

DETERMINAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA MAMONA (*Ricinus communis* L.), COM POTENCIAL PARA SEREM UTILIZADOS COMO AGENTES BIORREMEDIADORES EM TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO VEGETAL

Laudiane Bruna Zanella¹, Maria Luiza Fernandes², Roseli de Mello³

RESUMO

Uma maneira de utilizar a biorremediação é isolar micro-organismos produtores de enzimas capazes de degradar poluentes, como as enzimas produzidas por fungos, principalmente os endofíticos. Este trabalho teve como objetivo isolar fungos endofíticos da Mamona (*Ricinus communis* L.) com potencial para serem utilizados como biorremediadores em solo contaminado com óleo vegetal. Após os fungos serem isolados e identificados, realizou-se o *screening* enzimático, a qual a levedura denominada 17C, apresentou o maior perfil de produção de lipase, sendo utilizado para a biorremediação. O solo foi acrescido de 1mL da levedura 17C, e diferentes concentrações de óleo de vegetal, 0,5 mL, 1mL e 2 mL, em três tratamentos, T1, T2 e T3, respectivamente. Após 30 dias incubação, o óleo não consumido foi extraído do solo e os resultados obtidos, foram comparados pelo teste de Tukey a 5%, o qual mostrou diferença estatística entre os tratamentos, considerando o melhor tratamento o T1 com 92% de consumo de óleo, seguido dos T2 e T3 com 75% e 63% de consumo de óleo vegetal, respectivamente.

Palavras-chave: Biorremediação. Fungos endofíticos. Solos contaminados.

ABSTRAT

One of the many ways of bioremediation usage is the isolation of micro-organisms that produce enzymes able to degrade pollutants, as enzymes produced by fungi, mainly the endophytic ones. This research aims to isolate endophytic fungi of Castor Bean (*Ricinus communis* L.) with the potential to be used as bioremediators in vegetable oil contaminated soils. After isolation and identification, enzymatic screening demonstrated that the yeast 17C has the best enzymatic profile of lipase. Thereafter, the soil was added with 1mL-1 of yeast and different concentrations of vegetable oil (0,5mL, 1mL e 2mL), which received different treatments, T1, T2 and T3, respectively. After 30 days of incubation, the not consumed oil was extracted from the ground and results were compared by Tukey test at 5%, which showed statistical difference between treatments, considering the best treatment the T1 with 92% of oil consumption, followed by T2 and T3 with 75% and 63% of vegetable oil consumption, respectively.

Keywords: Bioremediation. Endophytic fungi. Contaminated soil.

1 INTRODUÇÃO

O lixo gerado, em sua maior parte, não tem destinação correta, e quando deixado em local inadequado causa poluição contribuindo para os problemas ambientais (MARTINS, *et al.* 2010). Segundo HUMBERTO (2007), os brasileiros consomem aproximadamente três bilhões de litros de óleo de cozinha por ano. A contaminação do solo por óleo de cozinha pode vir a comprometer o aumento de custo no tratamento de drenagem do solo, devido a possível impermeabilização dificultando o escoamento de água das chuvas, tal fato propício para as enchentes.

1 Acadêmica em Bacharel em Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba-Paraná).

2 Química, Coorientadora, Professora Doutora da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba-Paraná).

3 Bióloga, Orientadora, Professora Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba-Paraná).

Segundo alguns autores, a remediação biológica ou biorremediação é um processo mais seguro e eficiente quando comparado aos processos convencionais (físicos e químicos), pois se baseia num processo menos agressivo de remoção de poluentes. Consiste no uso de micro-organismos de ocorrência natural, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de transformar compostos como óleos e derivados de petróleo, por exemplo, em substâncias com pouco ou nenhuma toxicidade.

FRITSCHÉ *et al.* (2000) relatou que a biorremediação foi definida como uma redução biológica catalisada de uma complexidade de compostos químicos. Este processo é baseado em crescimento e metabolismo. Para ZHOU *et al.* (2004), a biorremediação tem características de baixo consumo de energia, alta eficiência e é altamente segura ambientalmente, podendo degradar contaminantes por meio de bactérias, fungos, plantas e enzima de células livres.

Conforme citado por DUA *et al.* (2002), com os avanços da biotecnologia, a biorremediação vem se tornando um dos campos que mais se desenvolveu com relação a recuperação ambiental de áreas degradadas, utilizando micro-organismos para degradar contaminantes como hidrocarbonetos do petróleo, *hidrocarbonetos policíclicos aromáticos* (HPA) e ftalatos.

Segundo, MOREIRA (2009), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de mamona. Atualmente ela vem sendo pesquisada e utilizada como uma fonte alternativa para a substituição dos produtos originários de petróleo, principalmente o Biodiesel (MOREIRA, 2009). A mamona (*Ricinus communis* L.), pertence à família *Euphorbiaceae*, que engloba vasto número de tipos de plantas nativas da região tropical. É uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e racemos, podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo, e é popularmente chamada de mamona, carrapateira, rícino e palma-de-cristo (SAVY FILHO *et al.*, 1999).

As interações entre plantas e micro-organismos são conhecidas há muito tempo. Recentemente vem sendo registrada a presença de micro-organismos no interior dos tecidos vegetais saudáveis, abrindo novas perspectivas para os estudos da interação planta-micro-organismo. Estes são os chamados fungos endofíticos, micro-organismos que ao menos durante uma fase de seu ciclo de desenvolvimento habitam o interior do vegetal sem lhe causar danos ou doenças (PETRINI, 1986).

Entre os diversos interesses para a biorremediação ressaltam-se as enzimas produzidas por fungos, principalmente os endofíticos.

Logo, destacam-se enzimas usadas para biorremediação por contaminantes como diferentes tipos de óleos e de gorduras, entre estão as lipases. Segundo MENONCIN *et al.* (2009) lipases são enzimas que catalisam a quebra de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Devido às suas propriedades bioquímicas, as lipases despertam interesse em vários segmentos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Este trabalho teve como objetivo determinar fungos endofíticos da Mamona (*Ricinus communis* L) com potencial para serem utilizados como agentes biorremediadores para recuperação do solo contaminado com óleo vegetal.

Os experimentos foram realizados no CITEC – Laboratório de Química da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná, campus Prof. Sydney Lima Santos (Barigui).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e desinfecção

A coleta das amostras de mamona (*Ricinus communis L.*) foi realizada em setembro de 2013, em cinco localidades diferentes do Bairro Santo Inácio, próximo a Universidade Tuiuti do Paraná; Curitiba-PR. Foram coletadas aproximadamente 200 folhas com um aspecto sadio e jovem e colhidas de forma aleatória, em diferentes plantas.

O material botânico coletado foi lavado abundantemente em água corrente para a retirada de excesso de resíduos sólidos epifíticos e matéria orgânica, tomando o devido cuidado de não ferir as amostras, bem como descartando as folhas danificadas. A desinfecção deu-se através de lavagens por imersão: primeiramente, em câmara asséptica, o material foi lavado duas vezes em água destilada esterilizada por 30 segundos, seguida de solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, de solução de hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos, novamente em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos para retirar o excesso de hipoclorito e por fim 03 vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto, para a retirada dos resquícios dos agentes esterilizantes, conforme utilizado por PIMENTEL (2001).

2.2 Isolamento

Em condições assépticas as folhas foram fragmentadas em formato quadricular de aproximadamente 5 mm. De forma aleatória, cinco fragmentos foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar), suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 mg.L^{-1}) para o isolamento dos fungos, em um total de 200 placas. Estas foram incubadas em temperatura ambiente de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por aproximadamente 72 horas.

O crescimento das colônias foi acompanhado diariamente e à medida que ocorria o crescimento foram transferidos para novas placas de Petri contendo BDA, com a finalidade de purificar as colônias fúngicas e armazená-las a 4°C para posterior estudo (PIMENTEL *et al.*, 2006).

2.3 Identificação

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada através de observação microscópica das colônias e das estruturas de reprodução através da técnica de microcultivo, baseando-se em literatura especializada (LARONE, 1993).

Foram obtidos 65 morfotipos de fungos endofíticos que foram selecionados para o *screening* enzimático.

2.4 Screening enzimático

O *screening* enzimático foi realizado a fim de avaliar o potencial de produção das enzimas lipases, proteases, amilases, celulases e xantanases. Segundo OLIVEIRA (2010) os testes foram realizados utilizando apenas um meio mínimo (MgSO_4 0,2 g.L⁻¹; NaCl 0,1 g.L⁻¹; Extrato de Leveduras 0,4 g.L⁻¹; KH_2PO_4 0,4 g.L⁻¹; K_2HPO_4 0,1 g.L⁻¹ e ágar bacteriológico 15 g.L⁻¹) e variando-se apenas a fonte de carbono.

Como fonte de carbono foram utilizadas 1% de óleo de oliva e 0,01% de rodamina B para lipases, leite desnatado em pó a 2% para proteases, amido 1% para amilases, carboxymethylcellulose 1% para celulases e 0,2% de goma xantana para xantanases. A produção de lipases foi confirmada pela produção de halos alaranjados, fosforescentes ao UV a 350 nm. A revelação de proteases foi feita com ácido acético a 5% e confirmada com a presença de halos transparentes. As revelações de celulase e xantanase foram realizadas com vermelho congo 1% e certificada com a presença de halos transparentes. A zona clara em forma de halos indica a ação enzimática da celulase e xantanase, enquanto que a parte não afetada pela enzima cora-se de vermelho. A revelação da presença de amilase é feita com solução lugol, onde o amido cora-se de azul e a área de degradação enzimática apresenta halos translúcidos. Todas as análises foram realizadas após 72 horas de incubação em estufa a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

2.5 Viabilidade celular e biorremediação no solo

O micro-organismo escolhido para a realização dos ensaios fermentativos foi a levedura nominada de "17C", pois obteve melhores resultados no *screening* de lipase. Para a viabilidade da célula, a levedura "17C" foi inoculada em meio YM (Extrato de levedura 3,0 g.L⁻¹; extrato de malte 3,0 g.L⁻¹; bactopectona 5,0 g.L⁻¹ e glicose 64,0 g.L⁻¹, pH 5,5) e mantida em estufa a temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e amostras foram retiradas em 24, 48, 72 e 96 horas. Para confirmação dos resultados, os experimentos foram realizados em duplicata.

A viabilidade da célula foi determinada por dois métodos: espectrofotometria e contagem celular por câmara de Neubauer.

As medidas de absorbância foram realizadas a um comprimento de onda (λ) de 550 nm em espectrofotômetro com cubetas de vidro de 1 cm de diâmetro. Os valores obtidos foram utilizados para construir uma curva de crescimento celular. Já para determinação da viabilidade de célula de levedura utilizou-se o uso da técnica de contagem de célula por câmara de Neubauer.

Para biorremediação do solo, em cada Erlenmeyer foram adicionados 100 g de solo peneirado e esterilizado por 1 hora e 30 minutos à 121°C , foi adicionado 1 mL da levedura 17C no tempo que

apresentou maior viabilidade, 10mL de soro fisiológico e diferentes concentrações de óleo, 0,5 mL, 1 mL e 2 mL, em três tratamentos, T1, T2 e T3, respectivamente, e cultivados a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Trinta dias após o início do experimento, os Erlenmeyers foram retirados da estufa e acrescido de 100 mL de hexano (solvente orgânico) e levado a agitação por 26 rpm por 24 horas em temperatura $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após este procedimento, o solvente foi filtrado e levado a uma estufa de ar circulatório à 37°C , em um cadinho previamente dessecado e tarado. Após evaporar todo solvente o cadinho foi pesado e comparado com valores iniciais. Este experimento foi realizado em triplicada, para maior confiabilidade do resultado.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e analisado pelos testes de *Bartlett* e Tukey a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos isolados da folha da mamona (*Ricinus communis* L.)

Os fungos endofíticos apresentaram crescimento micelial visível a partir de 24 horas da inoculação, preenchendo a superfície do ágar. Foram obtidos 65 morfotipos fúngicos e estes foram caracterizados de acordo com seus morfotipos fúngicos em dados preliminares. Os resultados obtidos confirmam que os fungos isolados pertencem aos grupos: *Cladosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Micelia esterilia*, *Acremonium* sp., *Chrysosporium* sp., *Saccharomyces* sp., *Microsporium* sp. e *Aspergillus* sp.

As colônias fúngicas obtidas apresentavam-se distintas umas das outras, de acordo com observações macroscópicas, conforme mostra a figura 1.



Figura 1: Exemplos de Macromorfologia dos morfotipos endofíticos isolados de *Ricinus comunnis* L.
Fonte: O autor.

Segundo a literatura, estima-se que cerca de 1,5 milhão de espécies fúngicas endofíticas ainda serão descobertas nos trópicos (ARNOLD, 2000). Os estudos que estão sendo desenvolvidos, como o da microbiota fúngica endofítica de *Ricinus comunnis* L., são de fundamental importância para o conhecimento do potencial da biodiversidade no Brasil.

3.2 *Screening* da atividade enzimática de fungos endofíticos

Depois de caracterizados os 65 morfotipos fúngicos foram realizados o *screening* enzimático com o objetivo de avaliar o potencial produtivo de enzimas para aplicação biotecnológica, tais como lipases, amilases, proteases, xantanases e celulases. Os resultados são apresentados na figura 2.

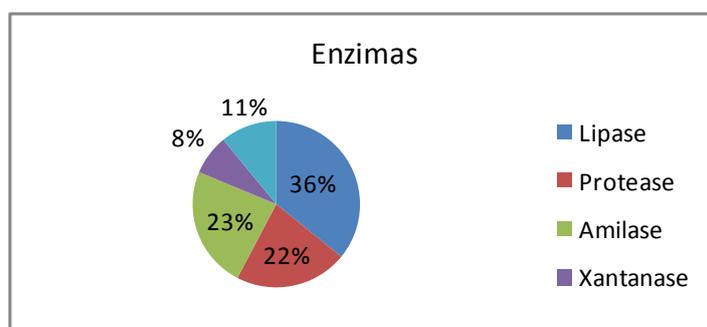


Figura 2: Teste de produção de enzimas com resultado positivo para: A: Amilase; B: Lipase; C: Xantanase; D: Protease; E: Celulase.

Fonte: O autor.

O gráfico a seguir, mostra a atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de *Ricinus communis L.* De um total de 100%, 10,76% apresentaram atividade para celulase, 35,38% para lipase, 21,53% para protease, 23,30% para amilase e 7% para xantanase.

Gráfico 1: Atividade enzimática com resultado positivo das cinco enzimas testadas nos 65 morfotipos dos fungos endofíticos isolados de *Ricinus communis L.*



Comparado-se os resultados obtidos entre os fungos endofíticos, o que apresentou maior atividade lipolítica foi a levedura denominada 17C.

A figura a seguir demonstra a comparação entre a atividade enzimática de lipase de três fungos endofíticos isolados, sendo figura C correspondente a levedura 17C.

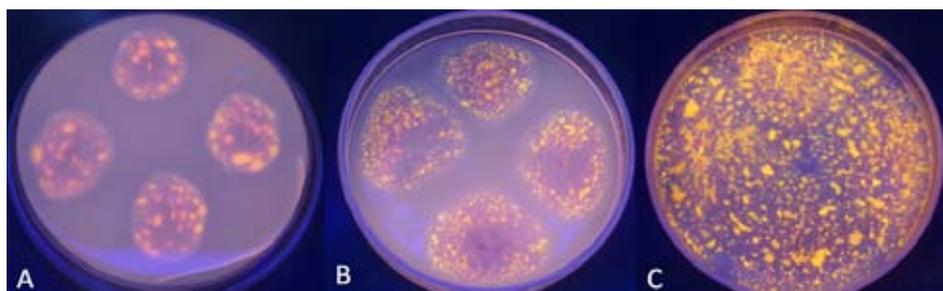


Figura 3: Atividade enzimática de lipase dos fungos endofíticos isolados de *Ricinus communis L.*

Fonte: O autor.

Devido a levedura 17C apresentar o maior perfil enzimático de lipase dentre todos os fungos endofíticos isolados, foi o fungo endofítico de *Ricinus communis L.* escolhido para realizar os testes de biorremediação no solo contaminado com óleo vegetal.

3.3 Viabilidade da celular e biorremediação do solo

A curva de crescimento da levedura endofítica 17C isolada de *Ricinus communis L.* demonstrou que a fase lag ocorre no tempo de 72 horas de crescimento, com $4 \cdot 10^5$ UFC/ μ l. Sendo assim, foram utilizadas as células da levedura na biorremediação em solo contaminado com óleo vegetal.

Na extração do óleo vegetal, utilizaram-se os valores dos resíduos que ficaram depositados no fundo do cadinho.

Com os resultados da quantidade de lipídeos, foram obtidas as porcentagens dos lipídeos que foram consumidos pela levedura 17C, para formação da tabela a seguir:

Tabela 1: Resultados dos tratamentos T1, T2 e T3, após 30 dias de incubação para consumo de lipídeos pela levedura 17C.

Biorremediação	Quantidade de óleo (ml)	Média dos lipídeos (g)	Lipídeos consumidos
Tratamentos			
T1	0,5	0,04	92% a*
T2	1,0	0,22	75% b
T3	2,0	0,64	63% c

*As médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Conforme demonstra a Tabela 1, os diferentes tratamentos diferenciam-se entre si estatisticamente, podendo afirmar que, o melhor tratamento foi o T1 com a maior atividade de consumo de óleo vegetal em solo, na proporção de 2:1, o qual apresentou 92% de consumo do óleo vegetal.

O tratamento T2 demonstrou um consumo de óleo de cozinha de 75%, na proporção de 1:1, e o T3 com 63% de consumo de óleo de cozinha, na proporção 1:2.

Como o óleo vegetal apresenta curta vida útil e o seu descarte nem sempre ocorre de maneira correta, torna-se um importante contaminante de solo e recursos hídricos, provocando passivos ambientais, dentre os quais se destacam a proliferação de vetores de doenças, a contaminação do solo e mananciais hídricos, o entupimentos de tubulações e conseqüente mal cheiro, desequilíbrios nos ecossistemas (PITTA *et al.*, 2009). Sendo fundamental para o meio ambiente, pesquisa em tratamentos de solo contaminado utilizando micro-organismos para eliminação ou redução de poluentes.

Na busca pela exploração biotecnológica de um micro-organismo, a produção de certos compostos de interesse não é suficiente. É necessário que o micro-organismo produza-os em grande quantidade, devido aos custos de produção industrial (CASTRO *et al.*, 2004). Portanto micro-organismos com alta atividade metabólica são interessantes para elaboração de formulações biológicas, com aplicação em biodegradação, visto que o metabolismo é usualmente empregado na eliminação ou redução de concentração de certos poluentes, bem como para diminuir a toxicidade dos mesmos (COLLA *et al.*, 2003; MANDRI *et al.*, 2007).

Contudo podemos afirmar que com o avanço na biotecnologia acredita-se que os estudos de biorremediação serão cada vez mais eficazes, principalmente, nas etapas de melhoramento, isolamento de genes, obtenção de cepas e assim poderemos desenvolver linhagens biorremediadoras. Porém somente a ciência não trará as soluções desejadas, já que a biorremediação é uma técnica nova para sociedade, necessita-se de um desenvolvimento em nível social para que seja conhecida e mais utilizada.

O nosso planeta, oferece uma vasta variedade de micro-organismos, basta apenas investir nos estudos e busca de novas espécies, fazendo-se necessário a realização de pesquisa para o uso da biotecnologia para biorremediação.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram isolados fungos endofíticos de *Ricinus communis* L. com potencial para utilização como agentes biorremediadores em solo contaminado com óleo vegetal.

Após o isolamento dos fungos endofíticos, o *screening* enzimático e testes de biorremediação *in vitro*, conclui-se que a levedura denominada 17C, tem um grande potencial como biorremediadora e assim com pesquisas futuras poderá ser utilizada em grande escala, já que apresentou alta atividade lipolítica, sendo que o maior consumo de óleo vegetal em solo contaminado foi o tratamento T1, quando comparado com os tratamentos T2 e T3.

REFERÊNCIAS

- ARNOLD, A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse. *Ecology Letters*, v.3, n. 4, p. 267-274, jul 2000.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, n.1, p.146-156, 2004.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, v.13, p.85-103, 2003.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N. and JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, p.143-152. 2002.
- FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. *Aerobic Degradation by Microorganisms*. In: JOHN WILEY & SONS, INC. Environmental Process II, Volume 11B, Biotechnology: A Multi-Volume Comprehensive Treatise. 2. ed. New York: VCH, p.146-155. 2000.
- HUMBERTO A. Projeto transforma resíduos em oportunidades de negócios. Portal fator Brasil. Espírito Santo. 2007. Disponível em: http://www.revistafatorbrasil.com.br/ver_noticia.php?not=11650. Acesso em: 06 de maio de 2014.

LARONE, D. H. Medically important fungi; a guide to identification. *American Society for Microbiology*. Washington, 230p. 1993.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, v.6, n.1, p.23-27, 2007.

MARTINS, C. T., CONTI, T, Z., LISBOA, V, G., Uma alternativa consciente de reaproveitamento do óleo de cozinha: A fabricação de sabão caseiro. XVI – Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, Vale da Paraíba, 2010.

MENONCIN, S., DOMINGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., OLIVEIRA, J.V; DI LUCCIO, M., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, p. 440-443, abr-jun. 2009.

MOREIRA, G.M. Diversidade de fungos endofíticos associados à mamona (*Ricinus communis L.*). Universidade de Lavras. In: IX Congresso de Ecologia do Brasil. Lavras. 2009.

OLIVEIRA, A. C. D. Otimização da produção de lipases por *Penicillium sp.* através de fermentação no estado sólido. XIV Seminário de Pesquisa e IX Seminário de Iniciação Científica. Universidade Tuiuti do Paraná, 2010.

OLIVEIRA, B.H.; NETO, P.O.; LIMA, V.M.G. Seleção de microrganismos isolados da Mata Atlântica produtores de lipase tolerante a solventes e extremos pH. Anais da V semana de Biotecnologia 1. Londrina: UEL, 2009.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. van DEN (Eds.) *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, p.175-187. 1986.

PIMENTEL, I. C. Fungos endofíticos do milho (*Zea mays L.*) e de soja (*Glycine max (L.) Merrill*) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas. 153f. Tese (Doutorado) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos Endofíticos em Folhas de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis A. St.-Hil.*). *FLORESTA*. Curitiba, v. 36, n. 1. 2006.

PITTA, O.S.R.J.; NOGUEIRA, M.S.N; SACOMANO, J.B.; LIMA, J.L.A. Reciclagem do Óleo de Cozinha Usado: uma Contribuição para Aumentar a Produtividade do Processo. Anais do 2 international workshop/ advances in cleaner production: key elements for a sustainable world: energy, water and climate change, São Paulo, UNIP. 2009.

SAVY FILHO, A.; PAULO, E.M.; MARTINS, A.L.M.; GERIN, M.A.N. Variedades de mamona do instituto agrônomo. Campinas: Instituto Agrônomo, 1999.

ZHOU, Q. e HUA. Bioremediation: A review of applications and problems to be resolved. *Progress in Natural Science*, v. 14, n. 11, p. 937-944, Nov. 2004.