das montanhas de rejeitos (bota-foras 4 e 8), apresentaram as menores concentrações de urânio quando comparadas com as amostras de solo das bordas das cavas, representadas no por BIA, CAVA. Portanto, essas amostras coletadas de regiões mais baixas (bordas das cavas) estão mais propensas a acumular urânio vindo dos bota-foras. Por sua vez, na água, verifica-se uma diminuição na concentração de urânio nas amostras, sugerindo que os sedimentos provenientes da pilha de rejeitos podem se agregar ao urânio na água e precipitar no fundo do lago formando sedimento. Este fato justifica as maiores concentrações de urânio no sedimento. Tais achados vem ao encontro dos conceitos básicos dos processos de drenagem ácida de mina e lixiviação postulados por Lyew & Sheppard, (1997); Nóbrega et al. (2008).

Figura 8 - Concentração de urânio nas amostras de solo, água e sedimento. O gráfico indica o possível efeito da drenagem ácida de mina



U= urânio; BF= bota-foras

A figura 9 demonstra os escoadouros (valas) construídos em toda área da mina, principalmente ao redor dos bota-foras, com o objetivo de “conter” a água da drenagem ácida de mina. A água ácida proveniente das pilhas de rejeitos (Figura 10) é desviada para a cava ou bacias (Figura 11) que foram construídas na área da mina. Quando as bacias estão inundadas a água é bombeada para a estação de tratamento da mina de urânio, onde serão tratadas pelos processos químicos antes de serem despejadas no Ribeirão das Antas.

Figura 9 - Escoadouros (valas) construídos ao redor das pilhas de rejeitos na mina de urânio Osamu Utsumi.





Figura 10 - Efluente proveniente da pilha de rejeitos bota-fora 4.



Água ácida produzida pela drenagem ácida de mina é escoada para bacia BNF.

Figura 11 - Água ácida proveniente da pilha de rejeitos Bota-fora 4 captada na bacia BNF.



Estudos realizados em mina de urânio na Alemanha, demonstraram que a concentração de urânio na pilha de rejeitos (solo) foi de 275 mg/kg, enquanto na água subterrânea que seguia para o rejeito foi de 0,6 mg/L, porém, quando a água atingia os rejeitos a concentração de urânio na água aumentava para 707 mg/L. A água escorria para fora da pilha de rejeitos com uma concentração de 260 mg/L, esse processo demonstra que a lixiviação e a drenagem ácida de mina são importantes na contaminação de ambientes pelo urânio (RUFYIKIRI et al. 2004).

## 4.2 Diversidade fúngica

Na presente investigação, o limite de detecção adotado para a contagem de colônias foi de  $1 \times 10^2$  UFC/g ou UFC/mL, no solo, na água e no sedimento.

O número de Unidades Formadoras de Colônias nas amostras variou de  $13 \times 10^2$  a  $22 \times 10^6$  UFC/g no solo; de 0 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL, na água; e de  $1 \times 10^2$  a  $10 \times 10^2$  UFC/g, no sedimento.

O maior grau de contaminação constatado nas amostras de solo ( $22 \times 10^6$  UFC/g), coletado na borda da cava da mina, pode ser atribuído aos elevados valores da atividade de água (média 0,97). Segundo Pitt & Hocking (1997) semelhante a outros organismos, os fungos são muito afetados pela disponibilidade de água. De acordo com Andersen et al. (2011) não existe um valor ideal de *Aa* estabelecido para o crescimento de todas as espécies fúngicas. Entretanto, espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são capazes de crescer em atividade de água variando entre 0,90 a 0,97 (RAMAKRISHNA; LACEY; SMITH, 1993).

A ausência de crescimento fúngico nas amostras de água da bacia BIA e BNF2 pode, provavelmente, atribuída à acidez da água (pH médio 3,3). Segundo Plumridge et al. (2004) o pH ácido tem um papel importante na inibição de algumas espécies fúngicas. Segundo Gompertz et al. (2015) o pH ótimo para o crescimento de fungos filamentosos é próximo de 5, porém, podem crescer na faixa de pH entre 1,5 a 11.

As altas concentrações de urânio nas amostras de sedimentos (Quadro 2) e o fato dessas amostras terem sido coletadas do fundo do lago ácido, o que reduz a concentração de oxigênio, podem ter interferido no isolamento dos fungos das amostras de sedimento (BABIČ et al., 2017).

### 4.2.1 Identificação dos isolados fúngicos

Estudos morfológicos clássicos (macro e microscópicos) e moleculares (sequenciamento da região ITS) foram utilizados para a identificação dos fungos a nível de gênero e espécie. Como resultado, foram identificados 57 fungos de 14 gêneros diferentes.

Pelas limitações associadas ao sequenciamento da região ITS, como a baixa cobertura no *Blast* e incongruência nos resultados, para identificação do gênero *Penicillium*, foi utilizado um segundo primer, a beta-tubulina, recomendado para confirmação da identidade das espécies do citado gênero (VISAGIE et al. 2014).

As sequências amplificadas foram consultadas na base de dados *BLAST* (NCBI) e os fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi foram comparados com aqueles encontrados no GenBank (Quadro 3).

No *Blast*, todos os fungos analisados apresentaram similaridade de 99 a 100% e e-value  $\leq 0$  com relação as sequencias de nucleotídeos presentes existentes no banco de dados. Sequências de nucleotídeos dos fungos isolados foram depositadas na base de dados GenBank e os números podem ser acessados no quadro 3.

Fungos do gênero *Penicillium* foram os mais isolados na área da mina Osamu Utsumi, sendo *Penicillium piscarium* a espécie mais prevalente.

Quadro 3 - Identificação dos fungos isolados das amostras de solo, água e sedimento na mina de urânio Osamu Utsumi.

| Isolados  | Espécies                              | Número de acesso GenBank. |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------|
|           |                                       | ITS / <i>BenA</i>         |
| USPMCT76  | <i>Aspergillus sect. versicolores</i> | MH137656                  |
| USPMCT130 |                                       | MH137674                  |
| USPMCT68  | <i>Talaromyces loliensis</i>          | MH137651                  |
| USPMCT42  | <i>Talaromyces amestolkiae</i>        | MH137642                  |
| USPMCT63  |                                       | MH137650                  |
| USPMCT73  |                                       | MH137654                  |
| USPMCT109 |                                       | MH137665                  |
| USPMCT148 |                                       | MH137680                  |
| USPMCT165 |                                       | MH137688                  |
| USPMCT111 | <i>Tolypocladium album</i>            | MH137667                  |
| USPMCT72  | <i>Trichoderma koningiopsis</i>       | MH137653                  |
| USPMCT127 |                                       | MH137672                  |
| USPMCT40  | <i>Trichoderma asperellum</i>         | MH137640                  |
| USPMCT53  | <i>Purpureocillium lilacinum</i>      | MH137646                  |
| USPMCT129 |                                       | MH137673                  |
| USPMCT131 |                                       | MH137675                  |
| USPMCT69  | <i>Metarhizium robertsii</i>          | MH137652                  |
| USPMCT135 | <i>Bionectria ochroleuca</i>          | MH137677                  |
| USPMCT104 | <i>Pochonia chlamydosporia</i>        | MH137664                  |
| USPMCT156 | <i>Verticillium leptobactrum</i>      | MH137684                  |
| USPMCT136 | <i>Phoma cf. nebulosa</i>             | MH137678                  |
| USPMCT74  | <i>Umbelopsis ramanniana</i>          | MH137655                  |
| USPMCT54  | <i>Gongronella butleri</i>            | MH137647                  |

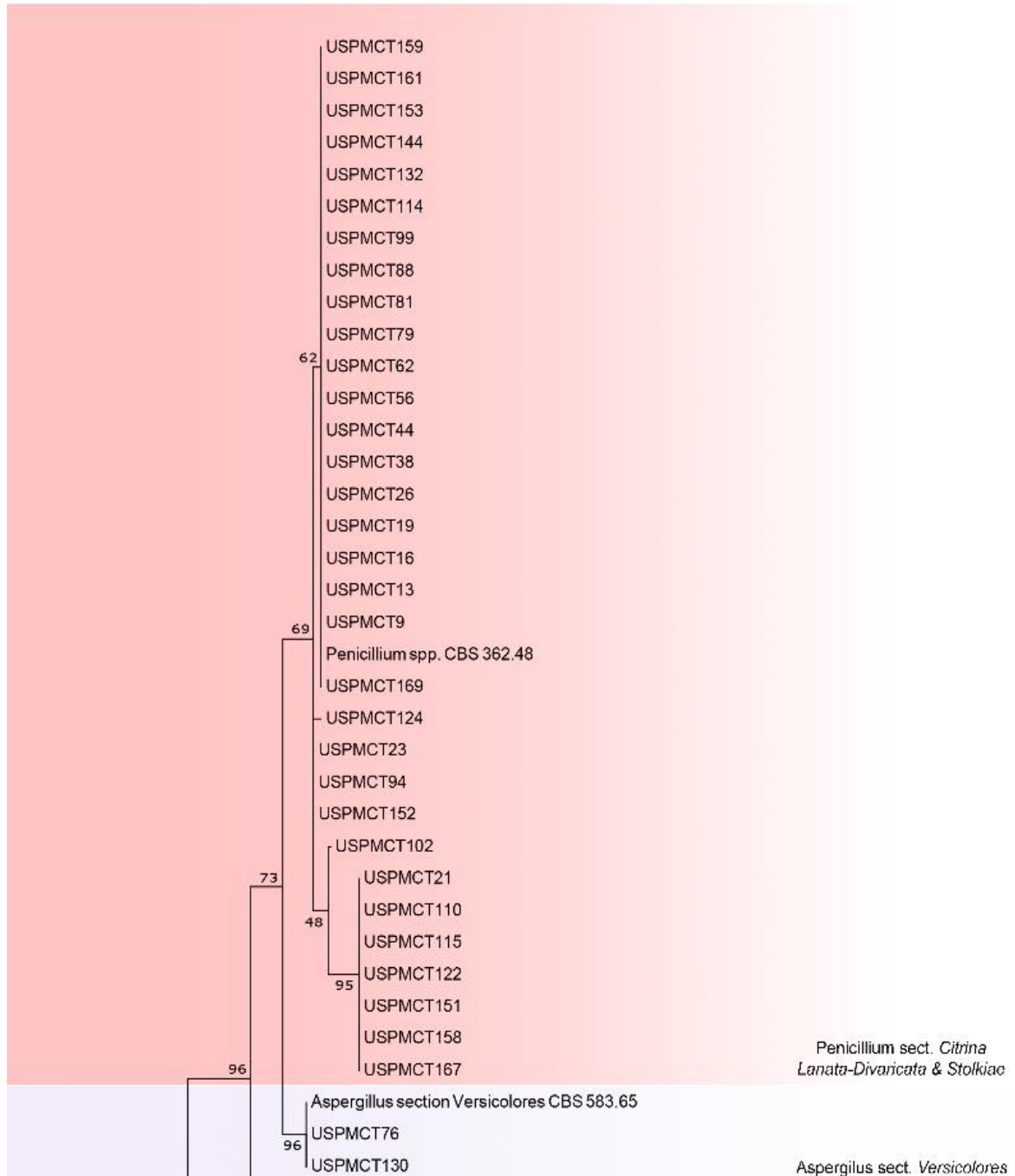
|           |                                 |          |
|-----------|---------------------------------|----------|
| USPMCT47  | <i>Mucor cicirnelloides</i>     | MH137644 |
| USPMCT43  | <i>Mucor fragilis</i>           | MH137642 |
| USPMCT9   | <i>Penicillium piscarium</i>    | MH724302 |
| USPMCT13  |                                 |          |
| USPMCT16  |                                 |          |
| USPMCT19  |                                 |          |
| USPMCT21  |                                 |          |
| USPMCT26  |                                 |          |
| USPMCT79  |                                 |          |
| USPMCT88  |                                 |          |
| USPMCT99  |                                 |          |
| USPMCT114 |                                 |          |
| USPMCT132 |                                 |          |
| USPMCT153 |                                 |          |
| USPMCT169 |                                 |          |
| USPMCT62  | <i>Penicillium pulvillorum</i>  | MH724303 |
| USPMCT144 |                                 |          |
| USPMCT159 |                                 |          |
| USPMCT161 |                                 |          |
| USPMCT38  | <i>Penicillium ochrochloron</i> | MH724304 |
| USPMCT44  | <i>Penicillium brasilianum</i>  | MH724305 |
| USPMCT56  |                                 |          |
| USPMCT81  | <i>Penicillium amphipolaria</i> | MH724306 |
| USPMCT102 |                                 |          |
| USPMCT94  | <i>Penicillium ludwigii</i>     | MH724307 |
| USPMCT124 |                                 |          |
| USPMCT23  | <i>Penicillium janthinellum</i> | MH724308 |
| USPMCT152 |                                 |          |
| USPMCT110 | <i>Penicillium citrinum</i>     | MH724309 |
| USPMCT115 |                                 |          |
| USPMCT122 |                                 |          |
| USPMCT151 |                                 |          |
| USPMCT158 |                                 |          |
| USPMCT167 |                                 |          |

Quadro 3. (continuação).

A identificação foi realizada pelo sequenciamento da região ITS (ITS1 e ITS4) e gene beta-tubulina (*BenA*).

As árvores filogenéticas de ITS e beta-tubulina das espécies fúngicas isoladas da mina Osamu Utsumi podem ser acessadas nas figuras 12 e 13, respectivamente. As sequências de amplicons da região ITS (rRNA) e da beta-tubulina foram altamente similares às sequências das respectivas espécies de fungos documentados no GenBank®. Assim, concluímos em nossos achados a homologia no grau de similaridade entre os fungos do banco de dados com nossos isolados.

Figura 12 - Árvore filogenética das espécies fúngicas isoladas da mina de urânio Osamu Utsumi (Começando por USPMCT+número). Filogenia do gene ITS. As cepas referências correspondentes foram incluídas na árvore.



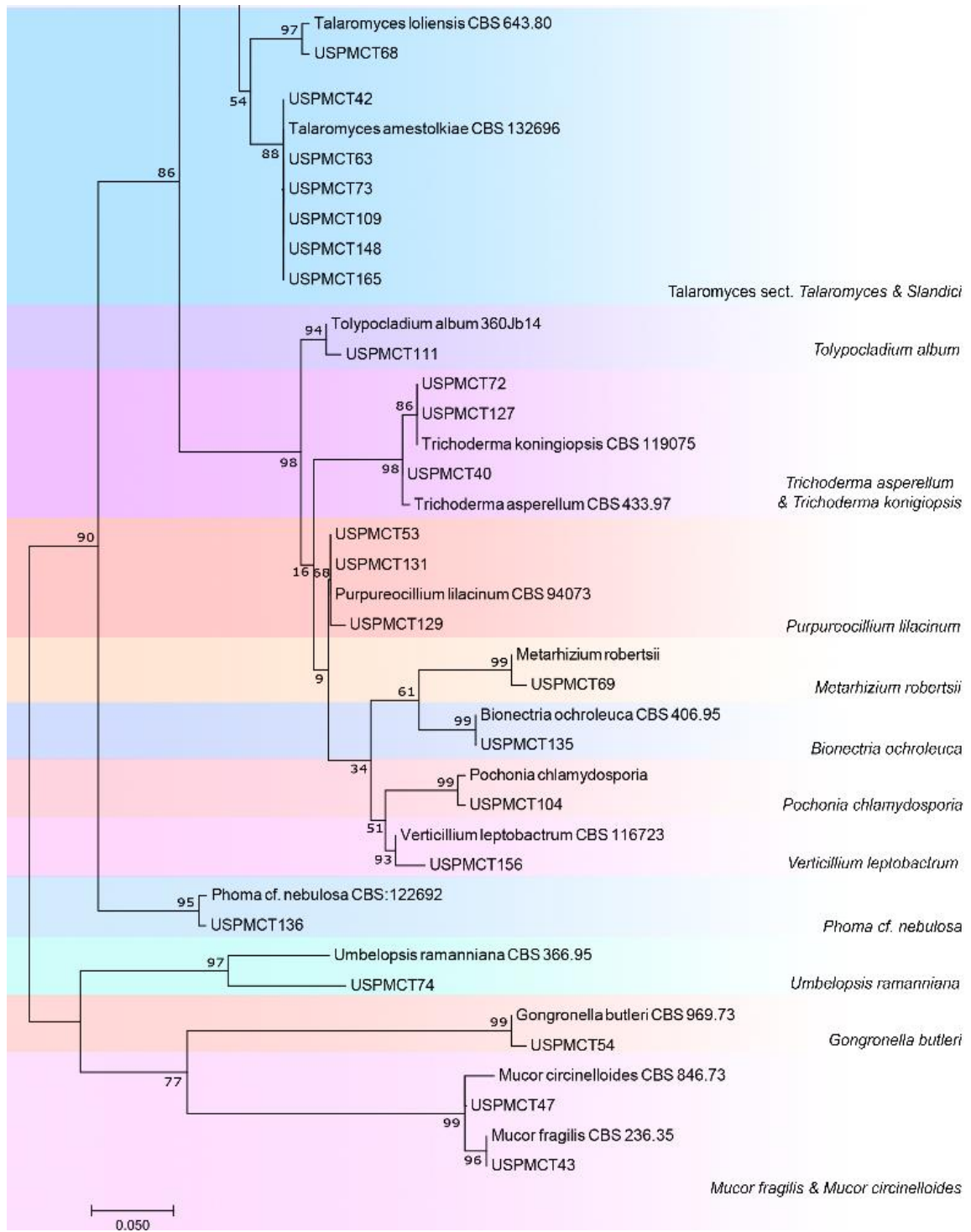
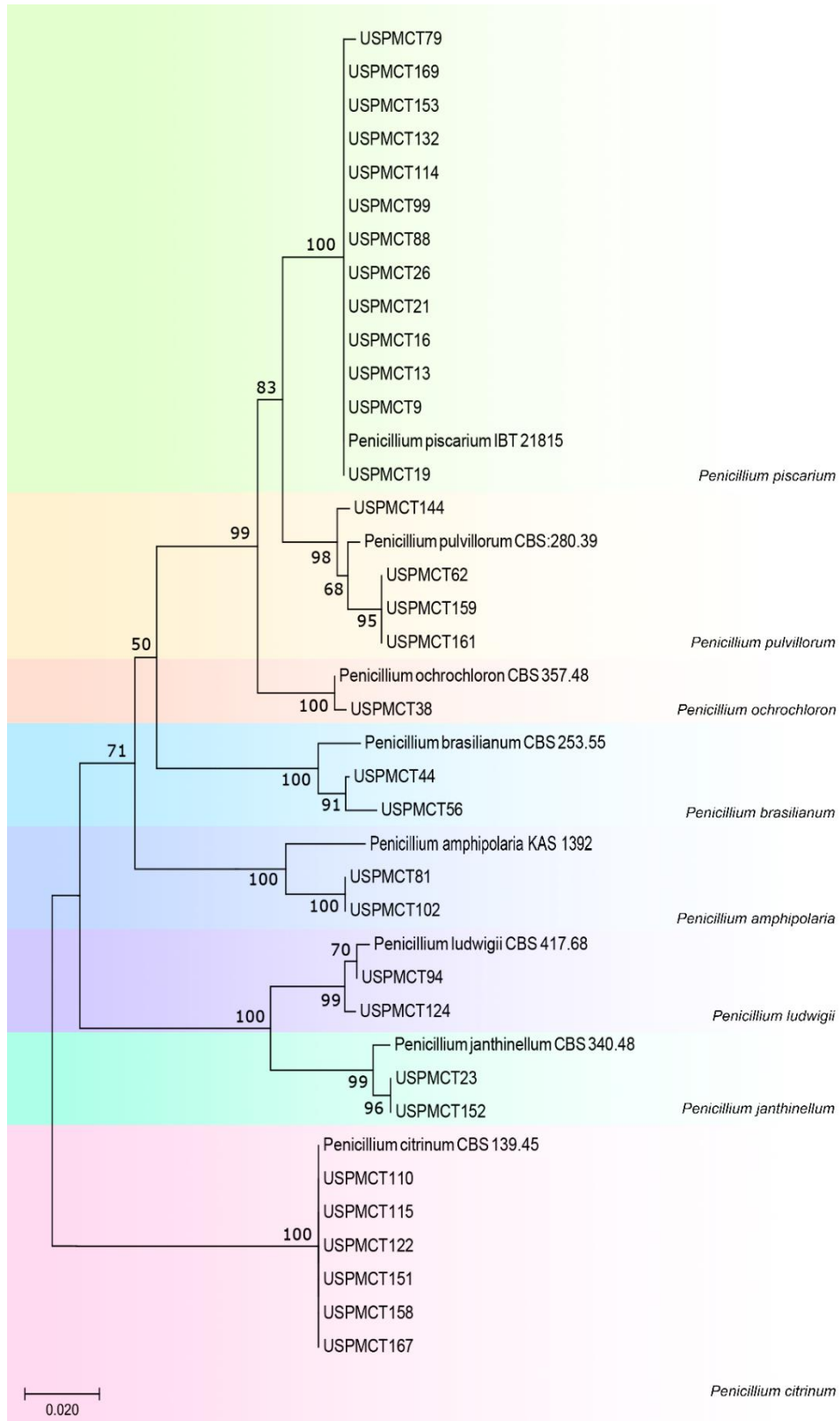


Figura 12. (continuação).

Figura 13 - Árvore filogenética das espécies do gênero *Penicillium* isoladas da mina Osamu Utsumi (começando por USPMCT+número). Filogenia do gene beta-tubulina (*BenA*). As cepas referências correspondentes foram incluídas na árvore.





De maneira geral, os fungos filamentosos são frequentemente isolados em minas com altas concentrações de metais pesados (ambiente extremo) e água ácida, sendo muitos deles selecionados e testados para a obtenção da sua capacidade de bioadsorção e reação frente aos íons de metais pesados, para serem utilizados nos processos de biorremediação (EZZOUHRI et al. 2009; FERREIRA et al. 2010; SHAZIA; UZMA; TALAT, 2013; VAZQUEZ-CAMPOS et al. 2014).

Espécies de *Penicillium* são estudadas pela sua alta habilidade para a degradação de compostos xenobióticos e acúmulo de agentes poluentes, sendo esses fungos interessantes para os processos de biorremediação (LEITÃO, 2009). Vários autores tem utilizado *Penicillium* spp. isolados de minas de urânio em processos de biorremediação, pela sua alta capacidade de resistência e bioacumulação de urânio e outros metais pesados (LI et al. 2014; SANA; ROOSTAAZAD; YAGHMAEI, 2015).

Outros gêneros fúngicos tais como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Tolypocladium*, isolados de ambientes de mineração, são citados na literatura como resistentes aos metais pesados e as demais condições extremas, com alta capacidade de biorremediação (BAHOBIL et al. 2017; BENGTTSSON et al. 1995; KATAR et al. 2017; SVECOVA et al. 2006). Em condições de pH ácido (< 3) e altas concentrações de metais tóxicos, os fungos melanizados são descritos como os grupos mais prevalentes nesses habitats, ou seja, os mais frequentemente isolados, sendo a melanina responsável pela principal estrutura de proteção desses microrganismos (BAKER et al. 2004; CHAN et al. 2016; LÓPEZ-ARCHILLA et al. 2004; SELBMANN et al. 2008).

### 4.3 Índice de tolerância (U-IT), Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados

O índice de tolerância ao urânio (U-IT), índice de velocidade de crescimento micelial (U-IVCM) e a concentração inibitória mínima (CIM) foram determinados para demonstrar o efeito do urânio sobre o crescimento dos isolados fúngicos. Esses estudos geralmente são realizados com o objetivo de selecionar a/ou as espécies apresentam maior potencial para os processos de biorremediação (DEL et al. 2016; EZZOUHRI et al. 2009; FAZLI et al. 2015; SHAZIA; UZMA; TALAT, 2013; ZUBBAIR, 2009). Todos os valores relacionados aos experimentos descritos podem ser analisados no quadro 4 – item 4.4.

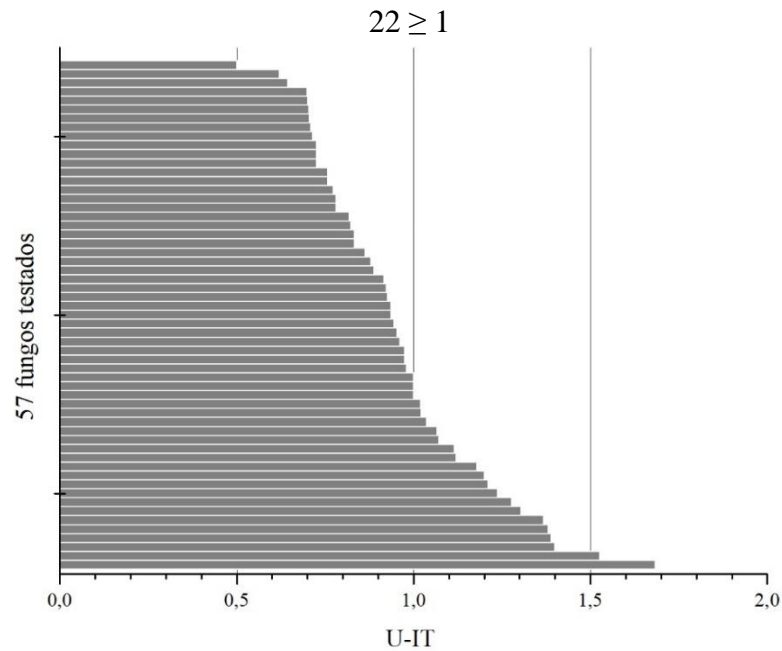
#### 4.3.1 Índice de tolerância ao urânio (U-IT)

Dos 57 fungos testados, 22 (38%) demonstraram índice de tolerância ao urânio  $\geq 1$  (Figura 14). Dentre os fungos tolerantes temos 10 espécies do gênero *Penicillium*, destacando-se 5 isolados de *Penicillium citrinum*. Outros 12 fungos tolerantes foram: *Talaromyces* e *Aspergillus*, 3 e 2 espécies, respectivamente, e *Pochonia chlamydosporia*, *Umbelopsis ramanniana*, *Metarhizium robertsii*, *Gongronella butleri*, *Purpureocillium lilacinum*, *Mucor fragilis*, *Trichoderma asperellum* cada uma com 1 espécie. Os resultados podem ser analisados no quadro 4 - Item 4.4.

Portanto, na concentração de 100 mg/L de urânio utilizada no experimento, apesar de sobreviverem e crescerem, o urânio interferiu no crescimento dos 35 isolados restantes, considerados não tolerantes pela metodologia utilizada, já que o crescimento comparado ao controle (meio sem o metal pesado) apresentou um valor de U-IT menor que 1.

Fungos foram isolados de rochas de fosfato com altas concentrações de metais pesados, esses foram considerados tolerantes à altas concentrações de urânio e também ótimos biosorventes de metais pesados (ABD EL HAMEED et al., 2015).

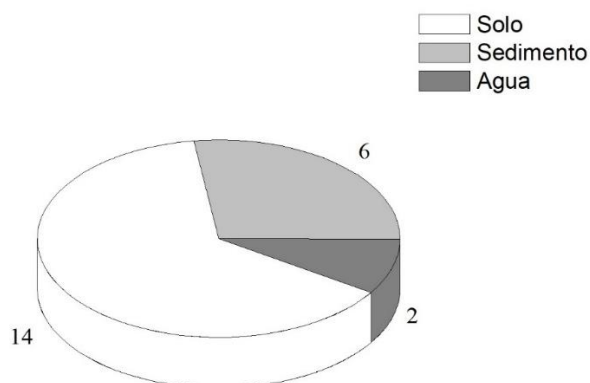
Figura 14 - Índice de tolerância ao urânio (U-IT) dos 57 fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi.



Fungos com  $U-IT \geq 1$  foram considerados tolerantes a 100 mg/L de urânio.

A comparação entre os testes de tolerância dos fungos e o tipo de amostra (solo, água e sedimento), foi realizada com o objetivo correlacionar os 22 fungos tolerantes com as contaminações dos locais do isolamento. A comparação revelou que os fungos mais tolerantes foram isolados das amostras com maior concentração de urânio (Figura 15).

Figura 15 - Relação entre os 22 fungos tolerantes (U-IT) com o tipo de amostra de onde foram isolados.



#### 4.3.2 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

As análises de velocidade de crescimento micelial (IVCM) geralmente são utilizadas para demonstrar em qual parâmetro é observado o melhor crescimento fúngico, como por exemplo, a temperatura. Em nossos estudos utilizamos a análise da IVCM para verificar os efeitos das diferentes concentrações de urânio na célula fúngica.

Nossos resultados demonstraram que, apesar de terem sua velocidade de crescimento micelial reduzida em comparação ao controle, os isolados fúngicos continuaram crescendo em meios contaminados com urânio, mesmo em meio com concentrações acima de 100 mg/L de urânio. Porém, na maioria dos isolados houve uma pequena diferença na IVCM (cm/dia) quando comparados ao controle. Nas concentrações de 1000 mg/L de urânio pudemos observar que 1 isolado fúngico (código 158 *Penicillium citrinum*) teve o crescimento micelial inibido. Em concentrações de 2000 mg/L de urânio, 48 fungos apresentaram crescimento micelial, mesmo tendo o crescimento em cm/dia menor do que, em alguns casos, quando cresceram em concentrações mais baixas, apenas 9 fungos (código 62, 63, 81, 102, 111, 130, 136, 152, 158) apresentaram inibição da IVCM na maior concentração testada (Tabela 2).

Quando comparados os resultados de U-IT com o IVCM, dos 9 fungos que tiveram velocidade de crescimento inibida em 2000 mg/L de urânio (igual a 0), apenas 2 deles (código 152 e 158, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium citrinum*, respectivamente) foram consideradas tolerantes ao urânio pela análise de índice de tolerância (U-IT).

Tabela 2 - Velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos 57 fungos isolados da mina Osamu Utsumi.

| Nº | Código do fungo* | Média de IVCM em cm/dia |                |                |                 |                 |
|----|------------------|-------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
|    |                  | IVCM (controle)         | IVCM (100mg/L) | IVCM (500mg/L) | IVCM (1000mg/L) | IVCM (2000mg/L) |
| 1  | 9                | 0,6±0,05                | 0,6±0,05       | 0,4±0,04       | 0,3±0,02        | 0,2±0,01        |
| 2  | 13               | 0,8±0,06                | 0,5±0,05       | 0,4±0,08       | 0,2±0,05        | 0,1±0,04        |
| 3  | 16               | 0,7±0,03                | 0,6±0,06       | 0,4±0,05       | 0,2±0,03        | 0,1±0,01        |
| 4  | 19               | 0,8±0,02                | 0,6±0,03       | 0,5±0,03       | 0,3±0,01        | 0,2±0,01        |
| 5  | 21               | 0,5±0,02                | 0,3±0,02       | 0,3±0,03       | 0,2±0,04        | 0,1±0,01        |
| 6  | 23               | 0,5±0,03                | 0,3±0,01       | 0,3±0,01       | 0,3±0,01        | 0,2±0,01        |
| 7  | 26               | 0,8±0,03                | 0,5±0,04       | 0,5±0,07       | 0,3±0,01        | 0,1±0,01        |
| 8  | 38               | 0,8±0,02                | 0,7±0,05       | 0,5±0,02       | 0,4±0,01        | 0,3±0,02        |
| 9  | 40               | 1,3±0,03                | 1,2±0,05       | 0,7±0,01       | 0,5±0,02        | 0,1±0,01        |
| 10 | 42               | 0,8±0,01                | 0,6±0,06       | 0,5±0,05       | 0,4±0,01        | 0,3±0,01        |
| 11 | 43               | 1,3±0,01                | 1,2±0,02       | 1,2±0,01       | 0,6±0,04        | 0,5±0,04        |
| 12 | 44               | 0,7±0,03                | 0,6±0,06       | 0,5±0,02       | 0,4±0,06        | 0,3±0,02        |
| 13 | 47               | 0,6±0,05                | 0,5±0,04       | 0,4±0,03       | 0,3±0,01        | 0,3±0,03        |
| 14 | 53               | 0,4±0,03                | 0,3±0,07       | 0,2±0,02       | 0,2±0,07        | 0,1±0,01        |

|    |     |          |          |          |          |          |
|----|-----|----------|----------|----------|----------|----------|
| 15 | 54  | 0,4±0,04 | 0,4±0,07 | 0,4±0,07 | 0,3±0,02 | 0,2±0,01 |
| 16 | 56  | 0,7±0,03 | 0,7±0,03 | 0,6±0,01 | 0,4±0,01 | 0,3±0,01 |
| 17 | 62  | 0,5±0,02 | 0,4±0,01 | 0,2±0,07 | 0,2±0,01 | 0        |
| 18 | 63  | 0,4±0,05 | 0,3±0,06 | 0,2±0,03 | 0,1±0,01 | 0        |
| 19 | 68  | 0,3±0,04 | 0,2±0,01 | 0,2±0,03 | 0,2±0,05 | 0,1±0,02 |
| 20 | 69  | 0,3±0,03 | 0,3±0,03 | 0,2±0,06 | 0,2±0,06 | 0,2±0,01 |
| 21 | 72  | 1,2±0,06 | 1,0±0,02 | 0,8±0,02 | 0,5±0,04 | 0,4±0,01 |
| 22 | 73  | 0,4±0,02 | 0,4±0,03 | 0,3±0,04 | 0,3±0,03 | 0,2±0,02 |
| 23 | 74  | 0,4±0,03 | 0,4±0,01 | 0,3±0,01 | 0,3±0,08 | 0,1±0,02 |
| 24 | 76  | 0,3±0,05 | 0,3±0,04 | 0,2±0,06 | 0,2±0,03 | 0,1±0,02 |
| 25 | 79  | 1,0±0,05 | 0,7±0,06 | 0,5±0,04 | 0,5±0,01 | 0,3±0,02 |
| 26 | 81  | 0,3±0,01 | 0,1±0,04 | 0,1±0,01 | 0,1±0,01 | 0        |
| 27 | 88  | 0,7±0,04 | 0,6±0,01 | 0,3±0,03 | 0,2±0,01 | 0,2±0,01 |
| 28 | 94  | 0,7±0,06 | 0,6±0,02 | 0,5±0,02 | 0,4±0,01 | 0,3±0,01 |
| 29 | 99  | 0,8±0,01 | 0,5±0,04 | 0,5±0,02 | 0,3±0,02 | 0,2±0,01 |
| 30 | 102 | 0,3±0,01 | 0,2±0,07 | 0,1±0,01 | 0,1±0,03 | 0        |
| 31 | 104 | 0,4±0,02 | 0,4±0,06 | 0,4±0,01 | 0,2±0,01 | 0,1±0,02 |
| 32 | 109 | 0,6±0,02 | 0,5±0,02 | 0,4±0,08 | 0,3±0,01 | 0,3±0,03 |
| 33 | 110 | 0,4±0,04 | 0,4±0,02 | 0,2±0,01 | 0,3±0,02 | 0,1±0,03 |
| 34 | 111 | 0,4±0,06 | 0,3±0,04 | 0,3±0,05 | 0,2±0,01 | 0        |
| 35 | 114 | 0,7±0,01 | 0,7±0,02 | 0,7±0,04 | 0,5±0,04 | 0,3±0,01 |
| 36 | 115 | 0,2±0,04 | 0,2±0,01 | 0,2±0,03 | 0,2±0,04 | 0,1±0,01 |
| 37 | 122 | 0,3±0,01 | 0,3±0,06 | 0,3±0,07 | 0,2±0,04 | 0,2±0,01 |
| 38 | 124 | 0,4±0,06 | 0,3±0,06 | 0,2±0,02 | 0,2±0,04 | 0,2±0,04 |
| 39 | 127 | 0,3±0,02 | 0,2±0,04 | 0,3±0,06 | 0,3±0,03 | 0,3±0,03 |
| 40 | 129 | 0,3±0,03 | 0,2±0,04 | 0,1±0,04 | 0,1±0,02 | 0,1±0,03 |
| 41 | 130 | 0,3±0,06 | 0,3±0,03 | 0,3±0,04 | 0,3±0,01 | 0        |
| 42 | 131 | 0,4±0,05 | 0,3±0,04 | 0,3±0,06 | 0,3±0,04 | 0,2±0,03 |
| 43 | 132 | 0,8±0,02 | 0,5±0,02 | 0,5±0,03 | 0,3±0,04 | 0,3±0,04 |
| 44 | 135 | 0,6±0,02 | 0,5±0,04 | 0,4±0,04 | 0,3±0,01 | 0,3±0,01 |
| 45 | 136 | 0,2±0,06 | 0,1±0,02 | 0,1±0,04 | 0,1±0,01 | 0        |
| 46 | 144 | 0,6±0,03 | 0,5±0,01 | 0,5±0,01 | 0,4±0,01 | 0,4±0,01 |
| 47 | 148 | 0,5±0,03 | 0,3±0,05 | 0,3±0,06 | 0,2±0,04 | 0,1±0,04 |
| 48 | 151 | 0,3±0,05 | 0,3±0,05 | 0,4±0,03 | 0,3±0,05 | 0,2±0,01 |
| 49 | 152 | 0,2±0,02 | 0,3±0,03 | 0,2±0,06 | 0,1±0,03 | 0        |
| 50 | 153 | 0,7±0,04 | 0,5±0,01 | 0,4±0,02 | 0,2±0,03 | 0,2±0,01 |
| 51 | 156 | 0,2±0,06 | 0,1±0,03 | 0,1±0,04 | 0,1±0,01 | 0,1±0,02 |
| 52 | 158 | 0,1±0,04 | 0,1±0,01 | 0,1±0,03 | 0        | 0        |
| 53 | 159 | 0,4±0,02 | 0,2±0,04 | 0,2±0,06 | 0,1±0,03 | 0,1±0,01 |
| 54 | 161 | 0,5±0,03 | 0,3±0,02 | 0,3±0,01 | 0,3±0,02 | 0,3±0,01 |
| 55 | 165 | 0,3±0,01 | 0,4±0,01 | 0,3±0,07 | 0,3±0,01 | 0,2±0,02 |
| 56 | 167 | 0,3±0,07 | 0,3±0,01 | 0,2±0,02 | 0,2±0,01 | 0,1±0,03 |
| 57 | 169 | 0,8±0,01 | 0,5±0,05 | 0,5±0,01 | 0,4±0,05 | 0,4±0,03 |

\*Código do fungo: o nome do fungo pode ser consultado no Quadro 3 (item 4.2.1). USPMCT+ código do fungo descrito.

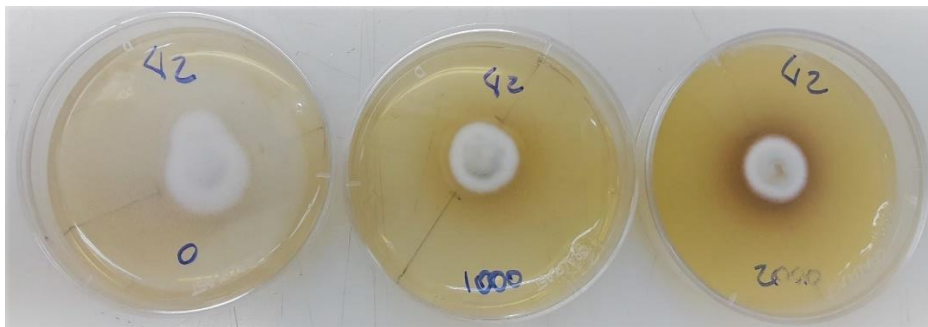
Em nossos experimentos constatamos que algumas espécies fúngicas produziram pigmentos escuros enquanto cresciam no meio contaminado com altas concentrações de urânio (Figura 16), sugerindo a presença de melanina, possivelmente produzida pelo fungo em resposta ao estresse causado pelo metal tóxico.

Em ambientes extremos, com altas concentrações de metais, o estresse faz com que os fungos utilizem mecanismos de tolerância a toxicidade e assim sobrevivem. Uma dessas estratégias de sobrevivência é a diminuição do crescimento, onde se busca diminuir o consumo de energia e nutrientes. Outra estratégia é a produção de partículas orgânicas, de melanina e a

germinação de esporos, podendo o fungo persistir no ambiente por longos períodos (CHÁVEZ et al. 2015; MAGAN, 2007).

Alguns estudos sugerem que um dos efeitos dos metais pesados nos microrganismos é a redução da sua taxa de crescimento (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017). Em fungos os efeitos dos metais pesados podem estar relacionados a diminuição da velocidade de crescimento micelial (BALDRIAN, 2003; GADD et al. 2001; GADD; GRIFFITHS, 1980; NEWBY; GADD, 1987).

Figura 16 - Fungo código 42 (*Talaromyces amestolkiae*), crescendo em meio PDA suplementado com 0, 1000 e 2000 mg/L de urânio.



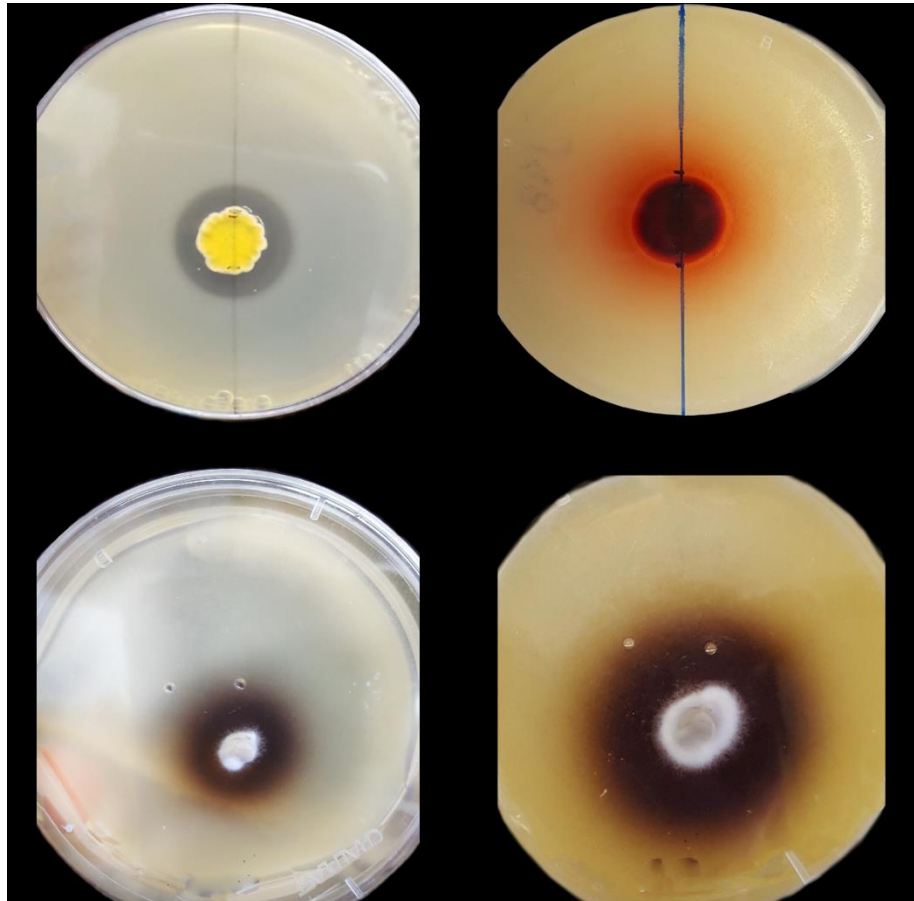
Fungo produziu pigmentos escuros nas altas concentrações testadas

#### 4.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

Dos 57 fungos testados, nas concentrações de 1000 mg/L, 2000 mg/L, 4000 mg/L e 8000 mg/L, houve inibição do crescimento de 1, 3, 11 e 17 fungos, respectivamente. Vinte e cinco fungos não tiveram o CIM definido, porque mesmo nas mais altas concentrações testadas (8000 mg/L) eles foram capazes de crescer (quadro 4 – item 4.4). Não foi possível aumentar as concentrações devido a precipitação do metal no meio.

Nossos experimentos demonstram que os fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi são altamente resistentes ao urânio. Os fungos também demonstraram mudanças morfológicas, produção de pigmentos e halos ao redor das colônias, em meio de cultura suplementado com concentrações de urânio acima de 2000 mg/L (Figura 17).

Figura 17 – Mudanças morfológicas, produção de pigmentos e halos ao redor das colônias, nos isolados fúngicos cultivados em meio PDA suplementado com altas concentrações de urânio (2000 mg/L).



De modo geral, os fungos apresentam alta resistência aos metais pesados, relacionada a sua habilidade de adsorver, bioacumular (intra ou extra celular), transformar (transformação da camada de valência), produzir pigmentos ou complexar metais pesados (FERREIRA et al. 2010; ZAFAR; AQIL; AHMAD, 2007).

As espécies fúngicas isoladas de locais contaminados, como minas de urânio, são mais resistentes aos metais pesados, em comparação com fungos da mesma espécie isolados de locais não contaminados. Portanto, torna-se necessário, nos processos de biorremediação, que o microrganismo utilizado seja isolado do próprio local contaminado (EZZOUHRI et al. 2009; FAZLI et al. 2015; FERREIRA et al. 2010).

A produção de pigmentos pelos fungos causa mudança na coloração do meio e nos micélios, indicando que esses organismos estão precipitando os íons de metais pesados. A

produção de melanina, por exemplo, afeta diretamente a morfologia dos fungos, e é geralmente é relacionada a resposta dos fungos ao estresse causado pelos íons de metais pesados (BAN et al. 2012; BARROW; AALTONEN, 2001; GRUHN; MILLER, 1991).

Os fungos isolados de ambientes extremos possuem alta capacidade de adaptação fisiológica e expressão genica, visando proteção ao estresse causado por íons de metais pesados presentes no ambiente (DHAR et al. 2013). Dessa maneira, podem se adaptar mais rapidamente ao ambiente contaminado, tornando mais eficiente o processo de biorremediação (FAZLI et al. 2015).

Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são descritos como resistentes aos íons de metais pesados, e em sua maioria são mais resistentes ao urânio que as bactérias (MUMTAZ et al. 2013; ZAFAR; AQIL; AHMAD, 2007). Recentes estudos realizados por Fazli et al. (2015) e Liang et al. (2015) demonstraram diminuição no crescimento de *Aspergillus* spp. causado pelo urânio, porém, constatou-se, nas hifas, precipitação do urânio e minerais contendo fosfato.

Os resultados de U-IT, IVCN e CIM foram importantes e demonstraram que os fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi adaptaram-se às altas concentrações do metal. As concentrações de urânio testadas em nossos experimentos (100 a 8000 mg/L) foram acima das concentrações constatadas em diversos locais do mundo, como por exemplo, a contaminação de água em algumas cidades dos Estados Unidos (0,03 a 9 mg/L) (NAVRATIL, 2001) ou em amostras de solo em Portugal (64-252 mg/kg) (NEVES; ABREU, 2009).

#### 4.4 Teste de bioissorção

Após os fungos serem submetidos aos testes de tolerância ao urânio, foram realizados os testes de bioissorção. Utilizamos biomassa viva para verificarmos a capacidade dos isolados de remover o urânio da água.

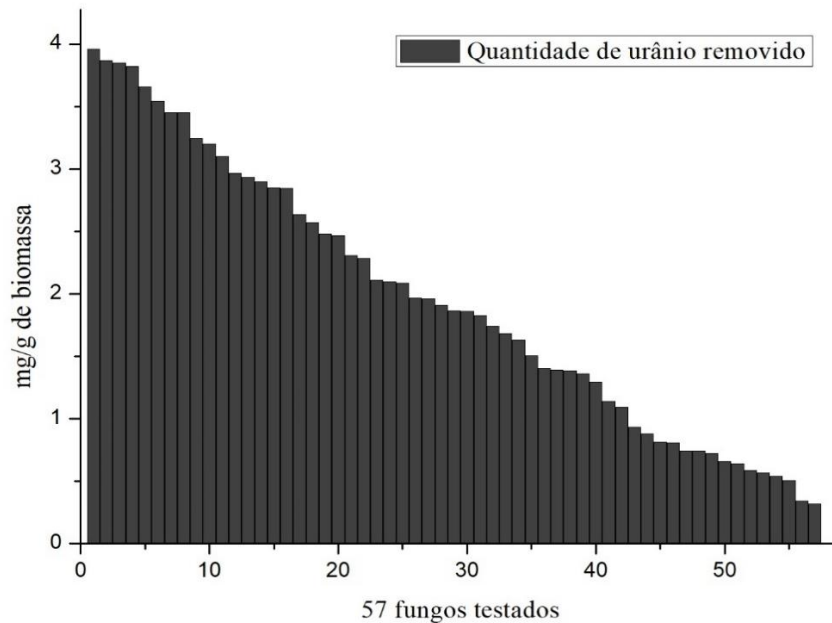
Nos testes de bioissorção, todos os 57 fungos foram capazes de remover urânio da solução aquosa, porém, as concentrações do metal removidas foram diferentes para cada isolado fúngico (Figura 18). Em nossos experimentos, definimos como os melhores bioissorventes àqueles que apresentaram  $q > 3$ , isso representa a quantidade de urânio removido (mg) por grama de biomassa fúngica. A porcentagem de remoção do urânio acima de 60% também foi um fator determinante.

Entre as 11 espécies fúngicas que apresentaram alto potencial de bioissorção de urânio na água, e que revelaram  $q > 3$ , as espécies de *Penicillium piscarium*; *Gongronella butleri*; *Phoma*



*nebulosa* e *Talaromyces amestolkiae* foram as que mais se destacaram. Os resultados das análises de bioabsorção e o valor “q” de cada fungo podem ser acessados no Quadro 4.

Figura 18 - Teste de bioabsorção dos 57 isolados fúngicos da mina de urânio Osamu Utsumi.



O valor do coeficiente de correlação de Pearson, no estudo comparativo entre a tolerância ao urânio dos 57 fungos, com a capacidade de bioabsorção, revelou baixa correlação (0,1). Entretanto, 5 dos fungos isolados apresentaram ótimos resultados em todos os experimentos de resistência e bioabsorção. O código dos fungos são USPMCT 54, 79, 122, 124 e 165, identificados respectivamente como *Gongronella butleri*, *Penicillium piscarium*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium ludwigii*, *Talaromyces amestolkiae* (quadro 4).

Nossos resultados são muito interessantes, pois o pH menor que 4 reduz os processos de bioabsorção de metais pesados do ambiente. Os íons de hidrogênio competem com os íons de metais pesados pelos sítios de ligação na célula fúngica, ou seja, a redução das cargas negativas nos sítios de ligação resulta na inibição da ligação ao urânio (FARHAN; KHADOM, 2015). Resultados similares foram descritos em outros estudos de bioabsorção, onde o aumento do pH causou o aumento da remoção dos metais do ambiente (BARROS JÚNIOR et al. 2003; PANG et al. 2011; PATEL; CHANDEL, 2015).

Alguns trabalhos demonstram que a bioabsorção de urânio por materiais biológicos foi considerada baixa em condições ácidas, devido a competição do  $H_3O^+$  com os íons de urânio nos locais de sorção (cargas negativas dos grupos funcionais carboxil e fosfato, por exemplo),

sendo a captação do urânio elevada com o aumento do pH (LIU et al. 2007; SOLAT; REZA; SOHEILA, 2014).

Em estudos de biossorção de urânio, utilizando biomassas de *Sarcharomyces* spp e *Mucor* spp. revelaram percentuais de remoção do metal entre 40 e 55% (GUIBAL; ROULPH; LE CLOIREC, 1992; PANG et al. 2011; ZHENG et al. 2018).

Em ambientes ácidos contaminados com urânio, a remediação torna-se um grande desafio principalmente quando o metal encontra em baixas concentrações. Sabe-se fungos são importantes na imobilização de pequenas quantidades de urânio dissolvido em água (OGAR et al. 2014).

Fazli et al. 2015, utilizando vários fungos filamentosos para testes de bioacumulação de cádmio, demonstraram que os fungos conseguem acumular valores de 7 a 2 mg do metal por g de biomassa, resultados próximos aos obtidos em nosso experimento com urânio.

Espécies de *Penicillium* são consideradas importantes na remoção de metais pesados como cádmio, zinco, chumbo e cobre (LEITÃO, 2009) e na remoção de urânio de ambientes contaminados (GALUN et al. 1983). A utilização de biomassa morta de *P. citrinum* foi eficaz na remoção de baixas concentrações de urânio em soluções aquosas, sendo que a capacidade de biossorção pelo fungo foi maior (127,3 mg/g) quando o pH da solução foi aumentado para 6 (PANG et al. 2011).

Diferentes parâmetros como os de pH, temperatura e tempo de contato são importantes nos testes para potencializar a remoção do metal do ambiente, melhorando o processo de biossorção. Os estudos também sugerem que a biomassa morta de espécies como *Penicillium* spp. apresentam ótimos resultados nos processos de biossorção de urânio meio aquoso (PANG et al. 2011; VERMA et al. 2013).

Apesar de não existirem muitos manuscritos sobre biossorção utilizando o fungo *Gongronella butleri*, esse microrganismo apresenta alta quantidade de quitosana na parede celular, muitos estudos indicam que esse polímero é conhecido por ser o melhor adsorvente de metais pesados comparado a todos os outros polímeros até agora testados (HU et al. 2004), até o momento não encontramos trabalhos falando da utilização desse fungo na biossorção de urânio.

Quadro 4 - Resultados dos testes de resistência, tolerância e bioacumulação de urânio dos 57 fungos isolados da mina de urânio Osamu Utsumi

| Nº | Testes de Resistência e tolerância |                  |             | Amostra   | Teste de bioacumulação |                           |      |      |
|----|------------------------------------|------------------|-------------|-----------|------------------------|---------------------------|------|------|
|    | Código                             | U-TI (100 mg/kg) | CIM (mg/kg) |           | Controle (mg/L)        | Media após contato (mg/L) | E%   | q    |
| 1  | USPMCT9                            | 0,70±0,01        | 8000        | Sedimento | 100                    | 84,1±0,03                 | 15,9 | 0,74 |
| 2  | USPMCT13                           | 0,73±0,03        | >           | Sedimento | 100                    | 87,5±0,4                  | 12,5 | 0,57 |
| 3  | USPMCT16                           | 0,94±0,02        | 8000        | Sedimento | 100                    | 74,1±0,2                  | 25,9 | 1,30 |
| 4  | USPMCT19                           | 0,78±0,02        | >           | Sedimento | 100                    | 22,6±0,2                  | 77,4 | 3,87 |
| 5  | USPMCT21                           | 0,76±0,01        | >           | Sedimento | 100                    | 60,8±0,1                  | 39,2 | 1,96 |
| 6  | USPMCT23                           | 0,78±0,04        | >           | Sedimento | 100                    | 72,8±0,2                  | 27,2 | 1,36 |
| 7  | USPMCT26                           | 0,73±0,02        | >           | Água      | 100                    | 77,2±0,3                  | 22,8 | 1,14 |
| 8  | USPMCT38                           | 0,93±0,01        | >           | Solo      | 100                    | 72,3±0,5                  | 27,7 | 1,39 |
| 9  | USPMCT40                           | 1,00±0,01        | 4000        | Solo      | 100                    | 61,4±0,2                  | 38,6 | 1,91 |
| 10 | USPMCT42                           | 0,83±0,03        | >           | Solo      | 100                    | 71,9±0,3                  | 28,1 | 1,41 |
| 11 | USPMCT43                           | 1,00±0,01        | 8000        | Solo      | 100                    | 65,2±0,4                  | 34,8 | 1,74 |
| 12 | USPMCT44                           | 1,02±0,01        | 4000        | Solo      | 100                    | 65,4±0,2                  | 34,6 | 1,73 |
| 13 | USPMCT47                           | 0,89±0,02        | 4000        | Solo      | 100                    | 66,4±0,4                  | 33,6 | 1,68 |
| 14 | USPMCT53                           | 1,30±0,04        | 4000        | Solo      | 100                    | 93,6±0,2                  | 6,4  | 0,32 |
| 15 | USPMCT54                           | 1,18±0,03        | >           | Solo      | 100                    | 26,9±0,2                  | 73,1 | 3,66 |
| 16 | USPMCT56                           | 1,02±0,02        | >           | Solo      | 100                    | 40,7±0,05                 | 59,3 | 2,97 |
| 17 | USPMCT62                           | 0,94±0,01        | 8000        | Solo      | 100                    | 35,1±0,3                  | 64,9 | 3,25 |
| 18 | USPMCT63                           | 0,71±0,03        | 4000        | Solo      | 100                    | 83,7±0,1                  | 16,3 | 0,82 |
| 19 | USPMCT68                           | 1,38±0,04        | 4000        | Solo      | 100                    | 87,2±0,2                  | 12,8 | 0,64 |
| 20 | USPMCT69                           | 1,21±0,05        | 4000        | Solo      | 100                    | 69,9±0,2                  | 30,1 | 1,51 |
| 21 | USPMCT72                           | 0,82±0,02        | 8000        | Solo      | 100                    | 86,8±0,5                  | 13,2 | 0,66 |
| 22 | USPMCT73                           | 1,07±0,01        | 4000        | Solo      | 100                    | 89,2±0,1                  | 10,8 | 0,54 |
| 23 | USPMCT74                           | 1,04±0,02        | 8000        | Solo      | 100                    | 89,9±0,1                  | 10,1 | 0,51 |
| 24 | USPMCT76                           | 1,28±0,02        | 2000        | Solo      | 100                    | 42,0±0,2                  | 58,0 | 2,90 |
| 25 | USPMCT79                           | 1,12±0,02        | >           | Solo      | 100                    | 23,0±0,4                  | 77,0 | 3,85 |
| 26 | USPMCT81                           | 0,50±0,01        | >           | Solo      | 100                    | 85,6±0,5                  | 14,4 | 0,72 |
| 27 | USPMCT88                           | 0,86±0,03        | >           | Água      | 100                    | 83,8±0,4                  | 16,2 | 0,81 |
| 28 | USPMCT94                           | 0,88±0,03        | >           | Solo      | 100                    | 31,0±0,1                  | 69,0 | 3,45 |
| 29 | USPMCT99                           | 0,77±0,01        | >           | Solo      | 100                    | 72,2±0,1                  | 27,8 | 1,39 |
| 30 | USPMCT102                          | 0,70±0,01        | >           | Solo      | 100                    | 41,4±0,2                  | 58,6 | 2,93 |
| 31 | USPMCT104                          | 1,12±0,01        | 8000        | Solo      | 100                    | 85,2±0,3                  | 14,8 | 0,74 |
| 32 | USPMCT109                          | 0,95±0,02        | 8000        | Solo      | 100                    | 48,6±0,05                 | 51,4 | 2,57 |
| 33 | USPMCT110                          | 1,53±0,02        | >           | Solo      | 100                    | 63,5±0,2                  | 36,5 | 1,83 |
| 34 | USPMCT111                          | 0,96±0,04        | 8000        | Solo      | 100                    | 78,2±0,1                  | 21,8 | 1,09 |
| 35 | USPMCT114                          | 0,98±0,04        | 8000        | Sedimento | 100                    | 31,0±0,3                  | 69,0 | 3,45 |
| 36 | USPMCT115                          | 0,94±0,03        | >           | Solo      | 100                    | 62,7±0,5                  | 37,3 | 1,87 |
| 37 | USPMCT122                          | 1,37±0,01        | 2000        | Água      | 100                    | 36,0±0,2                  | 64,0 | 3,20 |
| 38 | USPMCT124                          | 1,00±0,02        | 8000        | Solo      | 100                    | 29,2±0,2                  | 70,8 | 3,54 |
| 39 | USPMCT127                          | 0,82±0,01        | 2000        | Solo      | 100                    | 43,1±0,1                  | 56,9 | 2,85 |
| 40 | USPMCT129                          | 0,73±0,01        | 8000        | Solo      | 100                    | 93,2±0,2                  | 6,8  | 0,34 |
| 41 | USPMCT130                          | 1,24±0,02        | 4000        | Solo      | 100                    | 67,4±0,5                  | 32,6 | 1,63 |
| 42 | USPMCT131                          | 0,83±0,03        | 8000        | Solo      | 100                    | 58,3±0,2                  | 41,7 | 2,09 |
| 43 | USPMCT132                          | 0,70±0,03        | >           | Sedimento | 100                    | 50,4±0,4                  | 49,6 | 2,48 |
| 44 | USPMCT135                          | 0,98±0,02        | 8000        | Solo      | 100                    | 57,8±0,3                  | 42,2 | 2,11 |
| 45 | USPMCT136                          | 0,92±0,01        | 4000        | Solo      | 100                    | 38,0±0,1                  | 62,0 | 3,10 |
| 46 | USPMCT144                          | 0,98±0,02        | >           | Solo      | 100                    | 58,1±0,1                  | 41,9 | 2,10 |
| 47 | USPMCT148                          | 0,62±0,03        | 8000        | Solo      | 100                    | 47,3±0,03                 | 52,7 | 2,64 |
| 48 | USPMCT151                          | 1,40±0,02        | 4000        | Solo      | 100                    | 53,9±0,2                  | 46,1 | 2,31 |
| 49 | USPMCT152                          | 1,07±0,02        | >           | Solo      | 100                    | 43,0±0,1                  | 57,0 | 2,85 |
| 50 | USPMCT153                          | 0,71±0,03        | >           | Solo      | 100                    | 88,3±0,2                  | 11,7 | 0,59 |
| 51 | USPMCT156                          | 0,92±0,03        | 8000        | solo      | 100                    | 54,3±0,2                  | 45,7 | 2,29 |

|    |           |           |      |           |     |          |      |      |
|----|-----------|-----------|------|-----------|-----|----------|------|------|
| 52 | USPMCT158 | 1,20±0,01 | 1000 | Água      | 100 | 82,4±0,1 | 17,6 | 0,88 |
| 53 | USPMCT159 | 0,65±0,01 | >    | Solo      | 100 | 60,7±0,5 | 39,3 | 1,97 |
| 54 | USPMCT161 | 0,76±0,01 | 8000 | Solo      | 100 | 81,3±0,3 | 18,7 | 0,94 |
| 55 | USPMCT165 | 1,68±0,02 | >    | Solo      | 100 | 23,6±0,3 | 76,4 | 3,82 |
| 56 | USPMCT167 | 1,39±0,03 | >    | Sedimento | 100 | 50,7±0,1 | 49,3 | 2,47 |
| 57 | USPMCT169 | 0,71±0,01 | >    | Água      | 100 | 20,8±0,3 | 79,2 | 3,96 |

Código= código do fungo, que pode ser consultado no quadro 3 (item 6.2.1) ; U-IT= índice de tolerância ao urânio; CIM= Concentração inibitória mínima; > = CIM não estipulado, maior que as concentrações testadas (8000 mg/kg); E%= porcentagem de metal removido; q= mg/ de urânio por grama de biomassa do fungo.

#### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

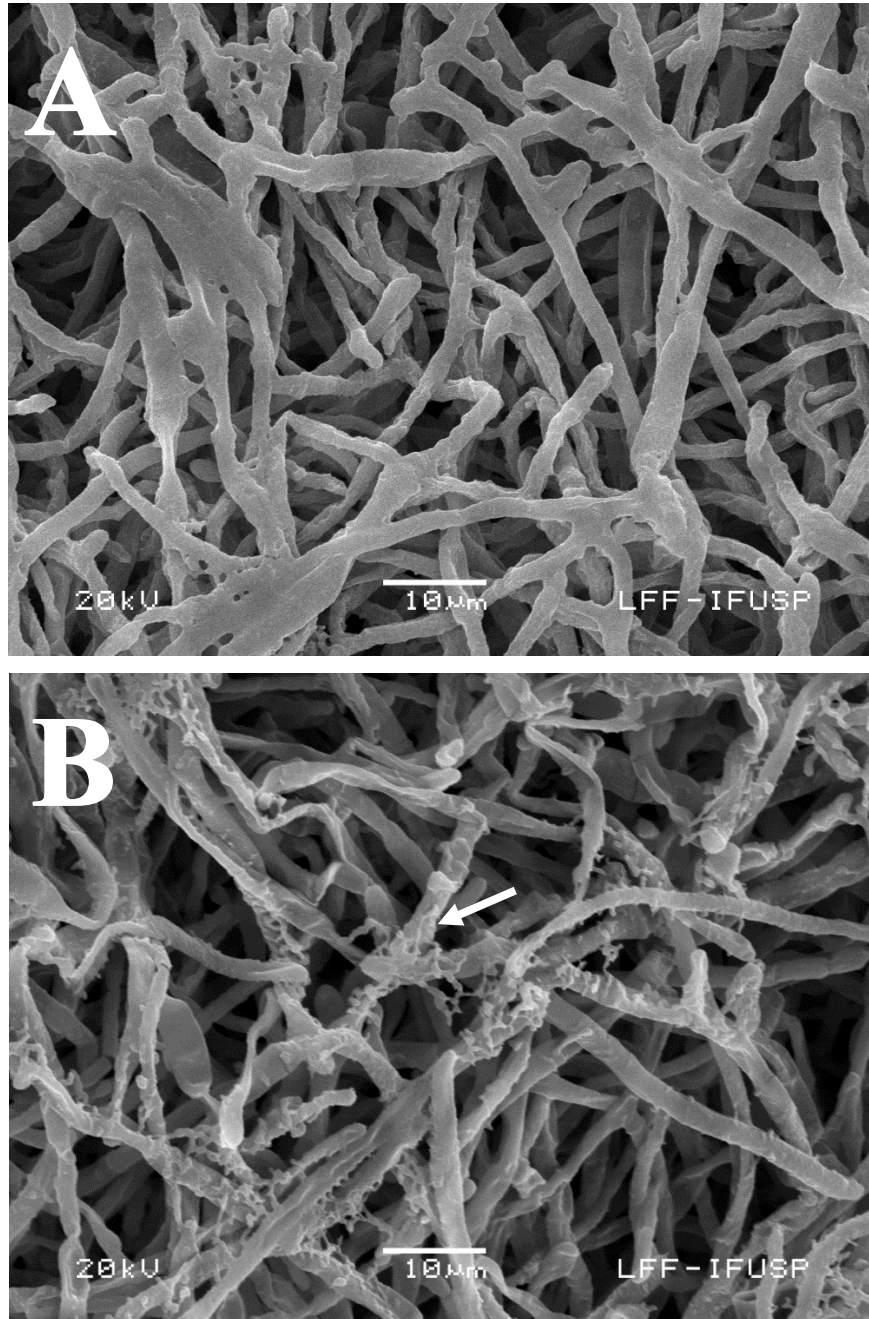
As espécies de *Penicillium* spp. demonstraram ótimos potenciais para a biorremediação de urânio na água, portanto, após os processos de bioissorção, utilizamos a biomassa do fungo *Penicillium piscarium* (código 79), que teve um q= 3.85 e uma porcentagem de metal removido de 77%, para realizarmos a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A MEV demonstrou que o fungo *Penicillium piscarium* foi eficiente em precipitar urânio na parede celular das hifas (Figura 19), a confirmação da presença de urânio na estrutura das hifas foi realizada através de EDS (espectroscopia de energia dispersiva) (Figura 21). Esses resultados foram similares aos trabalhos realizados sobre precipitação de urânio em biomassa fúngica de Liang et al. (2015).

A precipitação de urânio na superfície da célula fúngica pode acontecer devido aos processos de bioissorção ou biomineralização. O urânio pode aderir às estruturas da superfície celular ou formar minerais complexos, por exemplo, através da ligação com moléculas de fosfato (MAJUMDER; WALL, 2017).

Os mecanismos de captação de urânio pela biomassa fúngica podem também estar relacionados à ligação do radionuclídeo aos grupos hidroxila, carboxila, amina e fosfodiéster (VAZQUEZ-CAMPOS et al. 2015) Tanto a biomassa viva como a biomassa morta de fungos podem ser utilizadas nos processos de bioissorção, ambas geralmente exibem alta tolerância aos metais pesados e outras condições extremas como o baixo pH (ZAFAR; AQIL; AHMAD, 2007).

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da biomassa viva do fungo *Penicillium piscarium*. A micrografia A mostra a biomassa do fungo que não foi exposta ao urânio, já a micrografia B são as hifas que foram utilizadas na biossorção cobertas pelo urânio (setas). As micrografias C e D são imagens ampliadas das hifas A e B, respectivamente.



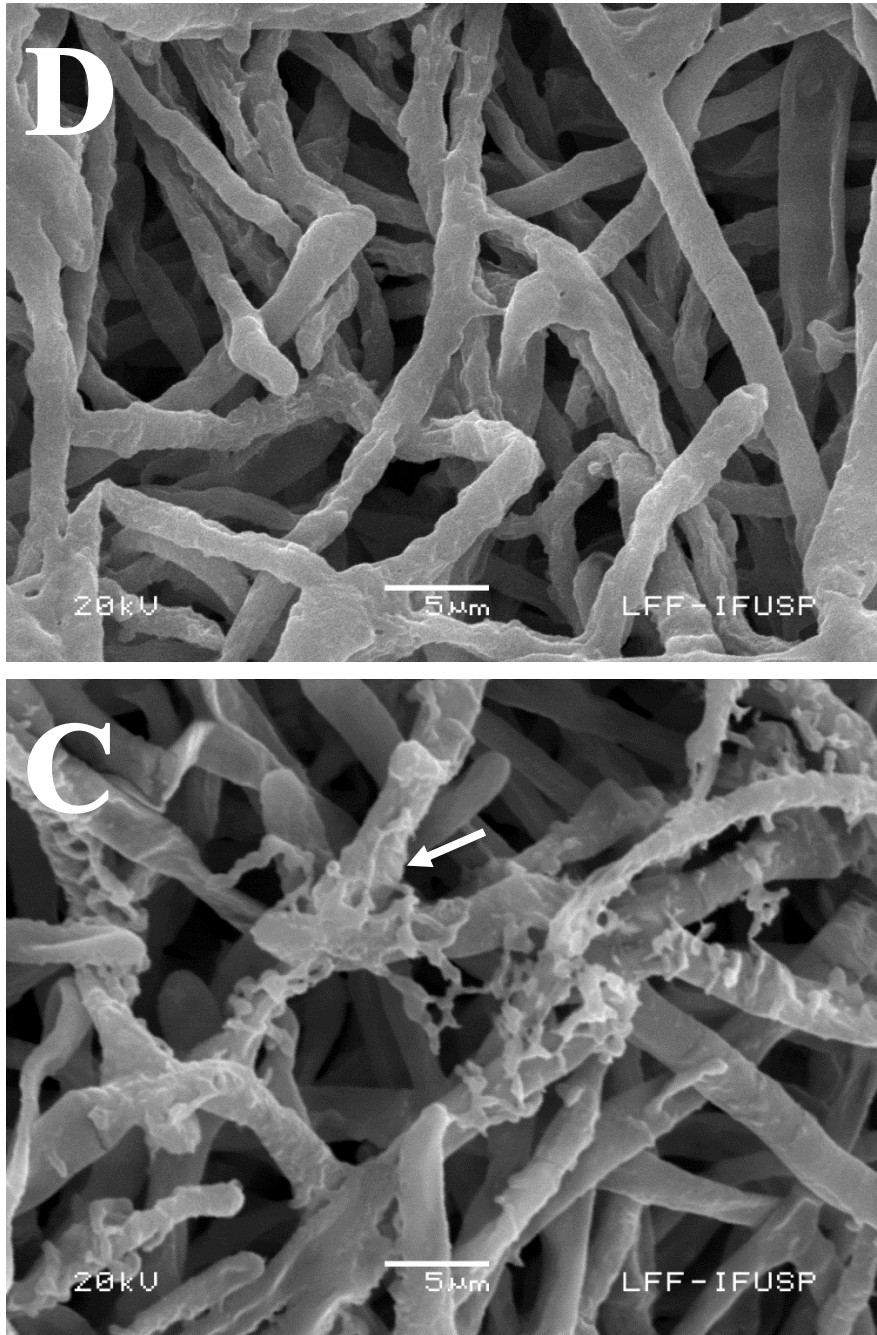


Figura 19. (continuação)

Figura 20 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) identifica os elementos existentes nas hifas (biomassa não exposta ao urânio)

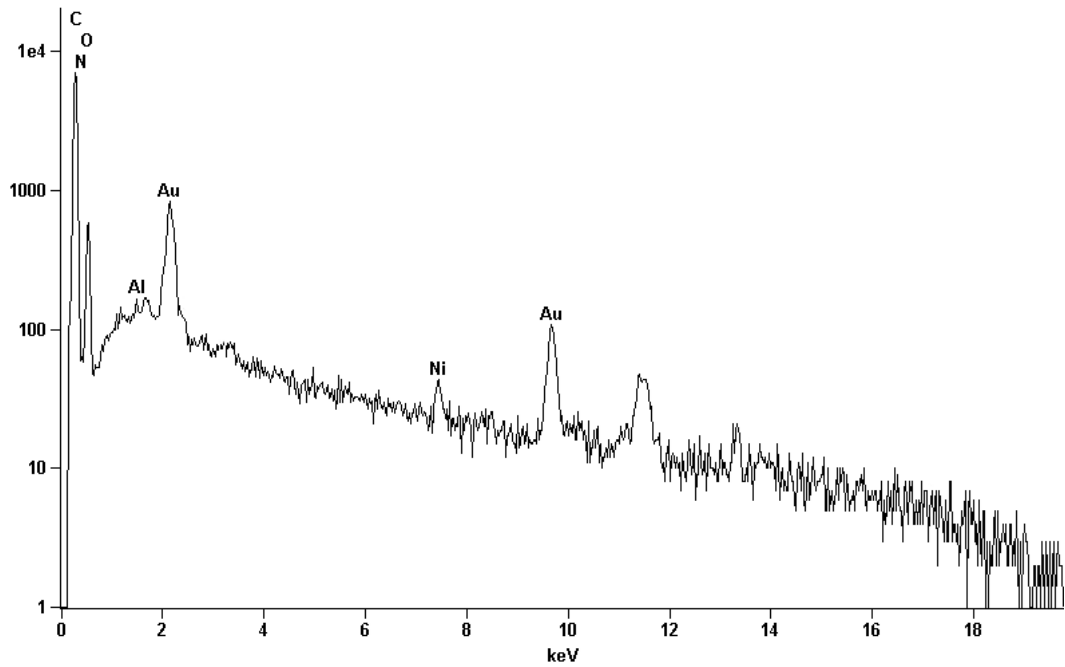
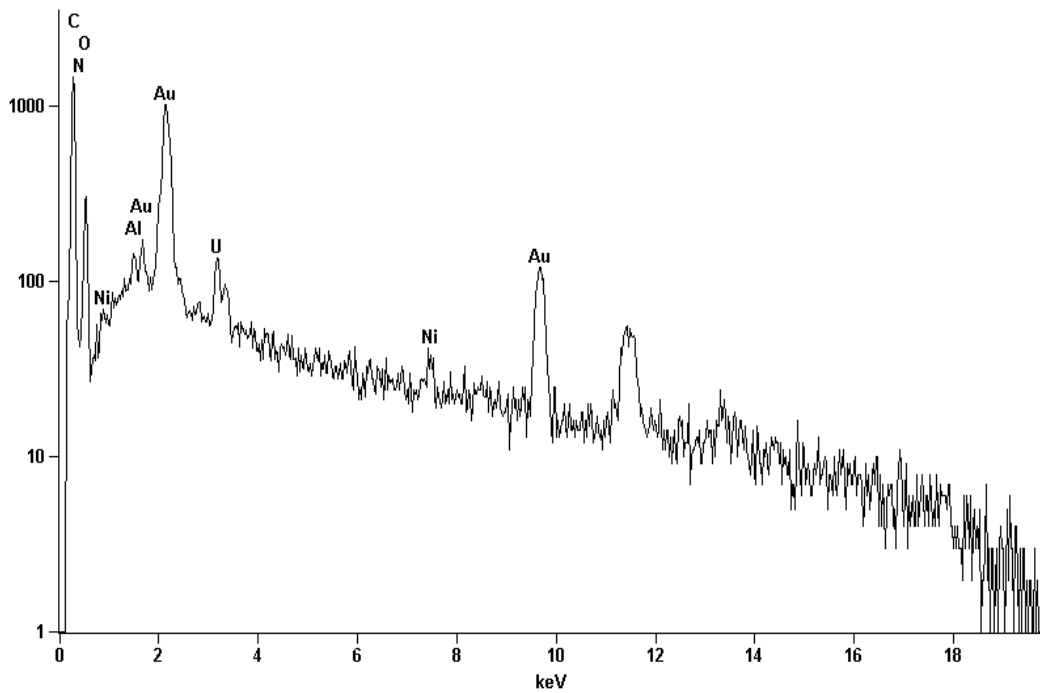


Figura 21 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) identifica os elementos existentes nas hifas do fungo (biomassa exposta ao urânio).



#### *4.5 Considerações finais*

De modo geral, nossos resultados sugerem que a capacidade de remoção de metais pesados não está relacionada à tolerância ou resistência do fungo ao urânio, fato que pode ser atribuído à diferenças entre os mecanismos de tolerância e captação do metal pesado (FAZLI et al. 2015; PAN; CAO; ZHANG, 2009). Entretanto, tendo em vista que 5 espécies fúngicas demonstraram ótimos resultados nos testes de resistência e bioissorção, sugerimos que, além dos testes de tolerância/resistência, também sejam realizados testes de bioissorção, a fim de selecionar os fungos com maior potencial para biorremediação.



## 5 CONCLUSÕES

-A caracterização química das amostras de água revelou pH ácido (média de 3,3) concentrações de urânio até 200 vezes acima dos limites estabelecidos pela Legislação Brasileira (0,02 mg/Kg);

-Os resultados da caracterização química das amostras de solo e sedimento revelaram altas concentrações de urânio, porém não existem limites estabelecidos pela Legislação Brasileira;

-Os resultados da caracterização química das amostras de água, solo e sedimento revelaram os efeitos prejudiciais causados pela drenagem ácida de mina;

-Apesar de apresentarem as maiores concentrações de urânio, foram das amostras de solo e sedimento que a maioria dos fungos filamentosos foram isolados;

-Foram isolados e identificados 57 fungos, destacando-se o gênero *Penicillium* como o mais frequentes. Dentro do gênero, a espécie *Penicillium piscarium* foi a mais prevalente;

-Dos 57 isolados fúngicos, 38% (22) foram tolerantes ao urânio. Desses fungos, 14 foram isolados das amostras de solo, onde as espécies de *Penicillium citrinum* foram as mais tolerantes;

-O aumento das concentrações de urânio no meio reduziu a velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos isolados;

-Em relação a Concentração Inibitória Mínima (CIM), 56 (98%) fungos cresceram na concentração de 1000 mg/L. Vinte e cinco fungos (44%) não tiveram a CIM definida, pois cresceram nas maiores concentrações de urânio empregadas (8000 mg/L), demonstrando que os fungos isolados da mina Osamu Utsumi apresentam alta resistência ao urânio;

-Os testes de bioadsorção de urânio do meio aquoso, utilizando biomassa viva dos fungos, demonstraram que 11 espécies fúngicas apresentaram alto potencial para biorremediação do metal, destacando-se as espécies de *Penicillium piscarium*; *Gongronella butleri*; *Phoma nebulosa* e *Talaromyces amestolkiae*.

-A comparação entre os resultados de bioadsorção e tolerância/resistência sugere uma baixa relação entre resistência ao urânio e capacidade de bioadsorção. Portanto, o acúmulo de urânio pelos fungos, de forma geral, nem sempre está relacionado com a maior tolerância/resistência ao metal pesado.

-Dentre os 57 isolados fúngicos, 5 espécies se destacaram por apresentarem alta resistência ao urânio e ótimo potencial para remoção de urânio do meio aquoso, a saber:

*Gongronella butleri*, *Penicillium piscarium*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium ludwigii*, *Talaromyces amestolkiae*. Portanto, esses fungos podem ser importantes como alternativa para os processos convencionais no tratamento de ambientes contaminados com urânio.

## 6 REFERÊNCIAS

ABD EL HAMEED, A. H. et al. Biosorption of uranium and heavy metals using some local fungi isolated from phosphatic fertilizers. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 345–351, 1 dez. 2015.

ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, R. L. Regulation of Aflatoxin Biosynthesis: Characterization of Glucose as an Apparent Inducer of Aflatoxin Production. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 143–146, jan. 1981.

AGI. What are regulations mining activities. 2018. **American Geoc. Institute**. Disponível em: <<https://www.americangeosciences.org/critical-issues/faq/what-are-regulations-mining-activities>>. Acesso em: 1 jan. 2019.

AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHMAD, F. Heavy Metal Biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp . isolated from Wastewater treated soil. **Journal of applied science and environmental management**, v. 9, n. 1, p. 123–126, 2005.

AKHTAR, S. et al. Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. **soil Environ.**, v. 32, n. 1, p. 55–62, 2013.

ALI, E. H.; HASHEM, M. Removal Efficiency of the Heavy Metals Zn(II), Pb(II) and Cd(II) by *Saprolegnia delica* and *Trichoderma viride* at Different pH Values and Temperature Degrees. **Mycobiology**, v. 35, n. 3, p. 135–44, 2007.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.

ANAHID, S.; YAGHMAEI, S.; GHOBADINEJAD, Z. Heavy metal tolerance of fungi. **Scientia Iranica**, v. 18, n. 3 C, p. 502–508, 2011.

ANDERSEN, B. et al. Associations between fungal species and water-damaged building materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4180–4188, 2011.

ARX, J. . VON. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2. ed. [s.l.] Cramer, Vaduz, 1974.

ASSUNÇÃO, E. et al. Effects of Gamma and Electron Beam Radiation on Brazil Nuts Artificially Inoculated with *Aspergillus flavus*. **Journal of food protection**, v. 78, n. 7, p. 1397–401, 2015.

ATSDR. Public Health Statement for Uranium. In: **Toxicological Profile for Uranium**. Atlanta, 2019. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp150-c1.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

AYANGBENRO, A. S.; BABALOLA, O. O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 1, 2017.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1–18, 2016.

BABIČ, M. N. et al. Fungal contaminants in drinking water regulation? A tale of ecology, exposure, purification and clinical relevance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 636, 13 jun. 2017.

BAHOBIL, A. et al. Fungal Biosorption for Cadmium and Mercury Heavy Metal Ions Isolated from Some Polluted Localities in KSA. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 6, n. 6, p. 2138–2154, 2017.

BAKER, B. J. et al. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6264–6271, 1 out. 2004.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 78–91, 2003.

BAN, Y. et al. The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

BANNING, A. et al. Drinking Water Uranium and Potential Health Effects in the German Federal State of Bavaria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 8, p. 927, 18 ago. 2017.

BAQUIÃO, A. C. et al. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 224–229, 1 dez. 2012.

BARRON, G. L. **The genera of Hyphomycetes from soil**. New York: R.E. Krieger, 1972.

BARROS JÚNIOR, L. M. et al. Biosorption of cadmium using the fungus *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 3, p. 229–239, set. 2003.

BARROW, J. R.; AALTONEN, R. E. Evaluation of the internal colonization of atriplex canescens (pursh) nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. **Mycorrhiza**, v. 11, n. 4, p. 199–205, 2001.

BENGTSSON, L. et al. Studies on the biosorption of uranium by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 807–811, jan.

1995.

BHAT, U. N.; KHAN, A. B. Heavy Metals: An Ambiguous Category of Inorganic Contaminants, Nutrients and Toxins. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 8, p. 682–690, 1 ago. 2011.

BISHNOI, N. R.; GARIMA, A. Fungus - An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 2, p. 93–100, 2005.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 63–67, 2000.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy**. 2. ed. Boston: ones & Bartlett Publishers, 1998.

BUTTERWORTH, A. The Significance and Value of Uranium in Urine Analysis. **Trans. Assoc. Ind. Med**, v. 5, n. 3, p. 36–46, 1955.

CAPPELLO, F.; MACARIO, A. J. L. Depleted uranium induces human carcinogenesis involving the immune and chaperoning systems: Realities and working hypotheses. **Medical Hypotheses**, v. 124, p. 26–30, mar. 2019.

CCME. Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health, uranium. 2007. Book: **Canadian environmental quality guidelines**. 14 pages.

CHAN, W. K. et al. Mycoremediation of Heavy Metal/Metalloid-Contaminated Soil: Current Understanding and Future Prospects. In: [s.l.] **Springer**, Cham, 2016. p. 249–272.

CHÁVEZ, R. et al. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 903, 2015.

CHENG, S. et al. Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals. **Ecological Engineering**, v. 18, n. 3, p. 317–325, 1 jan. 2002.

CIPRIANI, M. Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio. 2002. 332 p. Tese (Doutorado em Geociências) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

CLESCERI, L. S. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. [s.l.] American Public Health Association, 1998.

CNEN. Avaliação da qualidade das águas e sedimentos das microbacias do ribeirão das Antas e do ribeirão de caldas no planalto de poços de caldas. **Relatório técnico da comissão das águas**. CNEN, 52 p. Poços de Caldas, 2012.

COLLINS, Y.; STOTZKY, G. Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. In: DOYLE, T. J.; BEVERIDGE, R. J. (Eds.). . **Metal ions and Bacteria**. Toronto: Wiley, p. 31–90, 1989.

CRICHTON, R. R.; CRICHTON, R. R. Biomineralisation. **Biological Inorganic Chemistry**, p. 359–378, 1 jan. 2012.

CUMBERLAND, S. A. et al. Uranium mobility in organic matter-rich sediments: A review of geological and geochemical processes. **Earth-Science Reviews**, v. 159, p. 160–185, 1 ago. 2016.

D'ANNIBALE, A. et al. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 723–731, 20 jun. 2005.

D'ANNIBALE, A. et al. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 28–36, 3 jan. 2006.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159–169, 2008.

DAVIS, M. 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, nov. 1993.

DEGOLA, F. et al. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 2, p. 409–17, ago. 2007.

DEL, B. et al. Diversity and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá Bay , São Sebastião ( SP ), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic Matter Concentrations. **Microbial Ecology**, 2016.

DHAR, R. et al. Yeast adapts to a changing stressful environment by evolving cross-protection and anticipatory gene regulation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 573–588, 2013.

DIAS, M. D. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial , produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp . isolados de *Coffea arabica* L. **Ciênc. agrotec.**, v. 29, n. 3, p. 545–552, 2005.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

DUPRÉ DE BOULOIS, H. et al. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on uranium

accumulation by plants. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 99, n. 5, p. 775–784, 1 maio 2008.

DUTRA, P. H. et al. Impact of <sup>210</sup>Pb from Osamu Utsumi mine on sediment of rivers in caldas region, Minas Gerais. **2013 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013**, v. 45, n. 32, p. 10, 2013.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 28–36, 1 set. 2016.

ELBAZ-POULICHET, F. et al. Trace metal and nutrient distribution in an extremely low pH (2.5) river–estuarine system, the Ria of Huelva (South–West Spain). **Science of The Total Environment**, v. 227, n. 1, p. 73–83, fev. 1999.

ELDERFIELD, H.; UPSTILL-GODDARD, R.; SHOLKOVITZ, E. R. The rare earth elements in rivers, estuaries, and coastal seas and their significance to the composition of ocean waters. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 54, n. 4, p. 971–991, abr. 1990.

ELLESS, M. P.; LEE, S. Y. Uranium Solubility of Carbonate-Rich Uranium-Contaminated Soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 107, n. 1/4, p. 147–162, 1998.

EPA. Introduction to in Situ Bioremediation of Groundwater. p. 1–86, 2013.

EZZOUHRI, L. et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, **African Journ. of Microbiology**. Morocco. v. 3, n. 2, p. 35–48, 2009.

FAGUNDES, J. R. T. Balanço hídrico do bota-fora <sup>238</sup>U da mina osamu utsumi, inb, como Subsídio para Projetos de Remediação de Drenagem Ácida. **Revista Brasileira de recursos hídricos**, v. 13, n. 1, p. 19–28, 2008.

FARHAN, S. N.; KHADOM, A. A. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae*. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 119–130, 18 jun. 2015.

FAZLI, M. M. et al. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. **Journal of environmental health science & engineering**, v. 13, n. July, p. 19, 2015.

FERRARI, C. R. Avaliação de efeitos ambientais de efluentes radioativos de mineração de urânio sobre as características físicas, químicas e diversidade da Comunidade Zooplanctônica na Unidade de Tratamento de Minérios, Represa das Antas e Represa Bortolan, Poços de Caldas. 2010. 132p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FERRARI, C. R. et al. Effects of the discharge of uranium mining effluents on the water quality of the reservoir: An integrative chemical and ecotoxicological assessment. **Scientific**

**Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

FERREIRA, V. et al. Contamination by uranium mine drainages affects fungal growth and interactions between fungal species and strains. **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 1004–1011, 2010.

FETTUS, G. H.; MCKINZIE, M. G. **Nuclear Fuel's Dirty Beginnings: Environmental Damage and Public Health Risks From Uranium Mining in the American West**. 2002. Disponível em: <<https://www.nrdc.org/sites/default/files/uranium-mining-report.pdf>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

FPTCD, F. P. T. C. ON D. **Uranium in Drinking Water**. 2017 Disponível em: <<https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/programs/consultation-uranium-drinking-water/consultation-uranium-drinking-water-eng.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

GAD, A. S. The Potential Impact of Micro-organisms on Radioactive Wastes. **Chemistry Research Journal**, v. 2017, n. 6, p. 1–7, 2017.

GADD, G. M. The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. In: ECCLES, H. H.; HUNT, S. (Eds.). . **Immobilisation of Ions by Bio-sorption**. [s.l.] Ellis Horwood, Chichester, 1986. p. 135–147.

GADD, G. M. et al. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 311–316, 1 nov. 2001.

GADD, G. M.; FOMINA, M. Uranium and Fungi. **Geomicrobiology Journal**, v. 28, p. 471–482, 2011.

GADD, G. M.; GRIFFITHS, A. J. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 2, p. 387–392, 1 abr. 1980.

GALUN, M. et al. Recovery of uranium (VI) from solution using fungi II. Release from uranium-loaded *Penicillium* biomass. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 20, n. 3, out. 1983.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, v. 3, n. 1, p. 58–66, 2003.

GOMES, A. F. DA S.; LADEIRA, A. C. Q. Caracterização de lamas contendo urânio como subsídio para ações futuras de mitigação. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 64, n. 4, p. 479–485, dez. 2011.



GOMES, N. C. M.; MENDONCA-HAGLER, L. C. S.; SAVVAIDIS, I. Metal Bioremediation by Microorganisms. **Revista de microbiologia**, v. 29, n. 2, p. 85–92, 1998.

GOMPERTZ, O. F. et al. Estrutura, morfologia, reprodução e taxonomia dos fungos. **Microbiologia**, p. 888, 2015.

GRÄFE, M.; KLAUBER, C. Bauxite residue issues: IV. Old obstacles and new pathways for in situ residue bioremediation. **Hydrometallurgy**, v. 108, p. 46–59, 2011.

GRUHN, C. M.; MILLER, O. K. Effect of copper on tyrosinase activity and polyamine content of some ectomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 95, n. 3, p. 268–272, 1991.

GUÉGUEN, Y. et al. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 187–195, 18 abr. 2006.

GUIBAL, E.; ROULPH, C.; LE CLOIREC, P. Uranium biosorption by a filamentous fungus *Mucor miehei* pH effect on mechanisms and performances of uptake. **Water Research**, v. 26, n. 8, p. 1139–1145, 1 ago. 1992.

HAMDI, H. et al. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1926–1935, 2007.

HARDER, J. **What if you ate uranium?**. 2019. Disponível em: <<https://science.howstuffworks.com/science-vs-myth/what-if/what-if-ate-uranium.htm>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

HÖLKER, U.; FAKOUSSA, R. M.; HÖFER, M. Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize low-rank coal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3–4, p. 351–355, dez. 1995.

HU, K.-J. et al. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 1, p. 45–52, 1 out. 2004.

IBRAM. Impactos da mineração na economia brasileira. **Instituto Brasileiro de Mineração**. 2015. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, p. 167–182, 2003.

JIANG, Y. et al. Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. **Chemosphere**, v. 161, p. 300–307, 1 out. 2016.

JO, W. S. et al. Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Ganoderma applanatum*. **Mycobiology**, v. 37, n. 2, p. 94–102, jun. 2009.

KAR, A.; SHETTY, R.; HEGDE, A. M. Enamel defects seen among children residing near uranium mines. A case control study. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) e-ISSN**, v. 15, n. 1, p. 137–142, 2016.

KATAR, Ş. et al. *Talaromyces aculeatus* from acidic environment as a new fungal biosorbent for removal of some reactive textile dyes. **Anadolu University Journal of Science and Technology A-Applied Sciences and Engineering**, 2017.

KOTA, M. F. et al. Bioremediation of crude oil by different fungal genera. **Asian Journal of Plant Biology**. v. 2, n. 1, p. 11–18, 2014.

KOZAKIEWICZ, Z. Aspergillus species on the stored products. **Mycological Papers**, v. 161, p. 188, 1989.

KURTTIO, P. et al. Renal effects of uranium in drinking water. **Environmental health perspectives**, v. 110, n. 4, p. 337–42, abr. 2002.

LADEIRA, A. C. Q.; GONÇALVES, C. R. Influence of anionic species on uranium separation from acid mine water using strong base resins. **Journal of hazardous materials**, v. 148, n. 3, p. 499–504, 30 set. 2007.

LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 4, p. 1393–1417, 2009.

LI, M. et al. Combined Application of Rice Straw and Fungus *Penicillium Chrysogenum* to Remediate Heavy-Metal-Contaminated Soil. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 23, n. 3, p. 328–338, 29 jan. 2014.

LIANG, X. et al. Uranium phosphate biomineralization by fungi. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 2064–2075, 2015.

LIANG, X.; GADD, G. M. Metal and metalloid biorecovery using fungi. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1199–1205, 2017.

LIMA, H. M. DE; FLORES, J. C. DO C.; COSTA, F. L. Plano de recuperação de áreas degradadas versus plano de fechamento de mina: um estudo comparativo. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 59, n. 4, p. 397–402, dez. 2006.

LIU, R. et al. Effect of pH on biosorption of boron onto cotton cellulose. **Desalination**, v. 207, n. 1–3, p. 257–267, 10 mar. 2007.

LLOYD, J. R. Microbial reduction of metals and radionuclides. **FEMS Microbiology**

**Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 411–425, 1 jun. 2003.

LÓPEZ-ARCHILLA, A. I. et al. Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 923–934, nov. 2004.

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Bioremediation of uranium contamination with enzymatic uranium reduction. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 11, p. 2228–2234, nov. 1992.

LYEW, D.; SHEPPARD, J. D. Effects of physical parameters of a gravel bed on the activity of sulphate-reducing bacteria in the presence of acid mine drainage. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 223–230, nov. 1997.

MAGAN, N. Fungi in Extreme Environments. In: KUBICEK, C.; DRUZHININA, I. (Eds.). . **Environmental and Microbial Relationships**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 85–103.

MAJUMDER, E. L.-W.; WALL, J. D. Uranium Bio-Transformations: Chemical or Biological Processes? **Open Journal of Inorganic Chemistry**, v. 07, n. 02, p. 28–60, 7 abr. 2017..

MARIA, A.; ANDRADE, R. DE. Átomos na política internacional Atoms in international politics. **Revista CTS, nº**, v. 7, p. 113–140, 2012.

MARTINS, C. M. et al. Estudo microbiológico relacionado à geração de drenagem ácida em antigas minas de pirita no município de ouro preto, mg. **Geochim. Brasil.**, 18(2)077-085, 2004.

MAYNARD, E.; HODGE, H. Studies of the toxicity of various uranium compounds when fed to experimental animals. In: HODGE, H. (Ed.). **Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds**. New York: [s.n.]. p. 309–376.

MEINRATH, A.; SCHNEIDER, P.; MEINRATH, G. Uranium ores and depleted uranium in the environment, with a reference to uranium in the biosphere from the Erzgebirge/Sachsen, Germany. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 64, n. 2–3, p. 175–193, 1 jan. 2003.

MORAES, E. N. et al. Radiometria em área urano-fosfática da cidade de Igarassu-Pernambuco. IX Latin American IRPA Regional Congress on Radiation Protection and Safety - **IRPA**. Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <[https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/45/071/45071075.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/45/071/45071075.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2019.

MUMTAZ, S. et al. Fungi outcompete bacteria under increased uranium concentration in culture media. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 120, p. 39–44, 2013.

MUSTAPHA, M. U.; HALIMOON, N. Microorganisms and Biosorption of Heavy Metals in the Environment: A Review Paper. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 05, p. 1–4, 20 ago. 2015.

NASCIMENTO, M. R. L.; FATIBELLO-FILHO, O.; TEIXEIRA, L. A. Recovery of uranium from acid mine drainage wasters by ion exchange. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, v. 25, n. 2, p. 129–142, 12 abr. 2004.

NAVRATIL, J. D. Advances in treatment methods for uranium contaminated soil and water. **Archive of Oncology**, v. 9, n. 4, p. 257–260, 2001.

NRC. Uranium Mining in Virginia: Scientific, Technical, Environmental, Human Health and Safety, and Regulatory Aspects of Uranium Mining and Processing in Virginia. **National Research Council**. Washington, DC: The National Academies Press. 360p. 2012.

NEVES, O.; ABREU, M. M. Are uranium-contaminated soil and irrigation water a risk for human vegetables consumers? A study case with *Solanum tuberosum* L., *Phaseolus vulgaris* L. and *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 8, p. 1130–1136, 10 nov. 2009.

NEWBY, P. J.; GADD, G. M. Synnema induction in *Penicillium funiculosum* by tributyltin compounds. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 89, n. 3, p. 381–384, 1 out. 1987.

NEWSOME, L.; MORRIS, K.; LLOYD, J. R. The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides. **Chemical Geology**, v. 363, p. 164–184, 10 jan. 2014.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 730–50, jun. 1999.

NÓBREGA, F. A.; LIMA, H. M. DE; LEITE, A. DO L. Análise de múltiplas variáveis no fechamento de mina: estudo de caso da pilha de estéril BF-4, Mina Osamu Utsumi, INB Caldas, Minas Gerais. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 61, n. 2, p. 197–202, jun. 2008.

OGAR, A. et al. ScienceDirect Stabilization of Uranium(VI) at Low pH by Fungal Metabolites: Applications in Environmental Biotechnology. **APCBEE Procedia**, v. 10, n. Vi, p. 142–148., 2014.

OHJI, T. Advances in materials science for environmental and energy technologies. Wiley, **American Ceramic Society**, vol. 241, New Jersey, 2012.

OLSTORPE, M.; SCHNÄRER, J.; PASSOTH, V. Screening of yeast strains for phytase

activity. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 3, p. 478–488, 1 maio 2009.

OLSZEWSKI, G.; BORYŁO, A.; SKWARZEC, B. Uranium (234U, 235U and 238U) contamination of the environment surrounding phosphogypsum waste heap in Wiślinka (northern Poland). **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 146, p. 56–66, 1 ago. 2015.

PAN, R.; CAO, L.; ZHANG, R. Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium sp.* A1 and Cd-resistant *Fusarium sp.* A19. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1–3, p. 761–766, 2009.

PANG, C. et al. Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution by dead fungal biomass of *Penicillium citrinum*. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 1, p. 1–6, 2011.

PANNU, T. S.; SUKHMANI; GILL, K. S. Uranium-Toxicity and Uranium-Induced Osteosarcoma Using A New Regimen and Surgery: A First-Time Experience. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 6, p. RD01-3, jun. 2015.

PAOLETTI, M. G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 1–18, jun. 1999.

PATEL, R.; CHANDEL, M. Effect of pH and Temperature on the Biosorption of Heavy Metals by *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN**. Vol 4 (1), 2272-2275, jan. 2015.

PEDROBOM, J. H. et al. In situ speciation of uranium in treated acid mine drainage using the diffusion gradients in thin films technique (DGT). **Chemosphere**, v. 169, p. 249–256, 1 fev. 2017.

PEINTNER, U.; MOSER, M. Survey of heavy metal deposition at the Schulterberg (Achenkirch altitude profiles) by using basidiomycetes as bioindicators. **Phyton - Annales Rei Botanicae**, v. 36, n. 4, p. 155–162, 1996.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15. ed. Piracicaba: Fealq, 2009.

PIMMATA, P.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 196–204, 2013.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. New York: Springer US, 2009.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage** (2nd ed.). London: Blackie Academic and Professional. 1997.

PLUMRIDGE, A. et al. The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification.

**Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3506–11, jun. 2004.

POSTON, T. M.; HANF, R. W.; SIMMONS, M. A. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 22, n. 3, p. 289–298, abr. 1984.

QIAN, X. et al. Characterization of fungal-mediated carbonate precipitation in the biomineralization of chromate and lead from an aqueous solution and soil. **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 198–208, 15 out. 2017.

RADESPIEL-TRÖGER, M.; MEYER, M. Association between drinking water uranium content and cancer risk in Bavaria, Germany. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 86, n. 7, p. 767–776, 6 out. 2013.

RAHMAN, K. S. M. et al. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource technology**, v. 81, n. 1, p. 25–32, jan. 2002.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J. E. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. **Mycological Research**, v. 97, n. 11, p. 1393–1402, 1 nov. 1993.

RASKIN, I. et al. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 285–290, jun. 1994.

REISINGER, S. et al. Heavy metal tolerance and accumulation in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase. **International journal of phytoremediation**, v. 10, p. 440–454, 2008.

RIDDEL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture mycology. v. 42, 1950. p. 265-270

ROBERTS, D. **Uranium Toxicity**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). 2012. Disponível em: <[www.atsdr.cdc.gov/csem/](http://www.atsdr.cdc.gov/csem/)>. Acesso em: 7 fev. 2019.

ROSS, I. S. Some effects of heavy metals on fungal cells. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 64, n. 2, p. 175–193, 1 abr. 1975.

ROYCHOWDHURY, A.; SARKAR, D.; DATTA, R. Remediation of Acid Mine Drainage-Impacted Water. **Current Pollution Reports**, v. 1, n. 3, p. 131–141, 16 set. 2015.

RUFYIKIRI, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil. **Environmental Pollution**, v. 130, n. 3, p. 427–436, 2004.

SAFDARI, M. S. et al. Development of bioreactors for comparative study of natural

attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 342, p. 270–278, 15 jan. 2018.

SALVADORI, M. R. et al. Bioremediation from wastewater and extracellular synthesis of copper nanoparticles by the fungus *Trichoderma koningiopsis*. **Journal of environmental science and health**. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering, v. 49, n. November, p. 1286–95, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANA, S.; ROOSTAAZAD, R.; YAGHMAEI, S. Biosorption of Uranium (VI) from Aqueous Solution by Pretreated *Aspergillus niger* Using Sodium Hydroxide. **Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition**, v. 34, n. 1, p. 65–74, 2015.

SCOW, K. M.; HICKS, K. A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 246–253, 1 jun. 2005.

SELBMANN, L. et al. Drought meets acid: three new genera in a dothidealean clade of extremotolerant fungi. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 1–20, 2008.

SHAZIA, I.; UZMA, G.; TALAT, A. Bioremediation of Heavy Metals Using Isolates of Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus* Collected from Polluted Soil of Kasur, Pakistan. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 12, p. 66–73, 2013.

SHENO MERRIN, J. et al. Biosorption of chromium VI using *Rhizopus arrhizus*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 36, n. 10, p. 1052–1055, 1998.

SHETTY, Y. R.; HEGDE, A. M.; KAR, A. Observation of Teeth Eruption Timings Among a Group of Children Residing Near Uranium Mines. **International Journal of Oral Health and Medical Research**. 2(5):9-12, fev. 2016.

SILVA, C. M.; SOUZA, G. H.; AMARAL, R. S. Determinação da concentração de urânio em poços de abastecimento público da região urano-fosfática de Pernambuco. **Physicae**, v. 3, n. 3, p. 58–62, 1 jan. 2003.

SILVA, N. DA; JUNQUEIRA, V. C. A. Métodos de análise microbiológica de alimentos. **Manual Técnico**, p. 229, 1995.

SILVA, R. R. **Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. 180 p. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Botânica, Secretaria Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SOLAT, S.; REZA, R.; SOHEILA, Y. Biosorption of Uranium from Aqueous Solution by Live and Dead *Aspergillus niger*. **Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste**, v. 18, n. 3, p. 04014016, jul. 2014.

SOUZA, A. M.; SILVEIRA, C. S.; PEREIRA, R. M. Contribuições dos metais provenientes das pilhas de rejeito da mina Osamu Utsumi a drenagens do Complexo Alcalino de Poços de Caldas, Minas Gerais. **Geochimica Brasiliensis**, v. 27, n. 1, p. 63–76, 2013.

SPOON, M. **Milling and Processing - How Uranium Mining Works**. Disponível em: <<https://science.howstuffworks.com/uranium-mining4.htm>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

SUH, J. et al. An Overview of GIS-Based Modeling and Assessment of Mining-Induced Hazards: Soil, Water, and Forest. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 12, 2017.

SUJA, F. et al. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. **International Biodeterioration & Biodegradation** 90. 115-122 2014.

SVECOVA, L. et al. Cadmium, lead and mercury biosorption on waste fungal biomass issued from fermentation industry. I. Equilibrium studies. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 1, p. 142–153, 1 nov. 2006.

TAN, T.; CHENG, P. Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 119–128, fev. 2003.

TSEZOS, M.; GEORGOUSIS, Z.; REMOUDAKI, E. Mechanism of aluminum interference on uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 1, p. 16–27, 5 jul. 1997.

TSEZOS, M.; VOLESKY, B. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 2, p. 385–401, fev. 1982.

USNRC. **Conventional Uranium Mills**. 2017. United States Nuclear Regulatory Commission. Disponível em: <<https://www.nrc.gov/materials/uranium-recovery/extraction-methods/conventional-mills.html>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

VÁZQUEZ-CAMPOS, X. et al. Uranium Binding Mechanisms of the Acid-Tolerant Fungus *Coniochaeta fodinicola*. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 14, p. 8487–8496, 2015.

VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F. Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. waste biomass. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 2, p. 171–173, 9 fev. 2000.



VAZQUEZ-CAMPOS, X. et al. Fodinomyces uranophilus gen. nov. sp. nov. and Coniochaeta fodinicola sp. nov., two uranium mine-inhabiting Ascomycota fungi from northern Australia. **Mycologia**, v. 106, n. 6, p. 1073–1089, 2014.

VDH. **Frequently asked questions about uranium**. 2016 . Virginia Department of Health. Disponível em: <<http://www.vdh.virginia.gov/content/uploads/sites/12/2016/01/FAQ-Uranium-2018.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

VERMA, A. et al. Biosorption of Cu (II) using free and immobilized biomass of *Penicillium citrinum*. **Ecological Engineering**, v. 61, p. 486–490, 1 dez. 2013.

VICENTE-VICENTE, L. et al. Nephrotoxicity of Uranium: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Perspectives. **Toxicological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 324–347, 1 dez. 2010.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure Appl. Chem.**, Vol. 73, No. 7, pp. 1163–1172, 2001.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 343–371, 2014.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 797–806, 1995.

VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z. R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 8, p. 826–829, 5 abr. 1993.

WAGNER, S. E. et al. Groundwater uranium and cancer incidence in South Carolina. **Cancer Causes & Control**, v. 22, n. 1, p. 41–50, 16 jan. 2011.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2001.

WEIR, E. Uranium in drinking water, naturally. **CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 170, n. 6, p. 951–2, 16 mar. 2004.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. **PCR Protocols**, p. 315–322, 1 jan. 1990.

WHO. **The chemical toxicity of uranium**. 2016. World Health Organization. Disponível em: <[https://www.who.int/ionizing\\_radiation/pub\\_meet/en/Depluranium4.pdf?ua=1](https://www.who.int/ionizing_radiation/pub_meet/en/Depluranium4.pdf?ua=1)>. Acesso em: 11 fev. 2019.

WINDE, F.; ERASMUS, E.; GEIPEL, G. Uranium contaminated drinking water linked to leukaemia—Revisiting a case study from South Africa taking alternative exposure pathways

into account. **Science of The Total Environment**, v. 574, p. 400–421, 1 jan. 2017.

WUNDERLIN, D. The Suquía River Basin (Córdoba, Argentina): An Integrated Study on Its Hydrology, Pollution, Effects on Native Biota and Models to Evaluate Changes in water quality. **Hdb env chem**. 62: 207, 2018.

YANG, H. B. et al. Biosorption of uranium(VI) by a mangrove endophytic fungus *Fusarium sp.* #ZZF51 from the South China Sea. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 291, n. 3, p. 1011–1016, 2012.

YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 175–341, jun. 2014.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2557–2561, 2007.

ZHENG, X. Y. et al. Effect of pH on uranium(VI) biosorption and biomineralization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemosphere**, v. 203, p. 109–116, 1 jul. 2018.

ZUBBAIR, N. Studies on nutritional requirements of *colletotrochum hibisci* (tracy & earle.). **International Journal of Applied Biological Research**, v. 1, n. 2, p. 55–61, 2009.