

SELEÇÃO DE ESTIRPES FÚNGICAS PARA REMOÇÃO DE MERCÚRIO

Judith Liliana Solórzano Lemos¹

Mariana Ferreira de Almeida²

Flávio de A. Lemos³

Resumo

Sabe-se que os metais pesados, em especial o mercúrio, constituem um problema para o meio ambiente por causa da sua longa permanência e mobilidade. Além disso, o mercúrio é um elemento tóxico que provoca muitos problemas de saúde nos seres humanos podendo ser fatal. A sua disseminação nos corpos d'água acaba afetando a flora e a fauna, e apesar de haver uma contaminação natural de mercúrio causado pelas emanções gasosas, a contribuição antropogênica se dá principalmente a partir das indústrias de soda-cloro, minero-metalúrgica, eletrônica e de geração de energia a partir de combustíveis fósseis. O presente trabalho se propôs avaliar o potencial de 10 estirpes de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, visando investigar qual apresentava maior resistência ao mercúrio e, portanto, ser um potencial agente biorremediador deste metal. Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri em meio Batata Dextrose Agar (BDA), enriquecido com íons mercúricos. As duas estirpes que apresentaram crescimento nas referidas placas foram *Aspergillus flavus* IOC 05 e *Aspergillus flavus* IOC 4133 tendo diâmetros de crescimento de 1 e 3 cm, respectivamente. Na seguinte etapa do estudo foram realizados testes em meio de cultura líquido que continha 7,39 mg de Hg²⁺/L, empregando *A. flavus* IOC 4133. O resultado obtido indicou uma remoção de mercúrio de 17,05%.

Palavras chave: Mercúrio. Fungos Filamentosos. Biossorção.

SELECTION OF FUNGAL STRAINS FOR MERCURY REMOVAL

¹Doutora em Ciências (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) da UFRJ

²Bacharel em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Estadual da Zona Oeste/UEZO

³Doutor em Metalurgia pela COPPE

Abstract

It is known that heavy metals, especially mercury, are a problem for the environment because of their long permanence and mobility. Besides, mercury is a toxic element that causes many health problems in humans and can even lead to death. Its dissemination in water bodies ends up affecting flora and fauna. Although there is a natural contamination of mercury caused by gaseous fumes, the anthropogenic contribution occurs mainly from the soda-chlorine, mining-metallurgical, electronic industries, and energy generation from fossil fuels. The present work aimed to evaluate the potential of 10 strains of filamentous fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, aiming to investigate which presented more excellent resistance to mercury and, therefore, be a potential bioremediation agent of this metal. The microorganisms were grown in Petri dishes in Potato Dextrose Agar (BDA), enriched with mercury ions. The two strains that showed growth on the said plates were *Aspergillus flavus* IOC 05 and *Aspergillus flavus* IOC 4133, which presented growth diameters of 1 and 3 cm. In the next stage of the study, tests were performed in a liquid culture medium containing 7.39 mg of Hg^{2+}/L , using *A. flavus* IOC 4133. The result obtained indicated a 17.05% mercury removal.

Keywords: Mercury. Filamentous Fungi. Biosorption.

Introdução

O mercúrio, juntamente com outros 12 metais, é classificado como um dos poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). No meio ambiente, sua atuação é complexa devido a biotransformação do Hg^{2+} no cátion metilmercúrio (CH_3Hg^+), que poderá sofrer bioacumulação num nível trófico, e biomagnificação entre diferentes níveis da cadeia alimentar (URGUN-DEMIRTAS *et al.*, 2012).

Os compostos inorgânicos de mercúrio podem estar na forma de cloreto, sulfeto ou óxido ($HgCl_2$, HgO , HgS), enquanto as formas orgânicas incluem o metilmercúrio (MeHg), dimetilmercúrio ($(CH_3)_2Hg$), etilmercúrio (C_2H_5Hg) e fenilmercúrio (C_6H_5Hg) (RAJ, MAITI, 2019).

A poluição de corpos hídricos causada por atividades antropogênicas tem desestabilizado os ecossistemas afetando a fauna e a flora, além de interferir direta ou indiretamente na saúde humana. Estima-se que as atividades humanas foram responsáveis pela emissão de cerca de 8.000 t/ano de mercúrio, desde o ano de

1880, das quais 30,5% foram lançadas diretamente para atmosfera e 69,5% para o solo e corpos d'água (STREETS, *et al.*, 2017). As principais fontes antropogênicas que lançam mercúrio no meio ambiente são as indústrias de soda-cloro, minero-metalúrgica, eletrônica e de geração de energia a partir de combustíveis fósseis (SINHA, *et al.*, 2012). Somente em 2015 a indústria de soda/cloro foi responsável pela emissão de 15,1 toneladas de mercúrio no meio ambiente, segundo a Agência Ambiental Americana (EPA).

Segundo Kurniati *et al.* (2014) a presença de mercúrio no ambiente é uma preocupação global devido à alta toxicidade, mobilidade e longa permanência no ambiente. Quando inalado, o vapor desse metal é absorvido rapidamente na corrente sanguínea, danificando o sistema nervoso central, tireoide, rins, pulmões, sistema imunológico, olhos, gengivas e pele, além de promover anomalias cromossômicas (MARICHELVAM, AZHAGURAJAN, 2018). O mercúrio também pode sofrer mobilização em rios, lagos ou no solo úmido, e se transformar em metilmercúrio, um elemento altamente tóxico que causa danos ao sistema nervoso, e possui alta persistência e se acumula em animais, peixes e no meio ambiente (McKELVEY, OKEN, 2012; MMA, 2010).

Os processos tradicionais de tratamento de efluentes tais como a precipitação química, oxidação/redução, troca iônica, membranas filtrantes e evaporação, além de dispendiosos, nem sempre são eficientes para remoção de mercúrio em soluções diluídas. A rota de tratamento que vem ganhando cada vez mais destaque é a que faz uso de biomassa vegetal ou microbiana, na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados, denominada biossorção. Esta técnica se destaca pela simplicidade, baixo custo e maior eficiência quando comparada com outras formas de tratamentos físico-químicos (KAPOOR, VIRARAGHAVAN, 1995; VOLESKY, 2001; PINTO *et al.*, 2003; JAVED, *et al.*, 2007).

A biossorção é utilizada como um processo alternativo ou suplementar para detoxificar grandes volumes de efluente, com baixo teor de contaminante de forma seletiva com possibilidade de recuperação das espécies metálicas (PINO, TOREM, 2011). Portanto, a biossorção pode ser considerada como uma das tecnologias mais promissoras quanto ao sequestro de metais tóxicos, mesmo em condições bem

diluídas (DHANKHAR; HOODA, 2011). Em vista disso, a biorremediação é uma tecnologia atraente para tratamento de efluentes e solos poluídos, já que possibilita a degradação de contaminantes graças à atividade biológica de bactérias, fungos ou plantas. Os processos biológicos para remoção do mercúrio apresentam custos reduzidos, baixa complexidade operacional e são ecologicamente corretos (ROJAS, *et al.*, 2011; TAREKEGN *et al.*, 2020).

Segundo Saad *et al.*, (2019) e Ahluwalia e Goyyal, (2007) a biossorção utilizando biomassas fúngicas como biossorvente é um processo potencialmente competitivo para remoção de metais pesados, quando comparado aos métodos convencionais. Os fungos filamentosos e leveduras têm se mostrado excelentes biossorventes devido à elevada produção de material celular (biomassa). Além disso, existe a possibilidade de manipulação genética, bem como a oportunidade de aumentar seu poder de biossorção. O intensivo emprego de fungos em bioprocessos industriais pode ser justificado pelas quantidades expressivas de biomassas que são geradas como subprodutos das indústrias de fermentação (antibióticos, ácidos orgânicos, produção de enzimas e biopolímeros). Desta forma, resíduos de outros processos podem ser empregados como sorventes biológicos no tratamento de efluentes com a perspectiva de contribuir para a sustentabilidade do planeta (KAPOOR, VIRARAGHAVAN, 1995).

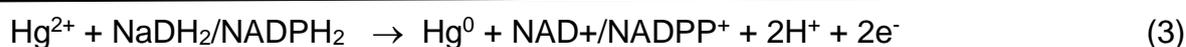
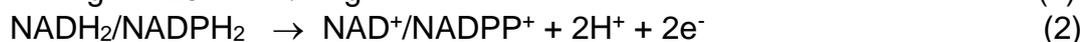
O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fúngico de remoção de Hg^{2+} dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, visando investigar qual das estirpes apresentava maior resistência ao mercúrio e, portanto, ser empregada como agente biorremediador deste metal.

Biorremediação de mercúrio

Alguns microrganismos conseguem sobreviver em meios contendo elevadas concentrações de sais de mercúrios. Um dos mecanismos que explica este fato é a redução dos íons mercúricos (Hg^{2+}) a mercúrio elementar (Hg^0), promovida pela flavoenzima citoplasmática redutase mercúrica. Um segundo mecanismo é a

formação de HgS pela reação direta do Hg²⁺ com o H₂S, gerado em condições anaeróbicas pelo microrganismo (ESSA *et al.*, 2002).

A redutase mercúrica é a enzima que catalisa a redução do íon Hg²⁺ para mercúrio elementar, conforme as equações (1 a 3). A enzima que tem sido potencialmente usada como agente de biorremediação de mercúrio é produzida por bactérias resistentes ao mercúrio: *E. coli*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Bacillus sp.*, e *Staphylococcus sp.* (PURKAN, *et al.*, 2017).



Para o tratamento de um efluente oriundo de uma planta de soda/cloro, um processo biotecnológico para remoção de mercúrio foi desenvolvido pela Universidade Técnica de Lodz (Polônia). Os microrganismos imobilizados alimentados no biorreator foram bactérias naturais do solo (*Pseudomonas putida* Spi3), não patogênicas, que possuíam elevada resistência ao mercúrio. A vazão média de alimentação do biorreator foi de 1,3 m³/h com efluente industrial, e uma concentração que variou de 1,5 a 10 mg de Hg²⁺, com os quais foi obtida uma eficiência de remoção de 92 a 97% (GŁUSZCZ, *et al.*, 2011).

O desempenho de 14 bioSORVENTES fúngicos foi examinado pelo grupo de Martínez-Juárez *et al.*, (2012), em função do tempo de incubação, do pH, da concentração inicial de íons metálicos e da biomassa fúngica. Os valores máximos de bioSORÇÃO mostraram que alguns bioSORVENTES utilizados foram eficientes na remoção de Hg²⁺, de sistemas aquáticos. Quanto à remoção de Hg²⁺ observou-se que *Mucor rouxii* IM-80, *Mucor rouxii* mutante, *Mucor sp.* 1 e *Mucor sp.* 2 poder ser consideradas biomateriais muito promissores para sorção do íon mercúrico com porcentagens de remoção equivalentes a 95.3%, 88.7%, 80.4%, e 78.3%, respectivamente, nas condições estudadas (100 mg de Hg²⁺/L , 100 rpm, 30 °C, pH

5,5 e 1,0 g de biomassa fúngica inativa). No entanto, as quatro estirpes de *A. flavus* também avaliadas demonstraram um potencial mais baixo como bioissorventes, atingindo de 22,5 % a 42,5 % de remoção de Hg^{2+} , nas mesmas condições estudadas para os mucorales.

Por outro lado, a pesquisa de Kurinati *et al.*, (2014) teve como objetivo verificar a capacidade de alguns fungos filamentosos, isolados de um solo de floresta, como potenciais biorremediadores na contaminação por mercúrio. Seis linhagens fúngicas foram selecionadas com base na sua capacidade de crescer em placas de Petri, com BDA, contaminadas com 10 mg de Hg^{2+}/L . A estirpe KRP1 mostrou um maior crescimento, do que as outras 5, em placas de Petri, alcançando um diâmetro de crescimento de 0,83 cm. Essa estirpe fúngica, denominada KRP1, foi identificada como *A. flavus*.

Na pesquisa de Mahmoud *et al.*, (2017) foi empregado um fungo marinho, isolado e identificado como *A. flavus*, que foi utilizado na forma inativada e empregado como bioissorvente para remoção de metais pesados. O fungo em questão se mostrou um organismo promissor como agente biorremediador de Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} , em diferentes amostras de água, nas quais efetuaram remoções dos metais nos intervalos de 92,7-99,0%; 91,33-95,68% e 95,6–98,2%, respectivamente. Cabe salientar, que a maior capacidade de remoção de cada metal foi de $1550 \mu mol g^{-1}$ (pH 7,0), $950 \mu mol g^{-1}$ (pH 7,0) e $1000 \mu mol g^{-1}$ (pH 6,0), respectivamente.

O isolamento de fungos nativos foi realizado por Hindersah *et al.*, (2018), a partir de um solo agrícola, contaminado com mercúrio, do qual extraíram quatro isolados microbianos que exibiram resistência a uma concentração de $25 mg kg^{-1}$ de Hg^{2+} . Dos quatro isolados os melhores foram identificados como *A. niger* e *A. flavus*. Os microrganismos foram inoculados em placas de Petri, atingindo diâmetros de crescimento de 8,0 cm e de 4,5 cm, respectivamente, ao final de 8 dias. Os pesquisadores ainda relataram que nesse estudo, ocorreram mudanças visíveis nas aparências dos micélios ou na esporulação dos fungos devido aos altos níveis de mercúrio.

Jafari e Cheraghi (2014) empregaram a bactéria Gram-negativa *Vibrio parahaemolyticus* PG02, para remoção de mercúrio de um efluente sintético. A

isoterma de Langmuir descreveu melhor os dados de equilíbrio da bioadsorção de Hg^{2+} , estimando uma capacidade máxima de bioadsorção de 193 mg Hg^{2+} /g, quando o valor do pH foi de 6,0 e a temperatura foi mantida em 35°C.

No estudo de Esmaeili *et al.*, (2015) foi utilizado efluente sintético com a concentração de Hg^{2+} , de 0,2 mg/L para *Sargassum glaucescens* (algas marrons) e de 1,0 mg/L para *Glacilaria corticata* (algas vermelhas). Os resultados mostraram que em condições otimizadas de processo, a remoção do íon mercúrico, foi de 94,5% para a *S. glaucescens* e 90,0% para *G. corticata*.

Após a realização de um “screening” a partir de trinta e uma cepas bacterianas resistentes ao mercúrio, isoladas de locais de descarga de efluentes da área industrial, Saranya *et al.*, (2017) selecionaram a bactéria *Vibrio fluvialis* que apresentou a maior capacidade de remoção de mercúrio. Após 42 horas de incubação foram obtidas as porcentagens de remoção de mercúrio de 60, 40, 25 e 19% quando empregadas concentrações de 100; 150; 200 e 250 mg/L de $HgCl_2$, respectivamente.

Amabilis-Sosa *et al.*, (2015) construíram barreiras biológicas, em áreas úmidas artificiais, feitas com junco (*Phragmites australis*) e um consórcio de bactérias tolerantes a metais pesados, para o tratamento de efluente sintético que continha 0,11 mg/L de mercúrio. Após 304 dias de operação, os sistemas constituídos com junco e bactérias removeram 73% do mercúrio total, enquanto os sistemas elaborados exclusivamente com vegetação, removeram apenas 66% do metal.

A biorremediação de mercúrio também foi estudada por Dash e Das (2014), empregando as bactérias Gram-positivas *Bacillus thuringiensis* PW-05 e *Bacillus* sp. SD-43, isoladas de meio marinho e de resíduos da indústria siderúrgica, respectivamente. Partindo de uma concentração inicial de 50 mg/L de $HgCl_2$, a remoção de Hg^{2+} , utilizando *Bacillus thuringiensis* PW-05 foi de 94,72%, e de 60,06% para o *Bacillus* sp. SD-43.

Chasanah *et al.*, (2018) isolaram bactérias resistentes ao mercúrio contidas em rejeitos de pequenas minerações de ouro na Indonésia. O isolamento e a identificação bacteriana foram realizados a partir de caldo nutritivo suplementado

com 5 mg de HgCl_2 . Os microrganismos selecionados foram os seguintes: *Fusobacterium aquatile*, *Brevundimonas vesicularis*, *Fusobacterium necrogenes* e *Nitrococcus mobilis*. As bactérias isoladas foram testadas por 24 horas em caldo nutriente que continha 10, 20 e 30 mg Hg^{2+}/L , e em resíduos de minas de ouro em pequena escala, que continham 41,37 mg Hg^{2+}/L , por 2 semanas. Dentre as bactérias avaliadas *Fusobacterium aquatile* foi a que exibiu a maior eficiência de acumulação de mercúrio.

O isolamento de bactérias resistentes ao mercúrio foi realizado por Pushkar *et al.* (2019). As bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Acinetobacter* foram capazes de suportar e crescer em concentrações próximas a 700 mg de mercúrio e elevada salinidade, sendo, portanto, promissoras para remediação eficaz de mercúrio.

Acosta-Rodríguez *et al.*, (2018) estudaram a resistência do fungo *Aspergillus niger* em meios com elevadas concentrações de metais pesados, bem como a eficiência de remoção destes metais por esse microrganismo. As condições ideais para a remoção de 83,2% de Hg^{2+} , consistiram de um efluente com concentração inicial de 100 mg/L, pH 5,5 e temperatura de 28°C.

Metodologia

Fungos filamentosos empregados na remoção de mercúrio

Todas as espécies de fungo empregadas nesta pesquisa foram cedidas pela Fundação Osvaldo Cruz/FIOCRUZ, e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental (LPBA), do Centro Universitário da Zona Oeste (UEZO). As linhagens empregadas no presente trabalho foram as seguintes: *Penicillium chrysogenum* IOC 2082, *Penicillium corylophilum* CCFIOC 4297, *Aspergillus niger* IOC 4003, *Aspergillus versicolor* IOC 3997, e *Aspergillus Flavus* (linhagens *A. flavus* IOC 05, *A. flavus* IOC 4053, *A. flavus* IOC 4054, *A. flavus* IOC 4102, *A. flavus* IOC 4123 e *A. flavus* IOC 4133).

Meio de cultura e inoculação dos fungos

O meio de cultura utilizado para esta pesquisa foi o meio batata-dextrose-agar (BDA), da *Baird-Parker*. Para o crescimento das 10 estirpes de fungos foram utilizadas placas de Petri de poliestireno, de 60 x 15mm de diâmetro, em duplicata, e incubadas em estufa durante 7 dias a uma temperatura de 30 °C, exceto as linhagens de *A. flavus* que necessitaram de 10 dias para crescer.

Inoculação dos fungos no meio BDA enriquecido com Hg

Após o crescimento dos fungos em meio BDA foi retirada uma porção de cerca de 7mm de diâmetro, de cada meio cultivado com o respectivo fungo, e transferida à placas de Petri, de vidro, de 100 x 20mm, que continham BDA, enriquecido com mercúrio, na ordem de 10 mg de Hg²⁺/L e pH 5,7 (experimento em triplicata). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa, durante 15 dias, a temperatura de 30°C (SHIM *et al.*, 2005; KURINATI *et al.*, 2014).

Obtenção de conídios ativos e inativos

Para se obter a suspensão de conídios, foram adicionados cerca de 20 mL de solução salina (0,85%) em placas de Petri, enriquecidas com Hg²⁺, que continham os fungos cultivados anteriormente durante 2 semanas. Para facilitar a remoção dos conídios do meio de cultura, fez-se a raspagem com o auxílio da alça bacteriológica. A suspensão de conídios foi transferida para um *erlenmeyer* com o auxílio de pipeta, em condições assépticas. Parte da suspensão de conídios foi transferida para um segundo *erlenmeyer* e tratada termicamente a 120°C e 1 atm, durante 30 minutos, em autoclave, com o objetivo inativar a biomassa. A seguir, foi realizada a padronização do inóculo em câmara de Neubauer.

Preparo da solução-mãe de Hg²⁺

A solução-mãe de Hg²⁺ foi preparada com 0,677g de cloreto de mercúrio (HgCl₂) dissolvidos em 100 mL de água destilada estéril, de acordo com Kurniati *et al.*, (2014), obtendo-se uma concentração de 6,77g/L.

Preparo do meio de cultura líquido contaminado com Hg²⁺

Preparou-se 1L de caldo de batata dextrose. O meio de cultura teve seu pH ajustado em 5,7 e, posteriormente, distribuídos 100 mL do caldo em cada um dos 10 *erlenmeyers* de 250 mL empregados na etapa seguinte. Os frascos contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Para obtenção do meio de cultura enriquecido com íons mercúricos, adicionou-se a solução-mãe de HgCl₂, em cada *erlenmeyer*, obtendo-se uma concentração final de 7,39 mg de Hg²⁺.

Inoculação do fungo no meio de cultura contendo Hg²⁺

Para uma perfeita homogeneização da solução o meio batata-dextrose, enriquecido com Hg²⁺, foi agitado antes da inoculação dos conídios. Foram adicionados 10⁷ conídios/mL, em nove dos *erlenmeyers* preparados para tal experimento, em ambiente asséptico - câmara de fluxo laminar, com o décimo frasco utilizado como controle.

Biossorção de mercúrio

Os conídios ativos foram tratados de duas formas, o modo estático, no qual não houve agitação, permanecendo em estufa a 30°C; e o modo agitado, mantido em *shaker* a 30°C, e 150 rpm. A biomassa inativa (conídios inativos) foi tratada apenas sob agitação, nas mesmas condições da biomassa ativa. O tempo de

experimento foi igual para todos os tratamentos, 7 dias e meio. O experimento foi realizado em triplicata. Finalizados os experimentos, o sobrenadante, livre de biomassa, foi reservado para determinação do Hg^{2+} remanescente (aquele que não foi removido pelo fungo), e a biomassa residual, foi levada até peso constante para calcular a quantidade de metal removido por grama de biomassa (Q), mediante a seguinte equação (4) :

$$Q = \frac{V (c_i - c_f)}{M} \quad (4)$$

Onde: Q – quantidade de metal adsorvido por grama de biomassa (mg/g); V – volume da solução contendo o metal (L); c_i e c_f – concentrações inicial e final do metal (mg/L); M – massa da biomassa (g) (MOREIRA, 2007; CALFA, TOREM, 2004).

Determinação de mercúrio

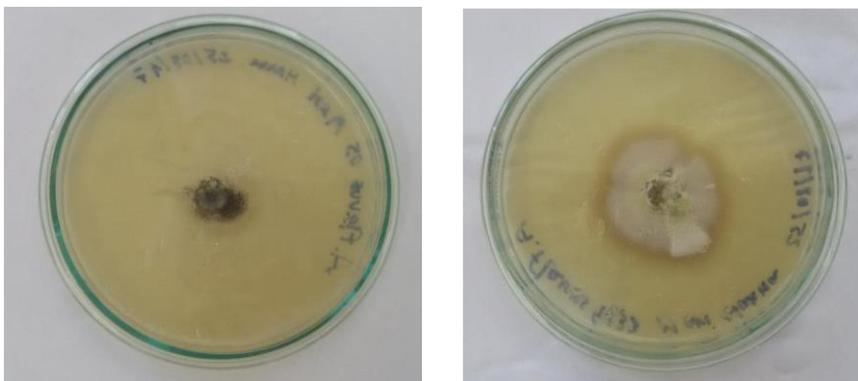
A determinação de mercúrio foi realizada na Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM) utilizando o analisador direto de mercúrio (DMA-80), da marca Milestone. O equipamento possui uma margem de erro de 3%. Esse é um sistema de análise de mercúrio por combustão e dispensa o pré-tratamento da amostra. As amostras foram filtradas com auxílio de uma membrana millipore de $0,45\mu m$, para retirar vestígios de qualquer material sólido remanescente do meio.

Resultados e discussão

No presente estudo 10 estirpes de fungos foram avaliadas quanto à sua resistência ao Hg^{2+} (duas de *Penicillium* e oito de *Aspergillus*). Apenas duas linhagens de *Aspergillus*, da espécie *flavus*, mostraram resistência ao metal,

crescendo em placas de Petri que continham BDA, enriquecidas com 10,0 mg de Hg^{2+}/L . Porém, as demais espécies empregadas não foram capazes de crescer nas condições estabelecidas. Na literatura podem ser encontrados trabalhos que corroboram o emprego de *A. flavus* na biorremediação de mercúrio (MARTÍNEZ-JUAREZ *et al.*, 2012; KURINATI *et al.*, 2014; CHANDA *et al.*, 2016; MAHMOUD *et al.*, 2017). Dentre os fungos testados, apenas *A. flavus* IOC05 e *A. flavus* IOC4133 apresentaram crescimento no meio contendo Hg^2 . Na Figura 1 mostra-se o crescimento dos fungos *A. flavus*, estirpes IOC 05 e IOC 4133.

Figura 1. Crescimento do fungo filamentososo *A. flavus*, estirpes IOC 05 e IOC 4133 em meio BDA enriquecido com mercúrio.



Fonte: Pesquisa do Autor

Comparativamente com a pesquisa realizada por Kurinati *et al.*, (2014), na presente pesquisa os resultados obtidos com as estirpes de *A. flavus* IOC 05 e IOC 4133, crescidas em placas de Petri de igual concentração (10 mg de Hg^{2+}/L), foram maiores do que os da estirpe KRP1 (0,83 cm), com diâmetros de crescimento de 1,0 cm e 3,0 cm, respectivamente.

Porém, em referência à pesquisa de Hindersah *et al.*, (2018) pode se dizer que o *A. flavus* avaliado pelo grupo destes investigadores produziu um círculo de crescimento 4,5 e 1,5 vezes maior do que o observado na presente pesquisa para *A. flavus* IOC 05 e IOC 4133, respectivamente.

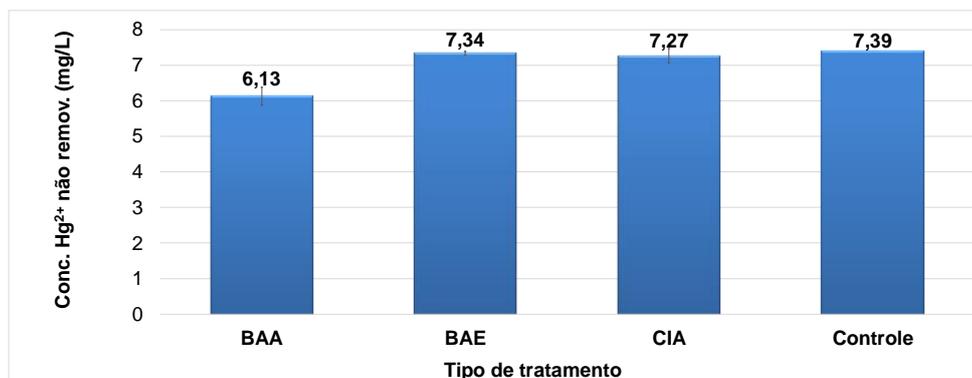
A estirpe *A. flavus* IOC 4133 foi selecionada para a continuidade do presente trabalho por apresentar uma maior capacidade de tolerância ao mercúrio. Para isto

realizaram-se dois experimentos, um com conídios ativos e outro com conídios inativos. Cabe salientar que os conídios ativos foram testados em meios agitado e estático; enquanto os conídios inativos foram testados somente em meio agitado.

A concentração de Hg^{2+} utilizada em todos os tratamentos foi de 7,39 mg Hg^{2+} /L e, como calculado a partir do observado na Figura 2, no sistema com os conídios ativos sob agitação (AA) o fungo conseguiu remover 1,26 mg Hg^{2+} /L do meio de cultura enriquecido com mercúrio; enquanto no sistema com os conídios inativos e sob agitação (IA) o microrganismo foi capaz de remover apenas 0,12 mg Hg^{2+} /L desse meio. Por outro lado, no tratamento com a biomassa ativa em meio estático (AE), o fungo se mostrou incipiente na remoção do metal.

A estirpe *A. flavus* IOC-4133 apresentou remoção de Hg^{2+} tanto com a biomassa ativa (1,26 mg/L igual a 17% de remoção) quanto com os conídios inativos (0,12 mg/L igual a 1,6% de remoção), ambos sob agitação. No entanto, a biomassa ativa se mostrou muito mais eficiente, alcançando um resultado de remoção, aproximadamente dez vezes maior do que os conídios inativos. Contrariamente ao resultado de Kurinati *et al.*, (2014), o resultado da presente pesquisa foi de encontro ao resultado dos referidos pesquisadores. Pois, *A. flavus* KRP1 foi capaz de remover 97,50% e 98,73% de mercúrio dos sistemas agitado e estático, respectivamente.

Figura 2. Avaliação da capacidade biossorbitiva de mercúrio pela estirpe *A. flavus* IOC-4133, com conídios ativos e inativos, sob diferentes sistemas de tratamento.



Fonte: Pesquisa do Autor

No controle, tratado sob agitação, não havia a presença do microrganismo. BAA- biomassa ativa agitada; BAE- biomassa ativa estática; CIA- conídios inativos agitados. Os resultados obtidos também indicaram que o fungo *A. flavus* IOC-4133 adsorveu Hg^{2+} , fato este corroborado pela redução da concentração de mercúrio no seio da solução quando utilizados conídios inativos (0,12 mg Hg^{2+} /L). Nesse caso, o microrganismo atuou independentemente do metabolismo celular, não havendo necessidade de gasto energético na forma de ATP para a captação do metal.

O mecanismo de adsorção ocorre, essencialmente, por meio de interações físicas (força de Van der Waals) e, devido à formação de uma ligação fraca, é um processo que pode ser facilmente revertido. Além disso, em alguns casos, existem forças adicionais de natureza química que ligam as moléculas adsorvidas à superfície do sólido (BANDEIRA, 2007).

Portanto, o metal é acumulado por meio de interações físico-químicas entre os íons metálicos presentes no meio líquido e os constituintes da parede celular dos microrganismos (polissacarídeos e proteínas) (GADD, 1992; CONICELLI, 2017). O principal constituinte da parede celular, na maioria dos fungos, é a quitina. Mas eles também podem apresentar glicana e manana, e em alguns casos, celulose, como componentes estruturais (TORTORA *et al.*, 2012).

Quanto à eficiência do fungo *A. flavus* IOC-4133, mesmo apresentando uma porcentagem de absorção de Hg^{2+} menor do que a do *A. flavus* estudado por Kurniati *et al.*, (2014), pode-se considerar um resultado satisfatório. Em contrapartida, vale ressaltar que isolados do mesmo gênero não possuem necessariamente a mesma tolerância a metais pesados. A variação na tolerância ao metal varia de acordo com as estratégias ou mecanismos de resistência exibido pelos fungos (EZZOUHRI *et al.*, 2009). Além disso, deve ser considerado que a contaminação nos locais poluídos geralmente não é causada por um único metal, e que a seleção do bioissorvente é, provavelmente, conduzida pelo grau de tolerância ao elemento mais tóxico encontrado ou pela capacidade do bioissorvente suportar os diferentes metais atuando em sinergia (BALDRIAN & GABRIEL, 2002).

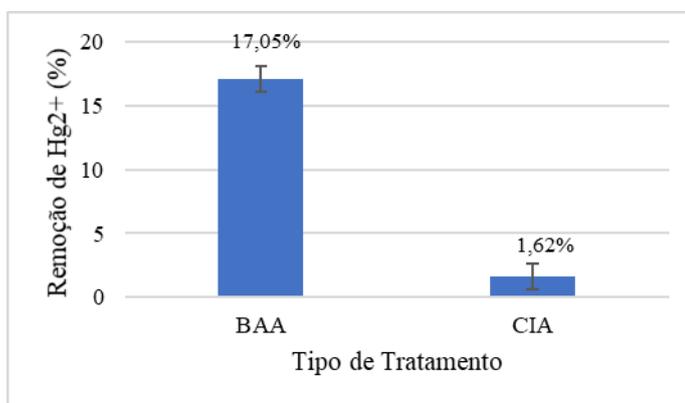
Por outro lado, o tratamento com a biomassa ativa, de modo estático, não apresentou capacidade apreciável de remoção de Hg^{2+} . *A. flavus*, como a grande

maioria dos fungos, é um microrganismo aeróbico (HALL, DENNING, 1994). Portanto, o seu crescimento se deu na superfície do meio, impossibilitando a sua aproximação com o metal em solução. Este resultado vai de encontro ao resultado de Kurniati *et al.*, (2014), já que o *A. flavus* KRP1 estudado por esse grupo de pesquisadores conseguiu uma remoção de Hg^{2+} ligeiramente superior com a biomassa estatica (98,73%) do que com a biomassa sob agitação (97,50%), a partir de uma solução com concentração de 10 mg de Hg^{2+}/L .

Era de se esperar que o tratamento da forma agitada atingisse um resultado mais promissor, visto que a agitação do sistema proporcionaria que o oxigênio fosse incorporado adequadamente na suspensão, propiciando, desta forma, o crescimento dos microrganismos em todo o sistema. No gráfico da Figura 3, podemos observar a porcentagem de mercúrio removido pela biomassa ativa em comparação com a biomassa inativa, ambos sob agitação.

Quanto à quantidade de metal adsorvido por grama de biomassa, no sistema sob agitação a biomassa ativa removeu 1,38 mg Hg^{2+}/g , enquanto que na biomassa inativa a remoção foi de somente 0,12 mg Hg^{2+}/g , indicando que a primeira teve um desempenho 11 vezes superior. Isso indica que a sorção de mercúrio se deu em maior parte pela acumulação intracelular (absorção) do que por adsorção. Desta forma, o cátion pode ser acumulado dentro da célula através do sistema de transporte de membrana, de acordo com as diferentes afinidades e especificidades. Quando dentro da célula microbiana, as espécies metálicas podem ser acomodadas no interior de organelas ou estruturas intracelulares, ou também ser translocadas para estruturas específicas, dependendo do organismo e do elemento metálico em questão (WHITE *et al.*, 1997). O desempenho da biomassa ativa pode sofrer alterações de acordo com problemas de toxicidade ou condições como temperatura elevada e falta de nutrientes, porém, tem como vantagem possuir uma variedade de mecanismos de acumulação e relativa facilidade de manipulação genética (GADD, 1988).

Figura 3. Comparativo da remoção de Hg^{2+} , em porcentagem, da biomassa ativa e da biomassa inativa, ambos tratados sob agitação.



Fonte: Pesquisa do Autor

BAA - biomassa ativa agitada; CIA - conídios inativos agitados

Na Tabela 1, observa-se a quantidade de mercúrio sorvido em miligramas por cada grama de biomassa fúngica (valor Q). Também estão presentes a quantidade de Hg^{2+} removida comparativamente entre as biomassas ativa e inativa, sob agitação, assim como seus respectivos pesos seco.

Tabela 1. Capacidade de remoção de mercúrio em meio de cultura BDA pela estirpe *A. flavus* IOC-4133 e os respectivos desvios padrão.

| Tratamento | Conc. inicial Hg^{2+} (mg/L) | Conc. Final Hg^{2+} (mg/L) | Remoção Hg^{2+} (%) | Peso seco do fungo (g) | Hg^{2+} removido (mg/g) (Q) |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|
| Biomassa Ativa Agit. | 7,39 (±)0,0616 | 1,26 (±)0,18 | 17,05% (±)2,4357 | 0,091 (±)0,0081 | 1,38 (±)0,1865 |
| Conídios Inati. Agit. | 7,39 (±)0,0616 | 0,12 (±)0,045 | 1,62% (±)0,6089 | 0,098 (±)0,0079 | 0,12 (±)0,0405 |

Fonte: o próprio autor.

Considerações finais

Os resultados obtidos indicaram que apenas as estirpes de *A. flavus* IOC05 e IOC4133 foram as que apresentaram resistência ao mercúrio e cresceram em meio BDA enriquecido com esse metal, numa concentração de 10 mg de Hg²⁺/L.

Os fungos filamentosos *Penicillium chrysogenum* IOC 2082, *Penicillium corylophilum* CCFIOC 4297, *Aspergillus niger* IOC 4003, *Aspergillus versicolor* IOC 3997, e *Aspergillus Flavus* (linhagens *A. flavus* IOC 4053, *A. flavus* IOC 4054, *A. flavus* IOC 4102, *A. flavus* IOC 4123 não mostraram capacidade de crescimento nas condições empregadas no experimento.

Os ensaios realizados em placa de Petri mostraram que o fungo *A. flavus* IOC-4133 foi capaz de resistir a uma concentração de 10,0 mg de Hg²⁺/L. Já nos testes em meio líquido, com concentração de 7,39 mg de Hg²⁺/L, a biomassa ativa e inativa, sob agitação, foram capazes de remover, respectivamente, 1,26 e 0,12 mg de Hg²⁺/L. A quantidade de metal removido em mg de Hg²⁺/g de biomassa ativa e inativa (valor Q) foram, respectivamente, 1,38 e 0,12.

O principal mecanismo de remoção do Hg²⁺ pelo fungo *A. flavus* IOC-4133 foi a absorção. No entanto, o referido fungo também foi capaz de reter uma pequena quantidade do metal na superfície celular, caracterizando assim o processo de adsorção; fato este constatado pela remoção de Hg²⁺ pela biomassa inativa.

Apenas o sistema sob agitação se mostrou eficaz para o processo de sorção pelo fungo *A. flavus* IOC-4133.

Referências

ACOSTA-RODRÍGUEZ, Ismael. et al. **Bioremoval of different heavy metals by the resistant fungal strain *Aspergillus niger***. Bioinorganic Chemistry and Applications. v. 2018, p. 1-7, 2018.

AHLUWALIA, Sarabjeet Singh; GOYAL, Dinesh. **Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metal from wastewater**. Bioresource Technology, v. 98, n° 12, p. 2243-2257, 2007.

AMABILIS-SOSA, Leonel Ernesto. et al . **Remoción de mercurio por *Phragmites australis* empleada como barrera Biológica en humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes a metales pesados**. Rev. Int. Contam. Ambie. v. 32, n° 1, p. 47-53, 2016.

BALDRIAN, Petr; GABRIEL, Jiri. **Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus***. Mycologia. v. 94, n° 3, p. 428-436, 2002.

BANDEIRA, Luiz Fernando Martins. **Remoção de metal pesado de efluentes aquosos através da combinação dos processos de osmose inversa e adsorção**. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 148 f., 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Gerenciamento dos Resíduos de Mercúrio nos Serviços de Saúde**. Brasília, 46 p., 2010. Disponível em: <https://203.140.31.66/brazil/portuguese/office/publications/pdf/gerenciamento.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2020.

CALFA, Bruno Abreu; TOREM, Maurício Leonardo. Uso de biomassas em processo combinado biossorção/flotação para remoção de metais pesados. **Relatório de atividades do projeto de iniciação científica, 2004 – 2007**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. http://www.puc-rio.br/ensinopesq/ccpg/pibic/relatorio_resumo2007/relatorios/dcm/dcm_bruno_alf_eu_cfas.pdf. Acesso em: 29 jun. 2020.

CHANDA, Anindya; GUMMADIDALA, Phani M.; GOMAA, Ola M. **Mycoremediation with mycotoxin producers: a critical perspective**. Appl Microbiol Biotechnol. v. 100, p. 17–29, 2016.

CHASANA, Umi; NURAINI, Yulia; HANDAYANTO, Eko. **The potential of mercury-resistant bacteria isolated from small-scale gold mine tailings for accumulation of mercury**. Journal of Ecological Engineering. v.19, n° 2, p. 236–245, 2018.

CONICELLI, B. P. **Biossorção de chumbo e mercúrio pelas linhagens selvagem e recombinante de *C. metallidurans* em meio aquoso.** Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo, 73 f., 2017.

DASH, HIRAK R.; DAS, SURAJIT. **Bioremediation Potential of Mercury by *Bacillus* Species Isolated from Marine Environment and Wastes of Steel Industry.** *Bioremediation Journal*. v. 18, p. 204–212, 2014.

DHANKHAR, RAJESH; HOODA, ANJU. **Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions.** *Environmental Technology*, v. 32, n° 5, p. 467–491, 2011.

ESMAEILI, AKBAR; SAREMNIA, BETSABE; KALANTARI, MONA. **Removal of mercury (II) from aqueous solutions by biosorption on the biomass of *Sargassum glaucescens* and *Gracilaria corticate*.** *Arabian Journal of Chemistry*. v. 8, p. 506–511, 2015.

ESSA, A. M. M.; MACASKIE, L. E.; BROWN, N. L. **Mechanisms of mercury bioremediation.** *Biochemical Society Transactions*, v. 30, part. 4, p. 672 – 674, 2002.

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

GADD, G. M. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: Rehm, H. J. (ed): **Biotechnology** - a comprehensive treatise. Weinheim: VHC Verlagsgesellschaft. 6b. p. 401-433, 1988.

_____. Microbial control of heavy metal pollution. In: FRY, J.C.; GADD, G.M.; HERBERT; R.A.; JONES, C.W; WATSON-CRAIK, I. **Microbial control of pollution.** 58th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, p. 59-88, 1992.

GLUSZCZ, PAWEŁ; PETERA, JERZY; LEDAKOWICZ, STANISŁAW. **Mathematical modeling of the integrated process of mercury bioremediation in the industrial bioreactor.** *Bioprocess Biosyst. Eng.* v. 34, p. 275–285, 2011.

HALL, L. A.; DENNING, D. W. **Oxygen requirements of *Aspergillus* species.** *Journal of Medical Microbiology*. v. 41, n° 5, p. 311-315, 1994.

HINDERSAH, R. et al. **Isolation of mercury-resistant fungi from mercury-contaminated agricultural soil.** *Open Access Journal*, v. 8, n° 3, p. 1-8, 2018.

JAFARI, Seyed Ali; CHERAGHI, Sama. **Mercury removal from aqueous solution by dried biomass of indigenous *Vibrio parahaemolyticus* PG02: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies.** International Biodeterioration & Biodegradation. v. 92, p. 12 - 19, 2014.

JAVED, Muhammad Mohsin; IKRAM-UL-HAQ; SHAHBAZ, Farrukh. **Biosorption of Mercury from Industrial Effluent by Fungal Consortia.** Bioremediation Journal, v. 11 n° 3, p.149–153, 2007.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. **Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review.** Bioresource Technology, v. 53, n° 3, p.195-206, 1995.

KURNIATI, Evi. et al. **Potential bioremediation of mercury-contaminated substrate using filamentous fungi isolated from forest soil.** Journal of Environmental Sciences, v. 26, p. 1223–1231, 2014.

MAHMOUD, Mohamed E. et al. **Assessment of heat-inactivated marine *Aspergillus flavus* as a novel biosorbent for removal of Cd (II), Hg (II), and Pb (II) from water.** Environ Sci Pollut Res. v. 24, p.18218–18228, 2017.

MARICHELVAM, M.K.; AZHAGURAJAN, A. **Removal of mercury from effluent solution by using banana corm and neem leaves activated charcoal.** Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management v. 10, p. 360–365, 2018.

MARTÍNEZ-JUAREZ, Victor M. et al. **Biosorption of mercury (II) from aqueous solutions onto fungal biomass.** Bioinorganic Chemistry and Applications. v. 2012, p. 1-5, 2012.

McKELVEY, W.; OKEN, E. Mercury and Public Health: An assessment of human exposure. In: BANK M. S. **Mercury in the Environment - Pattern and Process.** 1 ed. California: Journal Storage, p. 267–288, 2012.

MOREIRA, A. S. **Biossorção utilizando alga marinha (*Sargassum* sp) aplicada em meio orgânico.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 103 f., 2007.

PINO, Gabriela Huamán; TOREM, Maurício Leonardo. **Aspectos fundamentais da biossorção de metais não ferrosos – estudo de caso.** Tecnologia em metalurgia, materiais e mineração, São Paulo, v. 8, n° 1, p. 57-63, 2011.

PINTO, Ernani. et al. **Heavy metal-induced oxidative stress in algae.** Journal of Phycology, v. 39, n° 6, p. 1008-1018, 2003.

PURKAN, Purkan. et al. **Biochemical properties of mercuric reductase from local isolate of *Bacillus* sp. for bioremediation agent.** Molekul, v. 12. n° 2, p. 182 – 188, 2017.

PUSHKAR, Bhupendra; SEVAK, Pooja; SINGH, Akansha. **Bioremediation treatment process through mercury-resistant bacteria isolated from Mithi river.** Applied Water Science. v. 9, n°117, p. 1-10, 2019.

RAJ, Deep; MAITI, Subodh Kumar. **Sources, toxicity, and remediation of mercury: an essence review.** Environ Monit Assess, v. 191, n° 566, p. 1-23, 2019.

ROJAS, Luis A. et al. **Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation.** PLoS ONE Journal. v. 6, n°3, e17555, 2011.

SAAD, Abdelnaby Mahmoud. et al. **Evaluation of *Aspergillus tamarii* NRC 3 biomass as a biosorbent for removal and recovery of heavy metals from contaminated aqueous solutions.** Bulletin of the National Research Centre, 43: 10, p. 1-9, 2019.

SARANYA, Kailasam. et al. **Bioremediation of mercury by *Vibrio fluvialis* screened from industrial effluents.** BioMed Research International. v. 2017, p. 1 – 6, 2017.

SHIM, Sung Mi. et al. **The characteristics of cultural conditions for the mycelial growth of *Acropleiota procera*.** Mycobiology. v. 33, n°1, p.15-18, 2005.

SINHA, Arvind; PANT, Kamal Kishore; KHARE, Sunil Kumar. **Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 71, p. 1-8, 2012.

STREETS, David G. et al. **Total Mercury Released to the Environment by Human Activities.** Environ. Sci. Technol. v. 51, n° 11, p. 5969–5977, 2017.

TAREKEGN, Molalign Medfu; SALILIH, Fikirte Zewdu; ISHETU, Alemitu Iniyehu. **Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment.** Cogent Food & Agriculture, v. 6: 1783174, p. 1-19, 2020.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** 6 ed. Artmed, Porto Alegre. p. 827, 2003.

URGUN-DEMIRTAS, Meltem. et al. **Achieving very low mercury levels in refinery wastewater by membrane filtration.** Journal of Hazardous Materials, v. 215– 216, p. 98 – 107, 2012.

VOLESKY, B. **Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century.** Hydrometallurgy, v. 59, n° 2-3, p. 203-216, 2001.

WHITE, C.; SAYER, J.A.; GADD, G.M. **Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination.** Federation of European Microbiological Societies. v. 20, n° 3-4, p. 503-516, 1997.