

Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo contaminado por metais pesados

Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior¹ e Sônia Valéria Pereira²

Introdução

O aumento populacional e o desenvolvimento industrial acelerado têm contribuído para o despejo desenfreado de resíduos sólidos e líquidos, os quais aumentam em grande escala o número de áreas contaminadas, acentuando assim, os problemas ambientais [1]. A remoção de poluentes do ambiente pode ser realizada por vias biológicas e a este processo dá-se o nome de biorremediação [2].

O isolamento de microrganismos de áreas contaminadas (indígenas) pode facilitar a seleção de agentes despoluidores eficientes para os estudos de biorremediação. Ensaios prévios em escala de laboratório devem ser realizados visando avaliar o potencial biorremediador, verificando o grau de degradação dos contaminantes, a tolerância dos microrganismos ao estresse [3], bem como o efeito de variáveis abióticas que afetam o crescimento desses organismos [4].

Atrelado a esses ensaios, é também relevante o estudo ecológico das estratégias de colonização da comunidade microbiana nas áreas perturbadas. Atlas & Bartha [5] enfatizam que populações de estratégia pioneira (*r*) prevalecem em condições instáveis, uma vez que alocam grande parte dos recursos para reprodução, enquanto que populações de estratégia sucessora (*k*), de crescimento lento, possuem maior especificidade pelo substrato e são mais sensíveis a perturbações.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram: (a) isolar fungos de um solo contaminado com metais pesados proveniente de uma indústria metalúrgica; (b) definir as estratégias de colonização da comunidade fúngica; (c) avaliar a tolerância destes isolados a diferentes concentrações de nitrato de chumbo e; (d) verificar o crescimento dos fungos em diferentes substratos, temperaturas e pH.

Material e Métodos

O estudo foi realizado com amostras de solo coletadas em uma área de deposição de rejeito industrial contaminado por metais pesados no semi-árido pernambucano. O isolamento dos fungos foi realizado pelo método de diluições sucessivas [6] e a identificação foi realizada através de observações microscópicas segundo Domsch *et al* [7]. As estratégias de colonização da comunidade fúngica foram definidas pela contagem diária do número de colônias durante seis dias de incubação, a temperatura ambiente. As colônias crescidas

até o 3º dia foram agrupadas em *r*-estrategistas, enquanto as colônias crescidas do 4º ao 6º dia foram agrupadas em *k*-estrategistas de acordo com De Leij *et al.* [8] modificado.

A avaliação da tolerância ao nitrato de chumbo foi realizada através do crescimento das colônias em meio contendo diferentes concentrações de nitrato de chumbo (0, 150, 300 e 450ppm) após seis dias de incubação. De forma semelhante foi avaliado o crescimento dos fungos em diferentes substratos (pectina, caseína, amido e glicose), temperaturas de crescimento (28, 35 e 42°C) e pH do meio de cultura (6, 7, 8 e 9), onde fragmentos de culturas monospóricas foram transferidos para placas de Petri e após três dias foram medidos os diâmetros das colônias com auxílio de uma régua de precisão milimétrica.

Os dados foram submetidos à análise de variância via teste de aleatorização com o auxílio do software MULTIV versão 2.3.21 [9].

Resultados e discussão

Do total de fungos isolados, foram selecionadas 18 colônias pertencentes aos quatro gêneros mais representativos (seis isolados de *Chaetomium*, três isolados de *Thielavia*, oito isolados de *Penicillium* e um isolado de *Aspergillus*), sendo estes considerados mais tolerantes a altas concentrações de solo contaminado por metais pesados.

A estratégia pioneira (*r*) foi encontrada em 85,3% das colônias crescidas, padrão este esperado, uma vez que as amostras de solo eram provenientes de uma área contaminada por resíduos sólidos industriais e devido às altas taxas de reprodução e à alta capacidade de produzir esporos de resistência, as espécies pioneiras prevalecem em ambientes estressantes [5].

Quanto à tolerância ao nitrato de chumbo, um gradiente decrescente de tolerância foi encontrado: *Chaetomium* > *Aspergillus* > *Thielavia* > *Penicillium*, sendo observado que os isolados do gênero *Chaetomium* obtiveram crescimento significativo em relação aos demais fungos no tratamento 450ppm de nitrato de chumbo, enquanto que *Aspergillus* apresentou maior crescimento no tratamento sem contaminação. Nos tratamentos 150 e 300ppm, o crescimento das colônias de *Chaetomium* e *Aspergillus* diferiu significativamente do crescimento de *Thielavia* e *Penicillium* (Tabela 1).

A razão pela qual esses fungos possuem maior tolerância ao nitrato de chumbo ainda é incerta.

1. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Centro de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970. E-mail: flaviorodr@uol.com.br

2. Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Pernambuco- ITEP Av. Professor Luiz Freire, 700, Cidade Universitária, Recife-PE, 50740-540. (81) 3272-4275

Apoio financeiro: FACEPE e CNPq

Entretanto, Chew *et al.* [10] afirmam que alguns microrganismos possuem adaptações fisiológicas podendo assim tolerar e até mesmo interferir na disponibilidade dos metais no solo.

Em função da maior tolerância dos isolados do gênero *Chaetomium*, no tratamento 450ppm, foram selecionados quatro dos seis isolados para os demais estudos, denominados CHAETO01, CHAETO02, CHAETO03 E CHAETO04.

O crescimento médio das colônias dos fungos variou entre as temperaturas estudadas, sendo que houve diferenças significativas nas taxas de crescimento das colônias a 35°C ($p=0,001$). Quando se compara o crescimento dos diferentes fungos, verifica-se que CHAETO03 possui maiores diâmetros de colônia ($p=0,001$) em relação aos demais isolados (Tabela 2). A partir destes dados pode-se considerar, de acordo com Millner [11], que os isolados são *termotolerantes*, padrão comum para espécies do gênero *Chaetomium* [12].

De uma maneira geral, os fungos em estudo apresentaram aumento significativo no crescimento em meio com pH 9,0 ($p=0,007$), em relação aos demais pH, em discordância com Deacon [13] que afirma que os fungos possuem faixa de pH ótimo entre 5 e 7. De forma semelhante ao crescimento em diferentes temperaturas, o isolado CHAETO03 obteve taxas de crescimento significativamente superiores aos demais isolados nos pH estudados ($p=0,001$).

Não houve diferenças significativas entre os isolados na assimilação dos substratos, ainda que os isolados CHAETO02 e CHAETO03 não tenham apresentado crescimento no substrato caseína. Quando consideradas as diferenças entre substratos, foram verificadas maiores taxas de crescimento dos isolados em pectina ($p=0,001$), sendo esta habilidade em degradar polímeros de material vegetal já reconhecida para fungos deste gênero por Batista & Pontual [14].

Desta forma, considerando as condições de estudo, sugere-se que (a) fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Thielavia*, *Penicillium* e *Chaetomium* podem ser considerados tolerantes a presença de metais pesados, sendo este último mais resistente a altas concentrações de nitrato de chumbo; (b) a maioria das populações isoladas na área apresenta estratégia pioneira; (c) o substrato pectina mostra ser uma fonte acessível de nutrientes para fungos do gênero *Chaetomium*; e (d) os isolados do

gênero *Chaetomium* estudados demonstram ser termotolerantes e basófilos.

Agradecimentos

A FACEPE e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica; ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio na identificação dos fungos e ao ITEP pela infra-estrutura operacional.

Referências

- [1] GILMORE, E.A. 2001. Critique of Soil Contamination and Remediation: The dimensions of the problem and the implications for Sustainable Development. *Bulletin of Science, Technology & Society*, 21 (5): 394-400.
- [2] PLETSCHE, M.; ARAUJO, B.S.; CHARLWOOD, B.V. 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology Advances*, 17: 679-687.
- [3] SILVA-JÚNIOR, F.M.R. 2006. *Efeito dos metais pesados na microbiota do solo o semi-árido: um estudo investigativo com fungos do gênero Chaetomium Kunze*. Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Ciências Biológicas, UFPE, Recife.
- [4] BALDA, M.T.; AL-AWANDHI, N.; AL-DAHER, L. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32:155-169.
- [5] ATLAS, R. M.; BARTHA, R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid, Pearson Educación. 677p.
- [6] WARCUP, J.H. 1950. The soil plate method for isolations of fungi from soil. *Nature*, 166: 117 - 118.
- [7] DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*, Vol. II. London: Academic Press. 859 p.
- [8] DE LEIJ, F.A.A.M.; WHIPS, J.M.; LYNCH, J.M. 1993. The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbial Ecology*, 27: 81-97.
- [9] PILLAR V. D. 2006 [Online] *MULTIV Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling User's Guide v. 2.3.10*. Homepage: <http://www.ecoqua.ecologia.ufrgs.br>
- [10] CHEW, I.; OBBARD, J.P.; STANFORTH, R.R. 2001. Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution*. 111: 367-375.
- [11] MILLNER, P. D. 1977 Radial growth responses to temperature by 58 *Chaetomium* species, and some taxonomic relationships. *Mycologia*, 69: 492-502.
- [12] MOREJÓN, K.C.R. 2003. *Estudio taxonómico (morfológico y molecular) de especies del género Chaetomium y géneros afines*. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Reus.
- [13] DEACON, J.W. 1997. *Modern Mycology*. 3th ed. Oxford: Blackwell Science, 303 p.
- [14] BATISTA, A.C.; PONTUAL, D. 1948. Alguns fungos do gênero *Chaetomium*. *Boletim da Secretaria de Agricultura e Comércio*. 15 (1): 62-73.

Tabela 1. Diâmetro médio das colônias de fungos filamentosos isolados de solo contaminado com metais pesados em diferentes concentrações de nitrato de chumbo, após seis dias de incubação a temperatura ambiente (25-28°C)⁽¹⁾.

Tratamento	<i>Thielavia spp</i>	<i>Chaetomium spp</i>	<i>Penicillium spp</i>	<i>Aspergillus spp</i>
0 ppm	34,6a,cA	31,6a,bA	29,2bA	37,7cA
150 ppm	29,7aB	40,9bB	28,3aA	37,7bA
300 ppm	37,3aA	42,8bB	28,4 cA	41 a,bA
450 ppm	29,6aB	36,2bC	25,5cB	29,3 a,cB

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Monte Carlo a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Crescimento médio, em milímetros, das colônias de fungos do gênero *Chaetomium*, em meio de cultura, em diferentes temperaturas, pH e substratos, após três dias de incubação.

Isolados	Temperatura			pH				Substrato			
	28° C	35° C	42° C	6	7	8	9	Caseína	Amido	Pectina	Glicose
CHAETO01	13,5	15	0,3	24	24,8	25,2	25,2	9,7	8	17,3	9
CHAETO02	14	16,5	0,7	25	24,8	25	25,3	0	7,7	19	8
CHAETO03	15,8	18,1	1,7	25,7	26,7	27,3	27,8	0	6,3	15,3	6,7
CHAETO04	12,7	15,5	0,3	24,2	24,67	24,8	26	9,7	7,7	18	8,3