



## Características Morfológicas e Resistência à Metais Pesados de Bactérias Diazotróficas Isoladas de Solos Contendo Resíduo Industrial

(1).

**Camila Feder do Valle<sup>(2)</sup>; Sael Sánchez Elias<sup>(3)</sup>; Leonardo dos Santos França Shockness<sup>(4)</sup>; Vera Lúcia Divan Baldani<sup>(5)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

<sup>(2)</sup> Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (Camila.feder@gmail.com); <sup>(3)</sup> Pós-doutorando (CPGA-CS) da UFRRJ, Seropédica, RJ; <sup>(4)</sup> Mestrando (CPGA-CS) da UFRRJ, Seropédica, RJ; <sup>(5)</sup> EMBRAPA Agrobiologia, BR-465, Km7 – Ecologia, Seropédica, RJ.

**RESUMO:** Bactérias Diazotróficas promovem o crescimento vegetal das plantas e podem auxiliar na fitorremediação de solos contaminados. Essas bactérias se associam preferencialmente com as poaceas, que a exemplo da *Brachiaria decumbens*, podem ser utilizadas na recuperação de áreas contaminadas por metais pesados. Este trabalho teve como objetivo avaliar “in vitro” a resistência intrínseca de isolados bacterianos, oriundos de solos poluídos industrialmente à presença de altas concentrações de metais pesados. Foram utilizados 8 isolados de 45 inoculados em meio líquido JNFb puro e nas concentrações 100, 200 e 300 ppm dos metais chumbo, cobalto e zinco. Em chumbo houve formação de precipitado que desqualifica a metodologia para esta análise. As bactérias demonstraram resistência a alta concentração de zinco, com exceção do isolado 17. Os isolados 14, 15, e 19 demonstraram não resistir a concentração utilizada de cobalto, os isolados restantes foram bem sucedidos.

**Termos de indexação:** Fitorremediação, Elementos-Traço, Fixação Biológica de Nitrogênio.

### INTRODUÇÃO

O chumbo é um metal largamente utilizado por possuir características desejáveis como baixo ponto de fusão, alta resistência à corrosão e alta densidade. É ingrediente de soldas, de tintas, vernizes, vitrificados, esmaltes e vidros, está presente na manufatura de borrachas, baterias, revestimento da indústria automotiva, é utilizado como antidetonante na gasolina entre outros. A toxidez por chumbo nos seres humanos é denominada Saturnismo, que é uma doença ocupacional e de maior risco de vida em crianças e de grande prejuízo em adultos. A intoxicação por chumbo pode ocorrer por vias aéreas, alimentares ou cutâneas, sendo mais comum pelas duas primeiras, principalmente por trabalhadores de indústria que utilizam o metal ou por alimentos e água de regiões onde estas indústrias estão instaladas. É um metal presente na crosta em

baixas quantidades e que demonstra a necessidade de reciclagem e de busca de substitutos. (ARAUJO et al, 1999 e ABREU et al, 1998)

O zinco não é considerado um metal tóxico, pois atua como fator catalítico, co-catalítico e estrutural, de modo geral a deficiência de zinco preocupa mais do que o excesso. Porém em áreas industriais é encontrado em quantidades acima do devido, e pode vir a ser inalado ou ingerido trazendo prejuízos a saúde humana e animal causando desde náuseas e diarreia à letargia. É utilizado na indústria como aditivo para borrachas e tintas, está presente na indústria têxtil e de cerâmica, na galvanização de estruturas de aço e na produção de ligas como o bronze. (SANTOS e FONSECA, 2012)

O cobalto ainda não é considerado um metal tóxico no Brasil, mas nos Estados Unidos já foi incluído em programas com indicadores biológicos no intuito de informar a população de que o cobalto causa toxidez ocupacional. Pesquisas comprovam que a exposição a concentrações elevadas o cobalto pode levar a asma, fibrose e bronquite. É um elemento essencial presente na vitamina B12. Utilizado na indústria metalúrgica, química e de óleos e na cerâmica como pigmento. (ALVES e ROSA, 2003)

A ampla utilização destes metais gera poluição do solo, de canais de passagem de água e em alguns casos do lençol freático, as formas tradicionais de remoção destes compostos são por meio de estações de tratamento de água e de remoção mecânica de camadas do solo. A fitorremediação é uma alternativa viável em que a planta é o agente descontaminante, incorporando esses compostos em sua estrutura, apresentando algumas vantagens em relação a outras opções, tais como a incorporação de forma que o composto não seja mais nocivo a saúde humana e animal ou podendo armazená-lo para receber posterior tratamento. De qualquer forma é economicamente viável e não acarreta novos danos ao meio ambiente tratado, tornando-o agricultável. (PIRES, 2003)

O objetivo deste trabalho foi testar a resistência de bactérias diazotróficas à altas concentrações de



Pb, Co e Zn para posterior uso na fitorremediação de áreas contaminadas por estes metais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi montado no laboratório de gramíneas da Embrapa agrobiologia. Os 45 isolados bacterianos, oriundos de solo contaminado com resíduo de indústria de cerâmica, encontrados durante o desenvolvimento da tese de mestrado de Sael Sánchez Elias, estavam estocados em meio batata com óleo mineral e foram reativados em meio líquido dygs. Sua pureza determinada pela metodologia de Dobereiner et al, (1995) e Baldani et al, (2014). Dos 45 isolados que formaram película nos meios JNFb e NFB foram escolhidos oito com igual velocidade de crescimento, características morfológicas semelhantes e com afinidade com o meio JNFb para a realização do trabalho. Os isolados de trabalho serão doravante denominados 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19. Esses isolados foram crescidos em meio Dygs líquido por 96hs a 30°C sob agitação de 150rpm, após crescimento 20µL de cada isolado foi transferido para meio de cultura semissólido JNFb incubados a 30°C até formação da película característica. Após confirmação de formação de película característica de bactérias diazotróficas em meio semissólido uma alíquota de 26,66µL foi inoculada em 8mL de meio líquido JNFb com os tratamentos de 100, 200 e 300ppm de chumbo, zinco e cobalto, como controle foi utilizado o meio livre de metal. Os tubos foram agitados a 150rpm por 4 dias à 30°C no intuito de manter o inoculado em contato com toda a concentração do contaminante. Após os 4 dias os conteúdos dos tubos foram riscados em placas de petri do mesmo meio de cultura contendo os metais chumbo, cobalto e zinco à 20ppm e livre de metal, e o crescimento bacteriano foi comparado com a origem de cada tudo após 4 dias de crescimento em estufa à 30°C.

Características morfológicas foram observadas e anotadas para separar os isolados em grupos semelhantes utilizando o programa PAST.exe ver. 2.17c. A similaridade foi calculada pela equação de Jaccard em gráfico gerado através do pareamento de grupos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presença do chumbo não foi possível avaliar a capacidade de crescimento e resistência ao aumento da concentração porque houve precipitação do metal no tubo de ensaio nas três concentrações testadas. Em trabalho anterior Valle, et al. 2014 verificou que em 50ppm de chumbo não ocorre precipitação, ficando determinado que a mesma acontece entre 50 e 100ppm neste meio, líquido ou semissólido. BOSSO et al, (2008)

descreve diversos ensaios para a determinação da (Bio)disponibilidade do Pb, e demonstra a dificuldade de realizar análises eficientes e diretas uma vez que este metal pode formar diversos compostos menos solúveis já que possui afinidade química com diversos átomos abundantes tanto na natureza quanto nos meios utilizados para o crescimento microbiano "in vitro". Ficando aqui a necessidade de aprofundar o estudo sobre as possíveis interações do Pb com o meio utilizado.

Na presença de zinco apenas o isolado 17 não cresceu, determinando desta forma capacidade de crescimento dos outros isolados nas concentrações observadas. O aumento da concentração do metal torna o crescimento bacteriano mais lento, através da comparação dos tubos de ensaio com mesmo tempo de crescimento, que apresentaram maior alteração do pH quanto menor era a concentração do metal. Dado de extrema importância considerando que em trabalhos como o de DIAS-JÚNIOR et al, (1998) não foi verificada a presença de bactérias diazotróficas em solos contaminados pela mineração de zinco, mas a presença dessas bactérias foi confirmada pelo autor em áreas próximas à região degradada. Como dito por SILVA et al, (2007), a possibilidade de fitorremediar um ambiente degradado depende de restaurar a biodiversidade do sistemas solo planta.

Na presença do cobalto não houve crescimento dos isolados 14, 15 e 19. Os isolados restantes tiveram seu crescimento comprovado em placa, uma vez que no tubo de ensaio não houve alteração do pH. Nas placas foi possível observar o mesmo evento que ocorreu na presença do zinco, uma redução do numero de células viáveis à medida que a concentração do metal aumenta.

A caracterização morfológica separou os isolados em dois grupos principais pela característica de resistência ao metal cobalto. Na **figura1** é possível ver que o grupo dos isolados não resistentes ao cobalto são separados entre si por cor, uma vez que o isolado 19 apresentou cor creme/amarelo e os isolados 14 e 15 colônias de borda branca com centro azul/verde. O segundo grupo foi dividido em dois, onde o isolado 16 se destacou dos restantes pelo elevado número de colônias formadas em placa, 70. O isolado 17 se difere por não crescer em meio contaminado por zinco. O isolado 18 se diferencia dos isolados 10 e 13 pelo numero de colônias crescidas em placa, sendo 30 para o isolado 18, 54 para o isolado 10 e 50 para o isolado 13.

## CONCLUSÕES

Em solos contaminados com os três metais os isolados 10, 13, 16 e 18 são os mais promissores a



serem estudados, pois apresentam maior resistência.

O isolado 17 não deve ser utilizados na fitorremediação de solos contaminados por zinco.

E os isolados 14, 15 e 19 não são promissores para solos que contenham altas concentrações de cobalto.

A resistência e capacidade de crescimento de bactérias diazotróficas em chumbo deve ser testada com outra metodologia.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Solos da UFRRJ pelo apoio financeiro.

Aos meus pais por sempre terem amado a ciência e o conhecimento me tornando uma pessoa curiosa e entusiasmada.

### **REFERÊNCIAS**

ARAÚJO, U.C.; PIVETTA, F. R.; MOREIRA, J. C. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para a prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. Caderno de Saúde Pública., Scielo vol. 15 n. 1, Rio de Janeiro. Jan/Mar. 1999.

ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; ANDRADE, J. C. Distribuição de chumbo pelo perfil do solo avaliada pelas soluções de DTPA e mehlich-3. Nota., Scielo, Bragantia vol. 57 n.1 Campinas 1998.

ALVES, A. N.L.; ROSA, H. V. D.; Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol.39, n.2, abr./jun. 2003.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaio para Determinar a (Bio)disponibilidade de Chumbo em Solos Contaminados: Revisão. Artigo, Química Nova, vol. 31nº2, São Paulo, 2008

DIAS-JÚNIOR, H. E.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; SILVA, R. Metais Pesados, Densidade e Atividade Microbiana em Solo Contaminado por Rejeitos de Indústria de Zinco. Tese, DCS - Universidade Federal de Lavras – UFLA, 1998.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A.; PROCÓPIO, S.O.; FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. Scielo. Planta Daninha, Viçosa MG, vol.21, n.2, p.335-341, 2003.

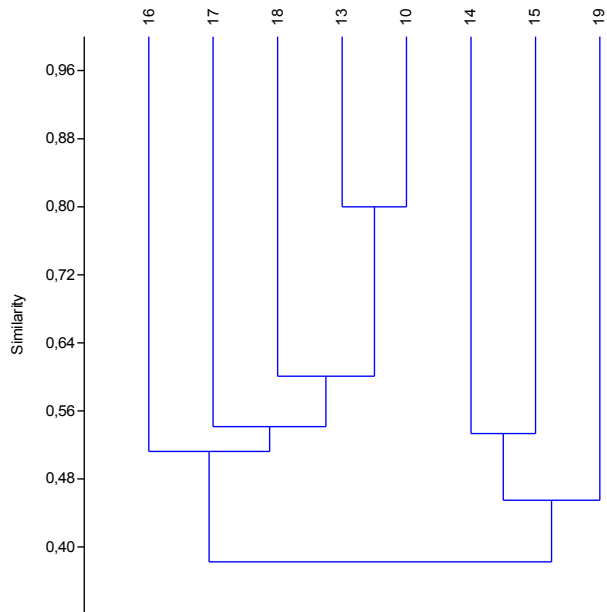
SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Concentração de Metais Pesados em Grãos de Plantas Cultivadas em Solo com Diferentes Níveis de Contaminação. Escola Superior Luiz de Queiroz, Pesq. agropec. Brás., Brasília, vol.42, n.4, p.527-535, abr. 2007.

SANTOS, C.; FONSECA, J.; Zinco: fisiopatologia, clínica e nutrição. Artigo. Revista APNEP. Portugal julho 2012.

VALLE, C. F.; SÁNCHEZ, S. E.; ECHEMENDIA, M. P.; BALDANI, V. L. D. Capacidade de Fixar Nitrogênio em Diferentes Concentrações dos Metais Chumbo, Cobalto e Zinco de Bactérias Isoladas de Solo Cotaminado por Indústria. In: FertBio, Fertilidade e biologia do solo, Araxá – MG, 2014. Anais. Araxá.



**Figura 1:** Árvore dos isolados agrupados por similaridade morfológica pela equação de Jaccard.



**Tabela 1:** Crescimento em placa de petri dos oito isolados avaliados.

Isolado	Puro	Pb100	Pb200	Pb300	Zn100	Zn200	Zn300	Co100	Co200	Co300
10	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
13	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
14	s	s	s	s	s	s	s	n	n	n
15	s	s	s	s	s	s	s	n	n	n
16	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
17	s	s	s	s	n	n	n	s	s	s
18	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
19	s	s	s	s	s	s	s	n	n	n