

Avaliação da capacidade de biorremediação de metais tóxicos por microrganismos selecionados

Autores: Elisabete Vicente, Ronaldo Biondo, Claudionor G. Silva Filho, Carlos A. Brandt

Laboratório: BiobasedTechnology-Brazil (BBT);

Contatos: bevicent@gmail.com; robiondo.rb@gmail.com

Introdução:

A necessidade de se tratar a água é premente e constitui uma grave questão de saúde pública, devido principalmente, à toxicidade dos compostos descartados, risco de acúmulo na cadeia alimentar e persistência na natureza. Especialmente preocupante é o fato de que, diferentemente de contaminantes orgânicos, que podem ser convertidos em derivados não-tóxicos por ação microbiana, os contaminantes metálicos persistem indefinidamente no meio ambiente. O tratamento clássico de efluentes contendo metais pesados envolve processos físico-químicos. Contudo, essas técnicas tradicionais são inadequadas para a descontaminação de grandes volumes de efluentes, devido à baixa eficiência operacional e aos elevados custos (Gavrilescu, 2004).

O processo pelo qual organismos, normalmente microrganismos ou plantas, vivos ou mortos ou mesmo partes destes, são utilizados para remover ou reduzir poluentes no ambiente é conhecido como **biorremediação** (Gaylarde et al., 2005). A biorremediação pode ser empregada em várias metodologias visando a retirada de metais tóxicos de águas superficiais ou subterrâneas. Relativamente apresenta menores custos, alta eficiência, gera menor quantidade de rejeitos e, portanto, tem sido vista como mais atrativa.

As vantagens de um biorremediador microbiano de metais pesados são diversas, destacando-se: (i) ser seguro para os seres humanos e o meio ambiente, (ii) fácil cultivo, (iii) tolerantes aos íons de metais pesados acumulados, (iv) facilmente separados da água tratada, e (v) a biomassa pode ser recuperada após o sequestro do metal (Biondo et al 2012).

Nosso grupo vem desenvolvendo o emprego de **biorremediação** de águas contaminadas com metais tóxicos e de outras substâncias químicas desde 2003 e, neste processo, construiu uma coleção de microrganismos selecionados com bom potencial para emprego em **biorremediação**. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de biorremediação de águas contendo metais pesados empregando alguns microrganismos (bactérias e leveduras) que haviam sido selecionados em trabalhos anteriores.

Metodologia:

Cultivo e manuseio dos microrganismos

As diversas técnicas de manipulação microbiana, tais como: preparo de meios de cultura e condições de crescimento; reagentes e soluções foram realizadas conforme descrito em [Sambrook e Russell, 2001](#). Foram empregadas as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (C600), *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator* (DSMZ) e *Cupriavidus metallidurans* (CH34); e, as bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* e *Deinococcus radiodurans*. Foram empregadas as leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* (SC288C), *Pichia pastoris* (GS115) e *Candida utilis*.

Ensaio de biorremediação

Os íons de metais pesados utilizados neste estudo foram Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , a maioria na forma de cloreto. Todos na concentração final de 1 mM.

A massa bacteriana de cada linhagem foi obtida após cultivo em meio LB, por 18 h sob agitação, a 28° (*C. necator* e *C. metallidurans*) ou 37°C (*E. coli* e *P. aeruginosa*). A massa de levedura foi obtida após cultivo em meio YPD (2% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose), sob agitação, a 28°, por 24 horas. Em seguida, a massa celular de cada microrganismo foi centrifugada, lavada por duas vezes com água MilliQ e, finalmente ressuspensa em 10 mL de água MilliQ contendo o íon metálico e incubada por 24 h, a 28 °C, sob agitação. Amostras foram retiradas após 30 min, e 1, 6, 12 e 24 h de incubação. As concentrações de íons presentes nos sobrenadantes foram quantificadas, utilizando um equipamento Fotocolorímetro AT100P (ALFAKIT). Todas as análises foram realizadas em duplicata. Amostras de 1 mL de cada experimento foram retiradas, secas por 24 h a 37° C, e as massas celulares foram determinadas por gravimetria, em balança analítica.

Análises físico-químicas

Empregamos análise por Espectroscopia de Infravermelho acoplada a Transformada de Fourier (FT-IR) ([Pavia et al 2001](#)) para identificar os grupos funcionais estão presentes e para observar a ocorrência de modificações químicas após a adsorção dos íons metálicos.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de biorremediação de água contendo metais utilizando-se dos microrganismos:

(i) bactérias Gram-negativas (Fig 1 A a D); (ii) bactéria Gram-positiva (Fig E) e (iii) leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* (Fig 1 F e G).

Resultados:

Em trabalhos anteriores identificamos isolados de nossa coleção de culturas microbianas com ótimo potencial para realizar a Biorremediação de áreas contaminadas por diferentes metais e outros poluentes (**Figura 1**).

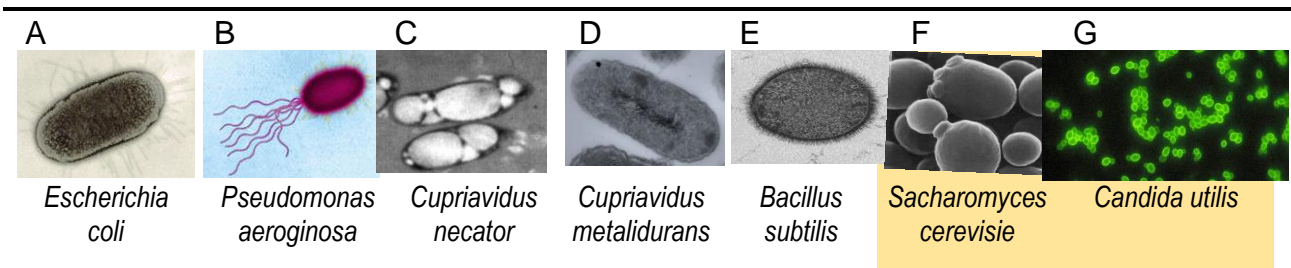


Figura 1: Alguns microrganismos (5 bactérias e 2 leveduras) de nossa coleção.

Em trabalhos anteriores verificamos que dentre alguns os microrganismos analisados para **biorremediação** dos íons metálicos Cu^{+2} e Ni^{+2} , os mais eficientes foram as bactérias:

- para os íons Cu^{+2} : *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*;
- para os íons Ni^{+2} : *Pseudomonas putida*, *Cupriavidus necator* (**Figura 2**)

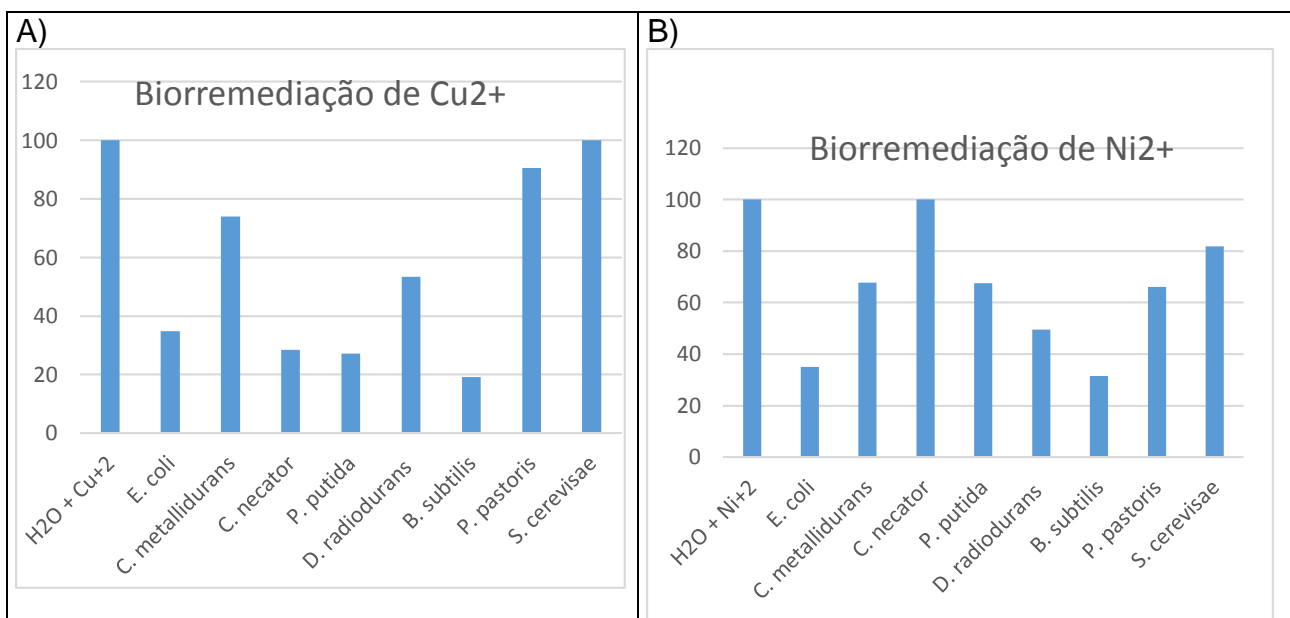


Figura 2: Biorremediação de águas contendo: A) Cu^{2+} e B) Ni^{2+} .

Serão ainda apresentados os resultados de **biorremediação** de obtidos com:

- os todos os microrganismos apresentados na Figura 1;
- de biorremediação dos metais Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} .

Sítios de ligação dos íons metálicos às estruturas microbianas

Na **Figura 3** é apresentado um exemplo de espectro infravermelho (FTIR) obtido com células da levedura *S. cerevisiae* após incubação com íons Hg^{2+} . Após a adsorção de íons mercúrio, as modificações mais acentuadas ocorreram para as bandas próximas de 1750 cm^{-1} (carbonila, e/ou sulfidrina), 1640 e 1400 cm^{-1} (hidroxilas).

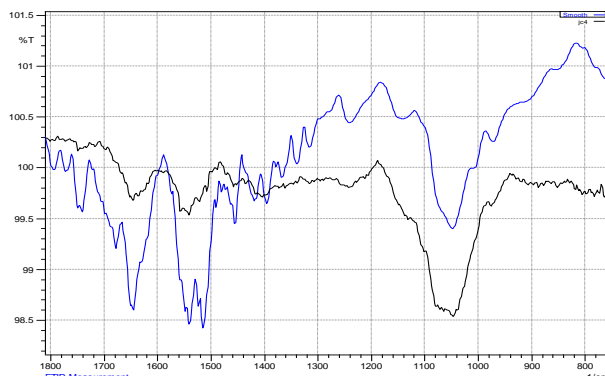


Figura 3: Espectro de infravermelho (FTIR) de células de levedura controle incubadas em água (preto) e em $10\text{ }\mu\text{M HgCl}_2$ por 2 horas (azul).

DISCUSSÃO:

Neste trabalho foram selecionados microrganismos com ótimo potencial para emprego em biorremediação de águas contaminadas com metais tóxicos. Estamos iniciando o emprego destes agentes de modo isolado ou em consórcios, e desenvolvendo uma metodologia prática para o seu emprego em biorremediação de águas superficiais ou subterrâneas. De modo geral, os dados obtidos com espectroscopia FTIR mostraram que os íons metálicos interagem com os agrupamentos carbonila e hidroxilas dos microrganismos. Isto será levado em consideração na etapa de preparação das células para potencializar sua capacidade de biorremediação.

Referências Bibliográficas:

- Biondo R, Silva FA, Vicente EJ, Sarkis JES, Schenberg ACG. Synthetic Phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environmental Science & Technology*. **46**: 8325-8332, 2012;
- Gavrilescu M., Removal of heavy metals from the environment by biosorption, *Eng. Life Sci.* **4**: 219-232, 2004;
- Gaylarde CC, Bellinaso ML, Manfio GP. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotechnolog. Ciênc. Desenvol.* **34**: 36-43, 2005;
- Pavia DL, Lampam GM, Kriz GS. *Introduction to Spectroscopy*. 3rd ed. 2001;
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor; 2001.

Apoio:



KeyAssociados - Soluções Sustentáveis
(<http://www.keyassociados.com.br/>)