

Influência do pH no crescimento e bioissorção por bactérias resistentes ao chumbo isoladas de resíduo industrial no Rio Grande do Sul⁽¹⁾.

Cácio Luiz Boechat⁽²⁾; **Márcia de Campos Orantas**⁽²⁾; **Robson Andreazza**⁽³⁾; **Flávio Anastácio de Oliveira Camargo**⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da UFRGS.

⁽²⁾ Doutorando em Ciência do Solo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, Porto Alegre, RS, cboechat@hotmail.com; ⁽²⁾ Doutoranda em Ciência do Solo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ⁽³⁾ Professor Adjunto; Universidade Federal de Pelotas; ⁽⁴⁾ Professor Associado; Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO: A contaminação por chumbo em particular, pode causar efeitos tóxicos para plantas, animais e seres humanos ao longo da exposição. No solo o chumbo reage através da adsorção, complexação e processos de precipitação, que levam à sua imobilização no solo. O objetivo deste estudo foi isolar bactérias resistentes a partir de efluente industrial e avaliá-las quanto ao seu crescimento e bioissorção em solução aquosa contaminada com chumbo (II). Foram identificados três isolados com estas características e chamados I1, I2 e I3. A máxima bioissorção de chumbo dos isolados I1 e I2 foram obtidas na concentração de 55 mg Pb L⁻¹, com pH ótimo de 7,0 e para o isolado I3 foi obtida a partir da concentração inicial de 35 mg Pb L⁻¹, com pH ótimo de 7,0. A capacidade de bioissorção, tolerância e crescimento dos isolados I1, I2 e I3 em condições controladas de laboratório, torna-os candidatos adequados para a bioissorção de chumbo em ambientes terrestres e aquáticos contaminados.

Termos de indexação: Bactéria, Pb (II), biorremediação.

INTRODUÇÃO

A crescente economia mundial traz consigo muitas inovações e melhorias, mas também alguns ônus. Um deles é o aumento substancial de dejetos industriais altamente poluentes. Dentre os dejetos mais dificilmente tratáveis encontram-se aqueles ricos em metais pesados oriundos da atividade mineradora, coureira, química e metalúrgica (Andreazza, et al., 2010).

Uma alternativa para a remoção dos metais do ambiente é o uso de bactérias para a detoxificação ou eliminação, uma vez que metais não são degradáveis. Bactérias possuem genes para quase todos os elementos conhecidos, e esses genes desempenham um papel crucial na busca por um método ambientalmente e economicamente eficiente de remoção de metais (Park et al., 2011). Pesquisas indicam que as transições entre espécies de metal são reguladas por comportamentos microbianos, o que fornece uma medida do impacto

da microbiota na biodisponibilidade de metais para plantas e animais.

O chumbo é um metal que pode ser encontrado em materiais corriqueiros, como corantes de tecidos, fogos de artifício e munições, e é usado pelos seres humanos há muito tempo, até como metal para confecção dos primeiros sistemas de encanamento hidráulico, resultando em desenvolvimento de doenças neurológicas e malformações fetais (Neal et al., 2010). O chumbo é encontrado também em solos de locais contaminados com resíduos industriais, em vegetais crescendo nesses solos contaminados e nos lençóis freáticos e águas superficiais da região configurando um problema de proporções não-negligíveis. Sendo assim, o emprego de métodos microbiológicos para a remoção do chumbo de um ambiente configura uma estratégia promissora, em razão dos custos reduzidos e da geração de poucos resíduos (Guo et al., 2010).

Este trabalho teve como objetivo selecionar, isolar e testar o crescimento e a capacidade de bioissorção de bactérias resistentes ao chumbo isoladas de efluentes industriais. Após a seleção e o isolamento das bactérias, foram testados os melhores parâmetros de crescimento destes microrganismos, de forma a aumentar as taxas de bioissorção de chumbo.

MATERIAL E MÉTODOS

Duas amostras de efluente (E1 e E2) e duas de sedimentos de lagoa de decantação (S1 e S2) foram coletados em estação de tratamento de resíduos industriais da UTRESA (Usina de Tratamento de Resíduos S/A), Estância Velha, RS, Brasil. O enriquecimento de bactérias resistentes ao chumbo foi efetuado em 19 mL de meio Lúria-Bertani (LB) em frascos tipo falcon de 125 ml, aos quais foram acrescentadas 300 mg L⁻¹ de chumbo usando PbCl₂, posteriormente chamado de Pb (II). O meio foi ajustado a pH 7,0 utilizando NaOH 1 N ou HCl 0,1 N. O meio nutriente contendo chumbo (LB-Pb(II)) foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min. Quatro amostras foram usadas de forma independente para inocular (1%, v/v) o LB-Pb

estéril e incubados por 24 horas, com agitação orbital a 150 rotações por minutos (rpm) e temperatura controlada de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Posteriormente, 1000 μL da cultura de enriquecimento foram transferidos para 19 mL de meio LB-Pb(II) estéril e incubados por 24 horas, nas mesmas condições anteriores. O procedimento foi repetido para enriquecimento de uma terceira rodada. As bactérias resistentes ao Pb(II) foram posteriormente purificadas por estriamento em meio nutriente LB-Pb(II) com ágar para solidificação.

Os inóculos foram preparados transferindo três alçadas de cada isolado para meio líquido e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. A densidade óptica (DO; $\lambda 600$) do inóculo para cada isolado (I1 = 0,286 [diluído 10x]; I2 = 0,287 [diluído 10x]; e I3 = 0,280 [diluído 5x]) foi medida utilizando um espectrofotômetro. Dezenove mililitros de meio LB-Pb(II) foram colocados em tubos tipo falcon e inoculados com 1000 μL de cada isolado resistente ao chumbo. A tolerância ao chumbo foi monitorada através da medição da densidade óptica (DO; $\lambda 600$) do meio após a incubação sob temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

O chumbo total foi analisado utilizando um espectrômetro de absorção atômica com plasma indutivamente acoplado. Alíquotas do sobrenadante da cultura (alíquotas de 200 mL) foram analisadas no espectrômetro de absorção atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A biossorção de chumbo foi calculada como a diferença entre o chumbo total adicionado ao meio e o chumbo restante no meio após incubação dos isolados ($\text{PbBiossor} = \text{PbTotal adicionado} - \text{PbTotal após crescimento}$).

O efeito do pH sobre o crescimento e biossorção de chumbo foram examinados usando LB-Pb(II). Para visualizar o efeito do pH, o meio LB-Pb(II) esterilizado foi ajustado para pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 com quantidades pré-determinadas de NaOH 1N ou HCl 0,1N esterilizadas. O inóculo foi preparado através da inoculação em meio LB-Pb(II) de cada colônia re-suspendida em meio LB-Pb(II) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e da mesma forma incubado por 24 horas, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Os meios foram inoculados com 1000 μL de cada isolado (DO600 I1 = 0,286 [diluído 10x]; I2 = 0,287 [diluído 10x]; e I3 = 0,246 [diluído 3x]) e analisados a capacidade de biossorção e o crescimento da biomassa.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e efetuado o cálculo da média \pm desvio padrão. O teste de Tukey ($p < 0,001$) foi utilizado para separar os efeitos das médias. As análises foram feitas empregando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três microrganismos resistentes ao chumbo foram isolados de amostra de efluente oriundo de lagoa de decantação de empresa de gestão de resíduos industriais, localizada no município de Estância Velha, RS. Os isolados resistentes ao chumbo foram identificados em placa contendo meio LB-Pb(II) com ágar em função de suas características morfológicas distintas, sendo então chamados de I1, I2 e I3 e avaliados quanto a resistência, biossorção e crescimento em meio líquido contendo Pb(II). A caracterização do efluente (E1) está descrita na Tabela 1.

Estudos anteriores sobre biossorção de metais pesados mostraram que o pH é um fator importante que afeta o processo de biossorção (Tunali et al., 2005). O efeito do pH no crescimento e biossorção de Pb(II) dos isolados foi estudado por alteração dos valores de pH variando entre 4 (mais ácido) e 9 (mais básico); os resultados estão apresentados nas Figuras 1A, 1B e 1C.

O crescimento máximo para o isolado I1 ocorreu no intervalo de pH inicial entre 5,0 e 8,0 (DO600 = 1,92 a 2,06), sendo a máxima biossorção pouco mais da metade do Pb(II) disponível no meio (51,23%) no pH 7,0 (Figura 1A). Além disso, a maior biossorção de Pb(II) ocorreu no pH 7,0 e 8,0 (63,07 e 61,17 mg L^{-1}) não diferindo entre si ($p < 0,001$) com a DO600 variando entre 1,92 e 1,98, respectivamente (Figura 1A). Contudo, observou-se na Figura 3A que a mudança do pH 8,0 para 9,0 resultou em brusca redução na biossorção de chumbo (61,17 para 2,98 mg L^{-1}), acompanhada da DO600 a pH 9,0 para 1,69. No meio com pH 4,0 ou 9,0 o isolado I1 apresentou os piores resultados de biossorção de Pb(II) e biomassa microbiana.

O pH do meio afeta a adsorção, a solubilidade dos íons metálicos e o estado de ionização dos grupos funcionais sobre a parede celular. Devido às altas concentrações de prótons em condições extremamente ácidas, os grupos funcionais da parede celular estão intimamente associados com os prótons e isto restringe a aproximação dos íons metálicos como resultado do aumento da densidade de cargas positivas dos sítios de ligação (Iqbal & Edyvean, 2004).

O pH do meio também afetou o comportamento do isolado I2 (Figura 1B), sendo a pH 4,0 a menor observada seguida da DO600 a pH 9,0; contudo a partir do pH 4,0 houve um aumento linear e significativo da DO600 para valores entre 2,07 e 2,03, variando do pH 5,0 a 8,0, respectivamente, não diferindo entre si ($p < 0,001$). Observou-se aumento linear até a máxima biossorção de Pb(II) (55,80 mg L^{-1}) a pH 7,0, observando-se a partir daí redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de Pb(II) biossorvido (Figura 1B).

Para o isolado I3, observou-se o máximo crescimento (DO600 = 1,55) a pH 7,0, não diferindo ($p < 0,001$) do meio a pH 6,0 (DO600 = 1,45) e

seguido do pH 5,0 e 8,0 (Figura 1C). Os meios LB-Pb(II) em pH 4,0 e 9,0 apresentaram os piores resultados para o crescimento da biomassa microbiana ($DO_{600} = 0,38$ e $0,23$). A biossorção de Pb(II) foi crescente e linear até o pH 7,0 alcançando o valor máximo ($43,29 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, a partir do pH 7,0 o valor da biossorção reduziu ligeiramente a pH 8,0 ($33,48 \text{ mg L}^{-1}$) e acentuadamente a pH 9,0 ($6,44 \text{ mg L}^{-1}$), sendo considerado o pior resultado nas faixas de pH estudadas (Figura 1C).

Para todos os isolados, a biossorção do metal aumentou com o aumento do pH até que atingiu um máximo, e logo em seguida a biossorção do chumbo diminuiu. Gabr et al. (2008) sugerem que a adsorção de íons metálicos na superfície da biomassa é controlada por atração iônica. Com valores de pH baixos, a superfície da célula inativada torna-se mais carregada positivamente, levando a redução da atração entre os íons metálicos e os grupos funcionais na parede celular. Ao contrário, quando o pH aumenta, a superfície da célula fica mais carregada negativamente e o processo de retenção é favorecido (Pardo et al., 2003) até um máximo, que geralmente é atingido a pH 7,0 (Gabr et al., 2008), corroborando os resultados observados (Figuras 1A, 1B e 1C). Resultado semelhante foi encontrado por Rani et al. (2010) trabalhando com *Bacillus* sp..

Porém, para valores de pH mais elevados do que o considerado ótimo (pH 7,0), a formação de complexos hidroxilados metálicos também irá competir com os sítios ativos e, como consequência, a retenção de metais na parede celular vai diminuir novamente (Gabr et al., 2008).

Entretanto, diversos autores observaram a biossorção máxima do Pb (II) a pH 6,0 (*Pseudomonas putida*: Pardo et al., 2003; *Pseudomonas* sp. e *Micrococcus* sp.: Rani et al., 2010, e ainda Puranik & Paknikar (1999) e Uslu & Tanyol (2006) relataram que os pH na máxima biossorção para *Citrobacter* strain MCM B-181 e *Pseudomonas putida* foram de 4,5 e 5,5, respectivamente.

CONCLUSÕES

Os isolados de lagoa de tratamento de efluentes exibem capacidade biorremovedora do íon metálico chumbo e de crescimento em meio contendo até 105 mg Pb L^{-1} .

Os isolados I1 e I2 apresentam comportamento semelhante, o que provavelmente sugere serem do mesmo gênero e espécies diferentes; em contrapartida, o isolado I3 possivelmente pertence a uma ordem distinta dos demais isolados.

Os isolados I1 e I2 possuem elevada capacidade para remover chumbo em meio líquido, apresentando considerável crescimento. O isolado I3 apresenta boa capacidade bioremedora de Pb(II) contudo menor crescimento, quando comparado aos isolados I1 e I2.

O pH influenciam a capacidade de biossorção de Pb(II) e o aumento da biomassa dos isolados I1, I2 e I3.

REFERÊNCIAS

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; WOLF, L.; LEE, M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C. Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of the Total Environment**, 408:1501–1507, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:1039-1042, 2011.

GUO, H.; LUO, S.; CHEN, L.; XIAO, X.; XI, Q.; WEI, W.; ZENG, G.; LIU, C.; WAN, Y.; CHEN, J.; HE, Y. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulating endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. **Bioresource Technology**, 101:8599-8605, 2010.

GABR, R. M.; HASSANB, S. H. A.; SHOREIT, A. A. M. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62:195–203, 2008.

IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Minerals Engineering**, 17:217–223, 2004.

NEAL, R. E.; LIN, C.; ISOM, R.; VAISHNAV, K.; ZIGLER JR, J. S. Opacification of lenses cultured in the presence of Pb. **Molecular Vision**, 16:2137-2145, 2010.

PARDO, R.; HERGUEDAS, M.; BARRADO, E.; VEGA, M. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 376:26–32, 2003.

PARK, J. H.; BOLAN, N.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.; CHUNG, J. W. Bacterial-Assisted immobilization of lead in soils: Implications for remediation, **Pedologist**, 162-174, 2011.

PURANIK, P.R.; PAKNIKAR, K.M. Biosorption of lead, cadmium and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181:



Characterization studies. **Biotechnology Progress**, 15:228–237, 1999.

RANI, M. J.; HEMAMBIKA, B.; HEMAPRIYA, J.; RAJESHKANNAN, V. Global comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: A biosorption approach. **Journal of Environmental Research**, 4:23-30, 2010.

TUNALI, S.; KIRAN, I.; AKAR, T. Chromium(VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. **Minerals Engineering**, 18:681–689, 2005.

USLU G; TANYOL, M. Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. **Journal of Hazardous Materials**, 135:87-93, 2006.

Tabela 1. Características químicas de efluente oriundo de usina de tratamento de resíduos industriais.

Parâmetro (Unidade)	Valores	Método padrão	Limite de detecção
Alumínio total (mg L ⁻¹)	0,133	* 3120 B	0,001
Bo total (mg L ⁻¹)	0,875	3120 B	0,021
Cd total (mg L ⁻¹)	n.d.	3120 B	0,001
Pb total (mg L ⁻¹)	n.d.	3120 B	0,004
Cloretos (mg L ⁻¹)	1125	4500 Cl ⁻ /C	0,25
Cr total (mg L ⁻¹)	0,365	3120 B	0,001
Cr (VI) (mg L ⁻¹)	n.d.	3500 B	0,003
DBO (mg L ⁻¹)	100	5210 B	0,20
DQO (mg L ⁻¹)	280	5220 B	4,00
Fe total (mg L ⁻¹)	0,38	3120 B	0,001
P total (mg L ⁻¹)	2,88	4500 - P/B e E	0,001
Mn total (mg L ⁻¹)	0,809	3120 B	0,002
Ni total (mg L ⁻¹)	0,023	3120 B	0,001
N amoniacal (mg L ⁻¹)	182	4500 NH ₃ B e C	0,14
N total Kjeldahl (mg L ⁻¹)	217	4500 N _{org} B e D	0,14
pH	7,9	4500 H ⁺ - B	-
Zn total (mg L ⁻¹)	0,008	3120 B	0,002
Coliformes termotolerantes (NMP 100 mL ⁻¹)	< 100	9223	100

n.d.: não detectado; *: Standard Methods 21st (ARNOLD et al., 2005)

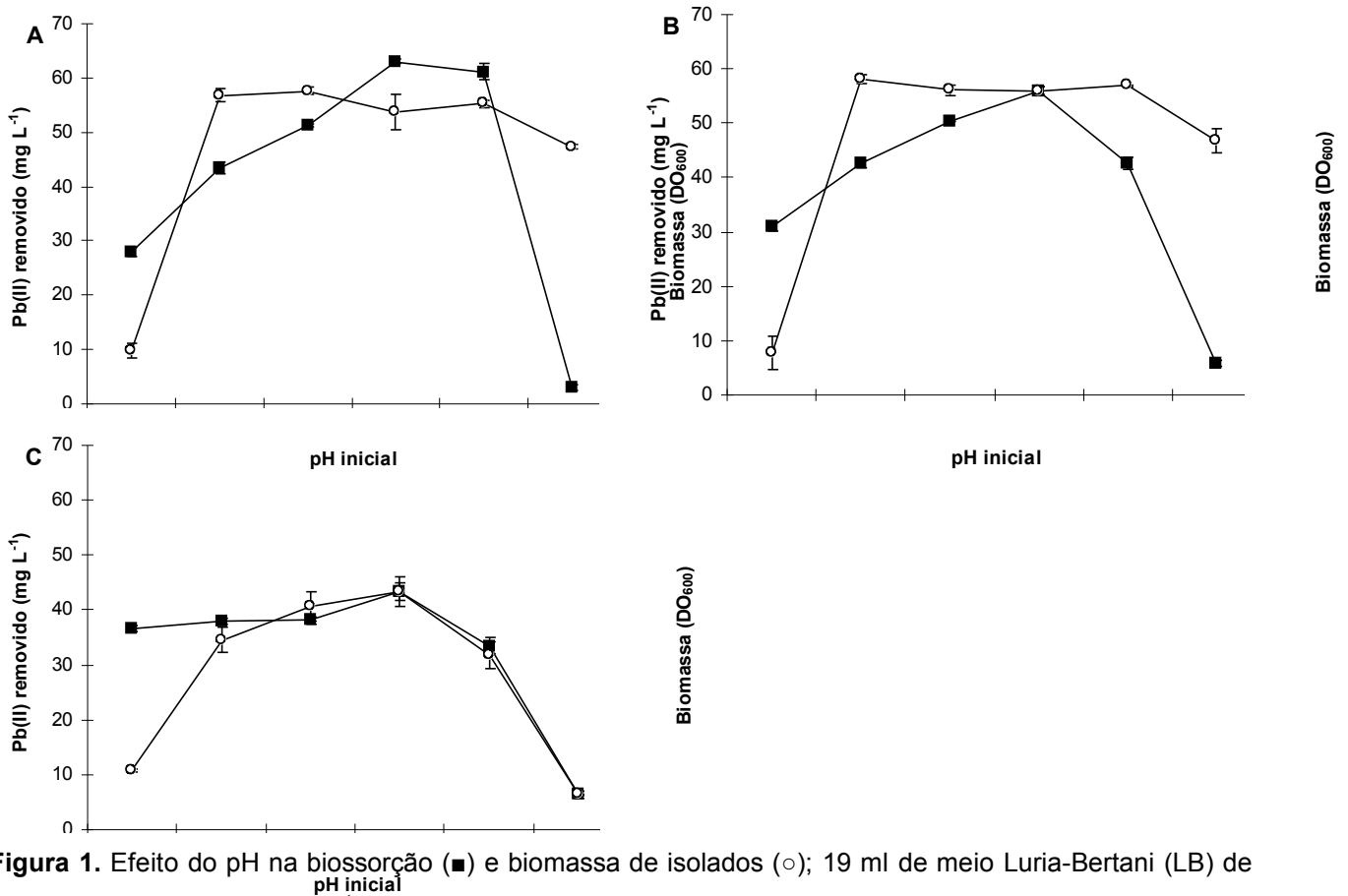


Figura 1. Efeito do pH na biossorção (■) e biomassa de isolados (○); 19 ml de meio Luria-Bertani (LB) de um único metal (105 mg Pb L⁻¹) foram inoculados com 1000 µL de inóculo. As barras representam o desvio padrão das médias (n = 3).