



Avaliação da tolerância a cádmio de isolados fúngicos obtidos de solo agrícola e detecção de grupos funcionais

Tolerance evaluation of filamentous fungi isolated from agricultural soil and identification of functional groups present in the cell wall responsible for the cadmium removal

LUZ, Vilson Conrado^{1a}; SANTIAGO, Giovanna Melo^{1b}; FOCHESSATTO, Michele²;
CARGNELUTTI, Denise³

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, discente do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, ^{1a}vilson.luz@estudante.uffs.edu.br; ^{1b}giovanna.melo@estudante.uffs.edu.br;

²Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, discente do curso de Agronomia, michelefochesatto97@gmail.com; ³Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, docente do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária e do programa de pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, denise.cargnelutti@uffs.edu.br

Eixo temático: Manejo de Agroecossistemas de Base Ecológica

Resumo: A utilização extensiva de fertilizantes fosfatados acarreta o aumento considerável de concentrações de metais pesados em solos de cultivo agrícola, tais metais possuem características carcinogênicas e provocam diversos problemas a saúde humana. Microrganismos tolerantes podem ser utilizados de maneira a biorremediar estes ambientes, sendo utilizados em processos de adsorção para águas contaminadas ou auxiliar na interação do metal-planta em processos de fitorremediação. O objetivo do presente estudo foi avaliar os isolados fúngicos quanto a grau de tolerância ao cádmio (Cd) assim como detectar a existência de grupos funcionais. Neste estudo, fungos foram isolados de três diferentes espécies botânicas coletadas em área de cultivo agrícola. Os resultados mostraram a existência de grupos enxofre nos fungos analisados, tal como os valores satisfatórios de desenvolvimento da biomassa quando em solução com CdCl₂, possibilitando a utilização destes em futuros estudos sobre biorremediação.

Palavras-chave: Biorremediação; Contaminação; Fertilizantes Fosfatados; Metal Pesado.

Keywords: Bioremediation; Contamination; Heavy Metal; Phosphate Fertilizers.

Introdução

Minérios de rochas fosfatadas, matéria prima para produção de fertilizantes fosfatados, possuem diferentes concentrações de metais tóxicos e radionuclídeos (GUPTA et al., 2014). O processamento destes minérios, agrega ao produto final, concentrações de metais pesados, que são aumentadas no solo a toda nova aplicação (KHATER, 2008). Tais compostos tóxicos, como cádmio (Cd), arsênio (Ar), mercúrio (Hg), urânio (Ur) e rádio (Ra), são posteriormente absorvidos pelas plantas podendo ingressar na cadeia alimentar causando significativos problemas à saúde (MORTVEDT; BEATON, 1995). Visto que os teores de Cd em fertilizantes comerciais são considerados baixos, muitos pesquisadores têm permitido sua utilização sem limitações quanto a contaminação ambiental. Métodos convencionais de remediação, como precipitação química, osmose reversa, troca iônica, possuem elevados custos e resultados pouco efetivos (GUPTA et al., 2015). A utilização de biomassa de



microrganismos para remoção de metais pesados em solução apresenta alta eficácia e redução de custos no tratamento (FU; WANG, 2011).

Segundo Anahid et al. (2010), os microrganismos possuem mecanismos que garantem sua adaptação em presença de altas concentrações de metais pesados garantindo sua sobrevivência. Dois mecanismos de tolerância a metais pesados são relatados quando se trata de fungos: sequestro extracelular e sequestro intracelular. O sequestro extracelular é caracterizado pela excreção de diferentes moléculas orgânicas da parede celular pela célula fúngica para quelar íons metálicos (Anahid et al., 2010).

Neste estudo objetivou-se a determinação da tolerância de fungos filamentosos ao metal pesado cádmio, avaliando os mesmos quando expostos a diferentes níveis de estresse, e determinando a existência de grupos funcionais que possam auxiliar durante estes períodos.

Metodologia

Triagem e seleção de fungos tolerantes ao cádmio

Amostras de *Digitaria horizontalis*, *Solanum mauritianum*, *Vicia sativa*, foram coletadas com seus respectivos solos rizosféricos, em área de cultivo agrícola (Erechim - RS, Brasil), embaladas e transferidas para o laboratório. A partir do solo rizosférico foram isolados fungos utilizando a técnica de diluição seriada, em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (IONLAB Ltd, Índia), suplementado por 30 μM de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Alemanha). As placas foram incubadas à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias. A seleção dos fungos ocorreu pela frequência, quando comparados ao controle. Os isolados foram mantidos em glicerol 10% à -20°C por 15 min e posteriormente estocados à -80°C

Tolerância dos isolados ao cádmio

A tolerância dos isolados frente ao cádmio foi determinada em termos da biomassa micelial. Discos de 5 mm de diâmetro foram inoculados em 20 ml de meio esterilizado Batata Dextrose (peptona de batata 4 g L^{-1} , dextrose 20 g L^{-1} , pH $5,6 \pm 2$), modificado com diferentes concentrações de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM , 700 μM e 1000 μM) e incubado em agitador orbital, 150 rpm à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h. O micélio foi colhido por filtração através de papel filtro com diâmetro do poro de 1-2 μm (Unifil, Alemanha) disposto em estufa por 18 h à 65°C para determinação da massa seca. Quatro repetições do experimento foram realizadas.

Análise FTIR

As amostras secas foram imersas em álcool etílico 95% e dispostas em estufa a 70°C por 1h, de maneira a eliminar quaisquer resquícios de água que possam ter adsorvido na parede celular. A amostra foi macerada com KBr e CHCl_3 e disposta a alta pressão

para formação de pastilha e então submetida a espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (Shimadzu IRTracer -100).

Resultados e Discussão

Quatro diferentes fungos foram isolados, sendo identificadas como F01, A01, C01 e R01. Os microrganismos isolados foram testados, separadamente, quanto a sua capacidade para tolerar concentrações aumentadas de Cd. O comportamento dos isolados quanto a tolerância ao Cd pode ser observada na Figura 1. Inicialmente, todos os isolados apresentaram alto desenvolvimento da biomassa, na ausência do metal, de modo que a diferença de massa entre os isolados F01, A01 e C01 não foi significativamente grande, pois todas atingiram valores maiores que 170 mg. Contrariamente, o isolado R01 apresentou o menor desenvolvimento inicial da biomassa ($74,33 \pm 8,28$ mg), porém o aumento da concentração de CdCl_2 ocasionou uma menor diferença de massa entre a menor concentração e a maior, esta diferença para o isolado R01 foi de $34,9 \pm 8,33$ mg e para os demais foi maior que 100 mg.

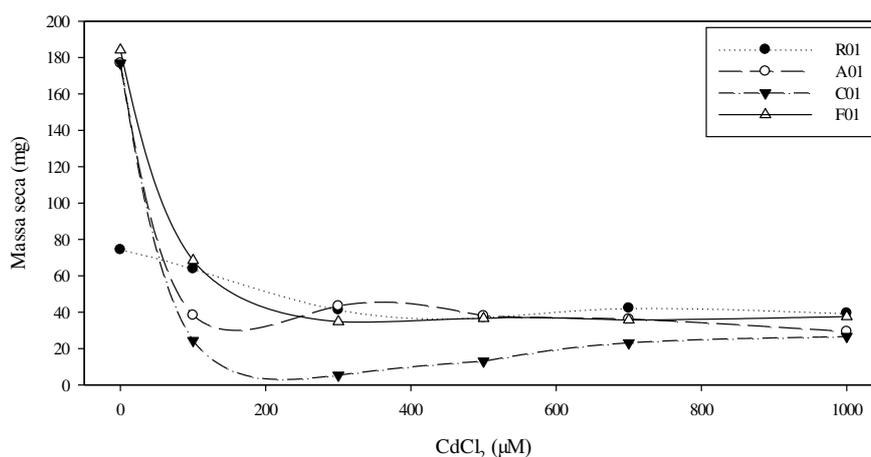


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de CdCl_2 na massa seca do micélio de colônias de 72 h de idade.

A biomassa decresceu drasticamente para C01 na concentração de $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 , sendo este caracterizado como não tolerante ao metal e, portanto, a concentração capaz de inibir seu desenvolvimento é próxima ou inferior a $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 . Um comportamento observado em quase todos os isolados fúngicos avaliados foi a retomada do crescimento após um período de tempo de incubação a determinada concentração. Este fenômeno pode estar diretamente relacionado as capacidades de adaptação dos microrganismos. Tal comportamento fica melhor evidenciado na Figura 1, nos tratamentos entre $200 - 300 \mu\text{M}$ de CdCl_2 . De acordo com Gadd (1993), tais adaptações podem desencadear alterações quanto as capacidades absorptivas das espécies fúngicas. As diferentes estratégias de tolerância adotadas por cada espécie em um ambiente estressante podem justificar o melhor desenvolvimento de alguns



isolados, visto que a biossorção está relacionada a espécies iônicas associadas a superfícies celular (ZAFAR et al., 2007).

O isolado R01, apesar de ter apresentado um desenvolvimento lento da biomassa, mesmo na ausência do metal, foi considerado como o mais tolerante dentre os quatro isolados analisados, pois manteve uma maior regularidade da massa seca em todas as concentrações de CdCl_2 . Diversos autores reportaram interessantes gêneros capazes de tolerar altas concentrações de diversos metais pesados, Zafar et al., (2007) reportaram a concentração mínima inibitória de Cd para diversas espécies, variando de $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ para *Molina* sp até 3 mg ml^{-1} para *Trichoderma* sp e 5 mg ml^{-1} para *Penicillium* sp e *Rhizopus* sp. A análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) determinou a presença de alguns dos grupos mencionados anteriormente, na parede celular dos isolados analisados. Todos os microrganismos foram submetidos ao FTIR, sendo melhor observado a diminuição dos picos espectrais nos dados relativos ao isolado F01 (Figura 2). Para este, observou-se o primeiro pico entre 3500 e 3000 cm^{-1} , sendo uma região onde ocorre a sobreposição do alongamento das bandas de N-H e O-H, porém desta região nenhum resultado significativo pôde ser retirado com confiabilidade, devido a possíveis interferências de umidade presentes na amostra ou no sal KBr utilizado. A região de $1031,92 \text{ cm}^{-1}$ na Figura 2 pode ser atribuída a existência de grupos sulfóxidos (S=O), capazes de coordenar íons Cd^{2+} . Tal região na Figura 3 apresenta diminuição do pico espectral, chegando a 87% de transmitância, logo qualifica a possibilidade de ter ocorrido a redução do estiramento molecular, pela complexação do íon. Ainda de maneira complementar, as bandas na região de $2926,01$ à $2854,65 \text{ cm}^{-1}$ podem representar uma ligação C-H atribuídas principalmente a membrana de fosfolipídios e que pela redução significativa de picos, comparando a Figura 2 com a Figura 3, podem representar proximidade ao grupo sulfóxido, logo seu estiramento também é reduzido devido ao efeito indutivo. A banda em $1745,58 \text{ cm}^{-1}$ indicou a presença de ligações C=O, sugerindo a presença de grupos amida de ésteres. Resultados similares de picos espectrais foram encontrados por Gururajan e Belur (2018) em fungos tolerantes ao chumbo, indicando a presença de grupos amida, fosfatos, carboxilas e carbonilas.

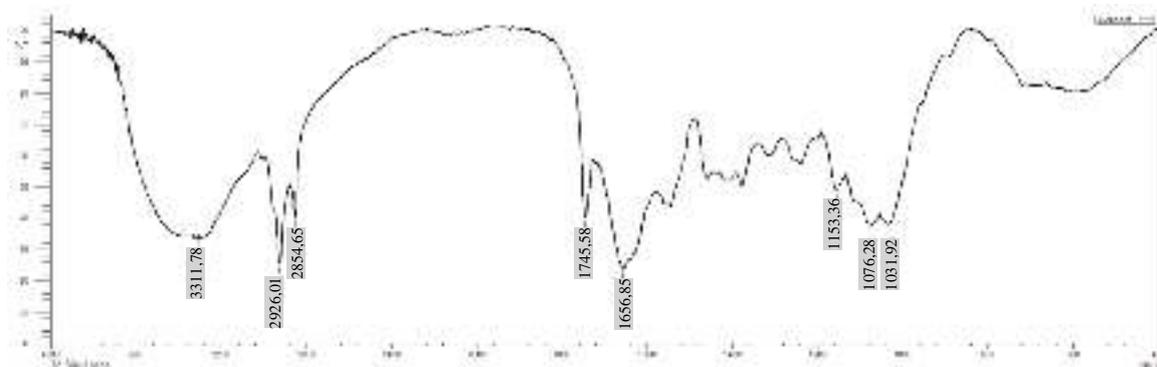


Figura. 2. FTIR isolado F01, concentração de $0 \mu\text{M}$ de CdCl_2

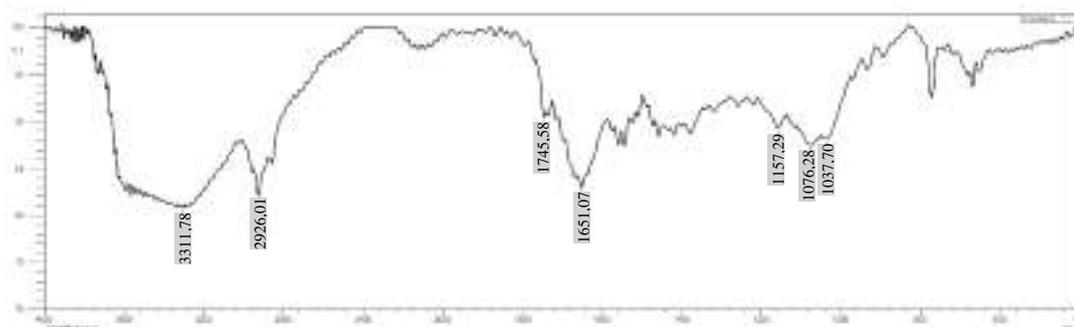


Figura 3. FTIR isolado F01, concentração de 500 μM de CdCl_2

Diversos grupos funcionais auxiliam em complexos mecanismos como a troca iônica, quelação e adsorção, seguidos por deposição dos metais nos capilares intra e interfibrilares e espaços da rede estrutural de polissacarídeos em fungos como resultado do gradiente de concentração e difusão pela parede e membrana celular (GUPTA, 2015). Além da tolerância, os grupos funcionais são importantes para os processos de biorremediação, no qual as espécies detentoras desta capacidade quelam os metais pesados junto aos grupos funcionais, retirando tais metais do meio ambiente.

Conclusões

Os resultados obtidos são suficientes para desenvolver novos estudos relacionados a biorremediação do Cd em solos ou em águas. O fungo R01 apresentou os melhores resultados de tolerância a CdCl_2 , e assim como o isolado F01, qual apresentou indicativos significantes para utilização em sistemas de adsorção de metais, pode ser estudado para utilização em processos de biorremediação de Cd. A fim de conhecer mais sobre os microrganismos a identificação morfológica e molecular serão determinadas futuramente.

Referências bibliográficas

- FU, F.; WANG, Qi. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.407-418, mar. 2011. Elsevier BV.
- GADD, G.M., 1993. Interaction of fungi with toxic metals. **New Phytol.** 124, p. 25–60.
- GUPTA, N.K. et al. Biosorption-an alternative method for nuclear waste management: A critical review. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.2159-2175, abr. 2018. Elsevier BV.
- KHATER, A.E.M. Uranium and heavy metals in Phosphate Fertilizers. **Uranium, Mining And Hydrogeology**, [s.l.], p.193-198, 2008. Springer Berlin Heidelberg.



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